



TUM School of Medicine and Health

Die Bedeutung der miRNA-221 und -222 für die Puma vermittelte Apoptose in
Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen

Jozefina Maria Lengauer

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
(Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Andreas Knopf
2. Prof. Dr. Kilian Eyerich, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 13.04.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 15.08.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Einleitung	4
2.1 Definition	4
2.2 Epidemiologie	5
2.3 Einteilung und Klassifikation	6
2.4 Ätiologie und Risikofaktoren	12
2.5 Therapie	13
2.6 Das Chemotherapeutikum Cisplatin	18
2.7 Der Wirkstoff Chloroquin	18
2.8 PUMA	19
2.9 microRNA	20
3. Fragestellung	22
4. Material und Methoden	24
4.1 Geräte	24
4.2 Verbrauchsmaterialien	25
4.3 Chemikalien	26
4.4 Assays, Enzyme, Kits und Marker	27
4.5 Software	28
4.6 Antikörper	28
4.6.1 Primäre Antikörper	28
4.6.2 Sekundäre Antikörper	29
4.7 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	29
4.7.1 Zellkulturmedien	29
4.7.2 Verwendete Zelllinien	30
4.7.3 Auftauen, Einfrieren und Kultivierung	32
4.7.4 miRNA-Inhibition	33

4.7.5 Kristallviolett Färbung.....	33
4.7.6 MTT Test	34
4.8 Arbeiten mit Proteinen	35
4.8.1 Herstellen von Ganzzellextrakten aus eukaryotischen Zellen.....	35
4.8.2 Quantitative Proteinbestimmung	35
4.8.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	36
4.8.4 Western-Blot.....	38
4.8.5 Immundetektion	39
5. Ergebnisse.....	40
5.1 Kutane Melanome	40
5.1.1 Chloroquin führt in hohen Dosen zu verminderter Proliferation von kutanen Melanomen	40
5.1.2 Chloroquin hemmt nicht den PUMA Protein Abbau in kutanen Melanomen	41
5.1.3 Chloroquin zeigt in physiologischer Konzentration keine proliferationshemmende Wirkung in kutanen Melanomen.	44
5.1.4 Die Inhibition der miRNA-221 und -222 führt nicht zur erhöhten PUMA Proteinexpression in kutanen Melanomen.....	47
5.1.5 Eine Inhibition der miRNA-221 und 222 zeigt keine proliferationshemmende Wirkung in kutanen Melanomen	50
5.1.6 Die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibitoren mit Chloroquin und Cisplatin bringt keine zusätzliche Proliferationshemmung gegenüber der Behandlung aus Chloroquin und Cisplatin in kutanen Melanomen	52
5.2 Schleimhautmelanome	54
5.2.1 Chloroquin führt in hohen Dosen zu verminderter Proliferation von Schleimhautmelanomen.....	54
5.2.2 Chloroquin hemmt den PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen	55
5.2.3 Chloroquin zeigt in physiologischer Konzentration keine proliferationshemmende Wirkung in Schleimhautmelanomen	58

5.2.4 Die Inhibition der miRNA-221 und -222 führt zur erhöhten PUMA Proteinexpression in Schleimhautmelanomen.....	60
5.2.5 Eine Inhibition der miRNA-221 und 222 zeigt eine proliferationshemmende Wirkung in Schleimhautmelanomen	62
5.2.6 Die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibitoren mit Chloroquin und Cisplatin bringt keine zusätzliche Proliferationshemmung gegenüber der Behandlung aus Chloroquin und Cisplatin in Schleimhautmelanomen.....	64
6. Diskussion	66
6.1 Chloroquin verlangsamt das Wachstum von kutanen Melanomen und Schleimhautmelanomen.....	66
6.2 Proliferationshemmung durch Cisplatin in Chloroquin-behandelten Schleimhautmelanomen.....	69
6.3 Chloroquin nimmt Einfluss auf den PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen...	70
6.4 miRNA-221 und -222 nehmen Einfluss auf die Regulation von PUMA in Schleimhautmelanomen.....	72
6.5 Die Inhibition von miRNA-221 und -222 führt zur Wachstumsverlangsamung von Schleimhautmelanomen.....	75
6.6 Zusammenfassung	78
6.7 Ausblick.....	80
7 Referenzen.....	83
8 Danksagung	93
9 Eidesstaatliche Erklärung.....	94

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
APS	Ammonium Persulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Baf	Bafilomycin
BAX	BCL-2- associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH3	BCL-2 Homologie Domäne
BRAF	B-rapidly accelerated fibrosarcoma protein
CDK	cyclin-dependant kinase
CDKN1A	Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 1A (Proteinname: p21)
CDKN2A	Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2A
Cis	Cisplatin
CQ	Chloroquin
CT	Computertomographie
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Etp	Etoposid
E2F1	Retinoblastoma-Associated Protein 1
FCS	Fetal calf serum

FDA	Food and Drug Administration
FDG-PET	Fluorodesoxyglucose-Positronen Emissions Tomographie
FOXO3	Forkhead Box Protein O3
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H	Human
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish peroxidase
INF- α	Interferon α
LC3	Light Chain 3
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
M	Molar
cM	Metastase
miRNA	microRNA
MM	Malignes Melanom
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Nano (10^{-6})
N	Nodus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma
N-terminal	Amino-terminal
p53	Tumorprotein p53 (Genname TP53)
P73	Tumorprotein p73 (Genname TP73)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction

PD-1	Programmed cell death protein 1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PUMA	P53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastoma Protein
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Tumor
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNM	Tumor Nodus Metastase
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt

2. Einleitung

2.1 Definition

Das maligne Melanom geht von Melanozyten der Haut aus und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Unter den Hauttumoren weist es die höchste Metastasierungsrate auf und ist die Ursache für mehr als 90% der durch Hauttumoren hervorgerufenen Sterbefälle (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018)). Bei frühzeitiger Diagnosestellung ist durch lokale Resektion oftmals ein kurativer Therapieansatz vorhanden. Erfolgt die Diagnosestellung allerdings im bereits metastasierten Stadium bleibt den Patient*innen eine durchschnittliche Lebenserwartung von lediglich 6 bis 10 Monaten (Tsao, Chin, Garraway, & Fisher, 2012). Maligne Melanome manifestieren sich überwiegend an der Haut, jedoch sind auch, wenngleich sehr selten, andere Körperteile wie Konjunktiva, Uvea, Meningen und Schleimhäute betroffen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014)).

Schleimhautmelanome sind seltene Neoplasien und stellen eine besondere Untergruppe dar, da sie an sonnenabgewandten Körperstellen entstehen. Die molekularen Mechanismen, die bei der Entstehung der Neoplasien eine Rolle spielen, sind noch nicht verstanden. Bevorzugt betroffen sind im Kopf-Hals Bereich die Mundhöhle und der Rachen, sowie der Sinusaltrakt. Die anfängliche Symptombefreiheit, sowie die schwer einsehbare Lokalisation führen dabei häufig zu einer verspäteten Diagnosestellung (Conley, 1989). Aufgrund guter vaskulärer und lymphatischer Anbindung (Shah, Huvos, & Strong, 1977), sowie einer hohen Mitoserate und aggressivem Wachstum mit Infiltration der Submukosa (Gondak, da Silva-Jorge, Jorge, Lopes, & Vargas, 2012; Kerr et al., 2012) befinden sich Schleimhautmelanome dann bei Erstdiagnose meist in lokal fortgeschrittenen Stadien. Da in der AJCC-Klassifikation Tumoren der Mukosa dem Tumorstadium T3 zugeordnet werden, liegen Schleimhautmelanome per Definitionem mindestens im T3 Status vor (Pfister et al., 2012). Die vollständige Resektion ist zudem durch die Nähe zu Orbita und Schädelbasis, sowie die komplexe Anatomie des Sinusaltraktes häufig erschwert. Fernab etablierter Therapierichtlinien zeigt sich zudem ein schlechtes Therapieansprechen der Erkrankten. Insgesamt ergibt sich eine 5-Jahresüberlebensrate von weniger als 25% (Papasprou et al., 2011). Die 5-Jahres-Überlebensrate für die Erkrankung an einem kutanen Melanom liegt vergleichend bei 91-94% (Robert-Koch-Institut, 2016). Auch wenn eine lokale Tumorkontrolle mittels chirurgischer Interventionen gelingt, erleiden Patient*innen bei bereits stattgehabter hämatologischer Streuung oftmals Rezidive (Gilligan &

Slevin, 1991). Für die Betroffenen ergibt sich somit zumeist eine infauste Prognose. Dies verdeutlicht den dringenden Bedarf der Etablierung einer wirksamen Therapie. Voraussetzung hierfür ist ein tiefes Durchdringen und Erfassen der molekularbiologischen Pathophysiologie bei der Entstehung von Schleimhautmelanomen.

2.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des malignen Melanoms liegt in Deutschland aktuell bei rund 18.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Bei Männern stellt es die achthäufigste und bei Frauen die vierthäufigste Krebsneuerkrankung dar (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014)). Mit zunehmendem Alter steigt auch die Erkrankungshäufigkeit, wobei junge Frauen häufiger als junge Männer erkranken. Verglichen mit anderen Tumorerkrankungen fällt neben diesem Verhältnis auch die hohe Inzidenz in jungem Alter auf. Ab einem Erkrankungsalter von 60 Jahren schlägt dieses Verhältnis allerdings um. In den vergangenen 30 Jahren zeigte sich eine stetige Zunahme der Erkrankungsinzidenz. Gegenteilig dazu zeigte sich die Mortalität der vergangenen 30 Jahre auf einer gleichbleibend niedrigen Rate. Das relative 5-Jahres-Überleben aller Melanompatient*innen wird dabei aktuell auf mehr als 80% geschätzt, wobei sich in den vergangenen 20 Jahren eine Verbesserung des Überlebens gezeigt hat und das Überleben im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen hoch ist. Einer der wesentlichen Gründe dafür könnte die verbesserte Früherkennung von prognostisch günstigen Melanomen Dank Einführung des Hautkrebsscreenings und der vermehrten Sensibilisierung der Bevölkerung sein (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2014; Leitlinienprogramm Onkologie, 2018)).

Die Untergruppe der Schleimhautmelanome macht ca. 1% (Lengyel, Gilde, Remenar, & Esik, 2003) an allen Melanomen aus. Insgesamt ist das Melanom der Schleimhaut mit einer Häufigkeit von 1,5 Erkrankungen pro 1 Millionen Einwohner*innen in Europa eine äußerst seltene Erkrankung (Ascierto et al., 2017). Im Gegensatz zum malignen Melanom der Haut zeigt beim Schleimhautmelanom die Geschlechterverteilung eine annähernd gleichmäßige Verteilung zwischen Männern und Frauen (Lengyel et al., 2003). Während das mittlere Erkrankungsalter des malignen Melanoms bei 54 Jahren liegt (Garbe & Blum, 2001), ist im

Vergleich dazu das Schleimhautmelanom eine Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters. Das mittlere Erkrankungsalter liegt hier bei 67 Jahren (Gilligan & Slevin, 1991).

2.3 Einteilung und Klassifikation

Das maligne Melanom kann sich phänotypisch auf sehr unterschiedliche Weise präsentieren. Es werden je nach Wachstumsart verschiedene Subtypen unterschieden, die sich histologisch in vier große Gruppen einteilen lassen: das Lentigo-maligna-Melanom, das superfiziell-spreitende Melanom, das noduläre und das akrolentiginöse Melanom (Clark, From, Bernardino, & Mihm, 1969). Mit einem Anteil von 57,6% stellt das superfiziell-spreitende Melanom den Großteil der Melanome. 21,4% der Melanome werden als Lentigo-maligna Melanom klassifiziert, das noduläre Melanom hat einen Anteil von 18,9%. Den kleinsten Teil der Gruppe bildet das akrolentiginöse Melanom mit 2,1% (Chang, Karnell, & Menck, 1998). Da hauptsächlich UV-Strahlung als prädisponierender Risikofaktor gilt, sind hellhäutige, in Gebieten mit hoher Sonneneinstrahlung lebende Menschen bevorzugt betroffen (Gandini, Sera, Cattaruzza, Pasquini, Picconi, et al., 2005). Das superfiziell spreitende Melanom wird aufgrund seines zunächst horizontalen Wachstums in vielen Fällen früh, beispielsweise im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen, entdeckt. Andere Varianten jedoch gehen mit einer deutlich schlechteren Prognose einher und sind von aggressiverem Wachstum gekennzeichnet. Hier ist als Beispiel das noduläre Melanom mit seinem vertikalen Ausbreitungsmuster zu nennen, wobei insgesamt eine lymphogene und hämatogene Metastasierung bereits in frühen Krankheitsstadien zu erwarten ist (Chang et al., 1998). Therapeutisch stellt die rasche Exzision des Primärtumors den Goldstandard dar, während additiv verschiedene Verfahren wie lokale Lymphknotenexstirpation, Strahlen- oder Chemotherapie zur Verfügung stehen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Schleimhautmelanome werden in der Literatur zumeist anhand ihres Vorkommens in den Bereichen Kopf-Hals, Gastrointestinaltrakt und Urogenitalbereich eingeteilt. Okuläre Melanome werden, obwohl sie der Schleimhaut zugehörig sind, zumeist als eigene Entität klassifiziert (Seetharamu, Ott, & Pavlick, 2010). Tumoren der Kopf-Hals-Region repräsentieren mit 55,4% den größten Teil der Gruppe (Chang et al., 1998).

In den primären Stadien des kutanen Melanoms stellt die Tumordicke nach Breslow den bedeutendsten prognostischen Faktor dar. Aufgrund derzeitiger Studiendaten wird zusätzlich der Mitoserate eine hohe prognostische Relevanz bei Melanomen bis zu 1 mm Tumordicke zugesprochen (Azzola et al., 2003).

Tab. 1: T-Klassifikation des kutanen Melanoms (Azzola et al., 2003; Petro, Schwartz, & Johnson, 2004)

T-Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostische Parameter
Tis	keine Tumordinfiltration	Melanoma in situ,
Tx	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar
T1	≤ 1,0mm	a: ohne Ulzeration, Mitosen < 1/mm ² b: mit Ulzeration oder Mitosen ≥ 1/mm ²
T2	1,01 - 2,0mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01 – 4,0mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	> 4,0mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration

Tab. 2: N-Klassifikation des kutanen Melanoms (Azzola et al., 2003; Petro et al., 2004)

N-Klassifikation	Zahl metastatisch befallener LK	Ausmaß der LK-Metastasierung
NX		Material nicht beurteilbar
N0	0 LK	Keine regionalen LK-Metastasen
N1	1 LK	a: mikroskopische Metastase b: makroskopische Metastase
N2	2 – 3 LK	a: mikroskopische Metastase b: makroskopische Metastase c: Satellit(en) oder In-transit-Metastase(n) ohne regionäre LK-Metastasen
N3	≥ 4 LK oder verbackene Lymphknoten oder Satelliten oder Intransit-Metastasen mit regionärer Lymphknotenbeteiligung	

Tab. 3: M-Klassifikation des kutanen Melanoms (Azzola et al., 2003; Leitlinienprogramm Onkologie, 2018; Petro et al., 2004)

M-Klassifikation	Art der Fernmetastasierung	LDH
cMx	Nicht beurteilbar	-
cM0	Keine Fernmetastasierung	normal
cM1a	Metastasen in Haut, Subkutis oder LK jenseits regionärer LK	normal
cM1b	Lungenmetastase(n)	normal
cM1c	Fernmetastase(n) anderer Lokalisation oder Fernmetastase(n) jeder Lokalisation mit erhöhten Serumwerten der LDH	normal erhöht

Tab. 4: Stadieneinteilung des malignen Melanoms (Balch et al., 2009)

Stadium	Primärtumor	Regionäre LK-Metastasen	Fernmetastasen
0	In-situ-Tumoren	keine	keine
IA	< 1,0mm, keine Ulzeration	keine	keine
IB	< 1,0mm mit Ulzeration oder Mitoserate/mm ² ≥ 1	keine	keine
	1,01 – 2,0mm, keine Ulzeration	keine	keine
IIA	1,01 – 2,0mm mit Ulzeration	keine	keine
	2,01 – 4,0mm, keine Ulzeration	keine	keine
IIB	2,01 – 4,0mm mit Ulzeration	keine	keine
	> 4,0mm, keine Ulzeration	keine	keine
IIC	> 4,0mm mit Ulzeration	keine	keine
IIIA	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 LK	keine
IIIB	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 LK	keine
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	≤ 3 makroskopische nodale Metastasen	keine
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Keine, aber Satelliten- und/ oder In-transit- Metastasen	keine
IIIC	Jede Tumordicke mit Ulzeration	≤ 3 makroskopische nodale Metastasen oder Satellit(en) oder In-transit- Metastase(n) ohne regionäre LK-Metastasen	keine

	Jede Tumordicke ± Ulzeration	≥4 makroskopische nodale Metastasen oder verbackene LK oder Satelliten und/oder In-transit-Metastasen mit regionären LK-Metastasen	keine
IV			Fernmetastasen

Die Einteilung von Schleimhautmelanomen kann anhand histopathologischer Merkmale erfolgen. Die Diagnostik stellt sich allerdings schwierig dar. Circa 40% der Schleimhautmelanome sind amelanotischen Typs. Verglichen dazu liegt der Anteil amelanotischer Formen beim kutanen Melanom lediglich bei 10 % (Carvajal, Spencer, & Lydiatt, 2012).

Schleimhautmelanome weisen mit ihrer epitheloiden, plasmazytoiden und spindeligen Zellmorphologie histopathologische Parallelen zu Lymphomen, Plasmozytomen, undifferenzierten Karzinomen sowie verschiedenen Sarkomen auf (Casiraghi & Lefevre, 2009), sodass in der Regel zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen für eine sichere Diagnosestellung notwendig sind.

Neben einer oftmals sehr hohen Mitoserate weisen Melanome der Schleimhaut ein lokal aggressives und invasives Wachstumsverhalten mit Eindringen in die Submukosa unter Destruktion umgebender Strukturen und Organe auf (Gondak et al., 2012; Kerr et al., 2012). Aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Gegebenheiten der Schleimhaut, entspricht die vertikale Tumordicke nicht dem Breslow-Index, der bei kutanen Melanomen angewandt wird. An der Schleimhaut kann entsprechend den anatomischen Gegebenheiten von der äußersten Mukosaschicht bis zur am tiefsten im Gewebe gelegenen Tumorzelle gemessen werden. Allerdings kann bei Schleimhautmelanomen eine Schleimhautbeteiligung fehlen (Gru, Becker, Dehner, & Pfeifer, 2014).

Zur Beurteilung von Schleimhautmelanomen bestehen bislang keine klaren histopathologischen Standards. Zudem ist kein einheitliches Klassifikationssystem für die verschiedenen Subtypen von Schleimhautmelanomen etabliert (Tacastacas et al., 2014). Für das Schleimhautmelanom des oberen Aerodigestivtrakts scheint sich die AJCC-Klassifikation

von 2009 zu etablieren (Edge & Compton, 2010), während für Vulvamelanome die Einteilung anhand der AJCC-Klassifikation für kutane Melanome empfohlen wird (Wechter et al., 2004). Für alle anderen Lokalisationen sind keine spezifischen Klassifikationssysteme etabliert (Tacastacas et al., 2014).

Tab. 5: TNM/AJCC-Klassifikation für Schleimhautmelanome des oberen Aerodigestivtrakts (Edge & Compton, 2010)

Primärtumor			
T3	Isolierter Schleimhautbefall		
T4a	Invasion in das tiefe Weichteilgewebe, Knorpel, Knochen oder die darüberliegende Haut		
T4b	Invasion von Dura, Gehirn, Schädelbasis, Hirnnerven, Mastoid, Arteria carotis, prävertebralem Raum oder Mediastinum		
Regionale LK			
Nx	Fehlende Beurteilbarkeit		
N0	Kein Befall regionaler LK		
N1	Befall regionaler LK		
Fernmetastasen			
cM0	Keine Fernmetastasen		
cM1	Fernmetastasen		
Klinisches Stadium			
Stadium III	T3	N0	cM0
Stadium IVA	T4a	N0	cM0
	T3-T4a	N1	cM0
Stadium IVB	T4b	alle N	cM0
Stadium IVC	alle T	alle N	cM1

2.4 Ätiologie und Risikofaktoren

UV-Exposition und Sonnenbrände in Kindheit und Jugendalter werden als wichtigster Risikofaktor für das Auftreten maligner Melanome diskutiert (Armstrong & Kricger, 2001; Dulong et al., 2002). Maligne Melanome treten gehäuft bei hellhäutigen Personen mit roten oder blonden Haaren und Sommersprossen auf, die leicht einen Sonnenbrand bekommen (Hauttyp I nach Fitzpatrick) (Gandini, Sera, Cattaruzza, Pasquini, Zanetti, et al., 2005). Zudem werden benigne Nävi als mögliche Vorläufer des malignen Melanoms diskutiert (Gray-Schopfer et al., 2006; Kvaskoff et al., 2011; Whiteman et al., 2003). Für die Entwicklung eines malignen Melanoms ist somit die Anzahl gutartiger erworbener Nävi ein bedeutender Risikofaktor (Dulong et al., 2002). Es muss dabei allerdings berücksichtigt werden, dass die Entstehung maligner Melanome auch Nävus-unabhängig geschehen kann (Rivers, 2004), sodass die Anzahl benigner Nävi als solches nur als eine Pigmentierungsstörung gelten kann, welche mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines malignen Melanoms einhergeht. Als Risikofaktor in der Entstehung des malignen Melanoms sind auch aktivierende Mutationen zu berücksichtigen. Die häufigste Mutation findet sich im Onkogen BRAF, welche bei ca. 50% aller primären malignen Melanome nachweisbar ist (Goel, Lazar, Warneke, Redston, & Haluska, 2006), in 15% findet sich eine aktivierende NRAS-Mutation (Ascierto et al., 2013).

Für die Entstehung eines Schleimhautmelanoms sind keine klaren Risikofaktoren bekannt. Die Ätiopathogenese ist noch kaum verstanden. Aufgrund der sonnenabgewandten Lokalisation scheint dieser für kutane Melanome so bedeutende Risikofaktor keine Rolle bei der Entstehung von Schleimhautmelanomen zu spielen. Ein ätiopathogenetischer Zusammenhang zu einer Infektion mit humanen Papillomaviren, Herpesviren oder Polyomaviren konnte nicht nachgewiesen werden (Dahlgren, Schedvins, Kanter-Lewensohn, Dalianis, & Ragnarsson-Olding, 2005; Giraud, Ramqvist, Ragnarsson-Olding, & Dalianis, 2008; Lundberg et al., 2006). Eine Exposition gegenüber Formaldehyd wird als Risikofaktor für das Auftreten im Sinusaltrakt diskutiert (Holmstrom & Lund, 1991). Da gezeigt werden konnte, dass bei Rauchern häufiger orale pigmentierte Läsionen zu finden sind, gilt Tabakrauch zudem als potentieller Risikofaktor für ein Auftreten in der Mundhöhle (Axell & Hedin, 1982). Aufgrund des potentiell erhöhten Entartungsrisikos wird für solche Schleimhaut-Nävi eine rasche Exzision empfohlen (Batsakis, Regezi, Solomon, & Rice, 1982). Analysen möglicher Mutationen in Schleimhautmelanomen befinden sich derzeit noch in der Anfangsphase. Bisher wurden

Mutationen in KIT, BRAF und NRAS beschrieben. Dabei liegt in 14% aller Schleimhautmelanome eine Mutation von KIT vor, 5% weisen eine Mutation von BRAF auf, in 14% liegt eine Mutation in NRAS vor (Tacastacas et al., 2014)

2.5 Therapie

Die Therapieprinzipien für das maligne Melanoms sind in der 2018 aktualisierten S-3-Leitlinie beschrieben (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018)). Im Rahmen eines kurativen Therapieansatzes wird für das maligne Melanom die radikale chirurgische Exzision mit Sicherheitsabständen zum Tumorrand empfohlen, um lokale Tumorrezidive zu verhindern (Sladden et al., 2009). Da die chirurgische Exzision die einzige kurative Behandlung darstellt, sollte bei der Exzision der Primärtumor vollständig entfernt werden.

Tab. 6: Sicherheitsabstand bei Primärexzision (Sladden et al., 2009)

Stadium	Tumordicke nach Breslow	Sicherheitsabstand
pT1, pT2	≤ 1 – 2mm	1 cm
pT3, pT4	2,01 – > 4,0mm	2 cm

Es wird angenommen, dass der seitliche Sicherheitsabstand bei der Exzision keinen entscheidenden Einfluss auf eine Fernmetastasierung hat. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass mit Zunehmen der Tumordicke und abnehmendem Sicherheitsabstand bei der Exzision das Risiko für das Auftreten von lokalen Rezidiven erhöht ist (Veronesi & Cascinelli, 1991). Zur definitiven Diagnosestellung ist eine anschließende histologische Begutachtung notwendig. Analysiert werden die Symmetrie des Tumors und seine lateralen Begrenzungen (Tronnier et al., 1997).

Eine stattgehabte lymphogene Metastasierung geht mit einer schlechteren Prognose einher. Wenn bereits eine Metastasierung in regionale Lymphknoten stattgefunden hat, sollen diese

vollständig reseziert werden. Ist die Operabilität nicht gegeben, muss die weitere Therapie individuell für die Patient*innen und mit diesen abgesprochen erfolgen.

Mit dem Ziel einer R0-Situation (Tumorfreiheit) sollten auch auch einzelne (sub-)kutane Metastasen sollten im Sinne einer radikalen Exzision vollständig reseziert werden (Dong, Tyler, Johnson, DeMatos, & Seigler, 2000). Es müssen allerdings weitere Therapien erwogen werden, sollte eine chirurgische Kontrolle der Metastasen nicht gelingen. Die Entscheidung über den Einsatz weiterer therapeutischer Maßnahmen wie Elektrochemotherapie, hypertherme Extremitätenperfusion, Kryochirurgie oder Radiotherapie erfolgt auch unter Betracht des Allgemeinzustandes und der Komorbiditäten der Patient*innen.

Bei den primär inoperablen Melanomen und auch speziell beim Lentigo-maligna-Melanom kann eine primäre Strahlentherapie diskutiert werden. Eine langfristige Rezidivfreiheit nach Radiotherapie kann in etwa 85 bis 95% der Fälle erreicht werden (Farshad, Burg, Panizzon, & Dummer, 2002; Harwood, 1983; Schmid-Wendtner et al., 2000). Bei desmoplastischen Melanomen ohne suffizienten Sicherheitsabstand kann eine postoperative Bestrahlung zur Stärkung der örtlichen Tumorkontrolle erwogen werden (Foote, Burmeister, Burmeister, Bayley, & Smithers, 2008; Rule et al., 2016; Vongtama, Safa, Gallardo, Calcaterra, & Juillard, 2003). Es liegen bei anderen Typen als dem desmoplastischen Melanom wenig Daten zur Bedeutung einer postoperativen Radiotherapie vor, sodass hier in der aktuellen S3-Leitlinie keine Empfehlung ausgesprochen wird.

Insgesamt stellt die Klassifikation nach dem TNM-Stadium die Basis für das weitere diagnostische und therapeutische Procedere dar. Neben der Ganzkörperuntersuchung wird ab Stadium IB bis einschließlich IIB zur Lymphknoten-Sonografie sowie der Bestimmung des Tumormarkers S100B geraten. Eine generelle Empfehlung zur Durchführung jeglicher weiteren Bildgebung besteht bei diesen Tumorstadien nicht.

Ab einer Tumordicke von 1,0mm soll die Wächterlymphknoten-Biopsie erfolgen. Liegen zusätzliche Risikofaktoren wie Ulzerationen, eine hohe Mitoseraten oder ein frühes Erkrankungsalter unter 40 Jahren vor, die das Risiko für einen positiven Wächterlymphknoten erhöhen, legen Studien eine Biopsie des Wächterlymphknotens auch bei dünneren Primärtumoren (0,75 – 1mm) nahe (Kunte et al., 2010; Mays et al., 2010; McMasters et al., 2001; Morton et al., 2006; Testori et al., 2009; Warycha et al., 2009).

Bei Patient*innen mit Tumor im Stadium IIC besteht ein ähnliches Risiko für ein Rezidiv wie bei einer Mikrometastasierung im Stadium III. Für Patient*innen im Stadium IIC werden

Rezidivraten von 44,3% angegeben (Francken et al., 2008), Patient*innen im Stadium III erleiden in 51% der Fälle ein Rezidiv (Leiter et al., 2012). So werden Patient*innen im Stadium IIC leitliniengerecht hinsichtlich der Diagnostik wie Erkrankte im Stadium III behandelt.

Auch bei Patient*innen im Tumorstadium IIC und III wird eine lokoregionale Lymphknoten-Sonographie sowie die Bestimmung von S100B empfohlen. Zusätzlich sind Schnittbildgebende Verfahren in der Ausbreitungsdiagnostik indiziert, wobei die PET/CT aufgrund der hohen diagnostischen Genauigkeit bevorzugt eingesetzt werden soll (Xing et al., 2011). Da die Schädel-MRT in der Darstellung zerebraler Strukturen sensitiver ist als die Computertomographie (CT) und Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET), wird bei Erkrankten im Stadium III–IV und wenn das Bestehen von zerebralen Metastasen einen Einfluss auf ein adjuvantes Therapieregime hätte, eine Schädel-MRT empfohlen, (Fogarty & Tartaglia, 2006; Schlamann, Loquai, Goericke, Forsting, & Wanke, 2008). Als zusätzlicher prognostischer Marker kann die Bestimmung der LDH herangezogen werden (Nowecki, Rutkowski, Kulik, Siedlecki, & Ruka, 2008).

Eine prophylaktische (elektive) Lymphadenektomie ist nicht empfohlen (Skalicky, Holt, Giblin, Taylor, & Conway, 2008). Beim Nachweis einer stattgehabten lymphogenen Metastasierung soll eine therapeutische Lymphadenektomie durchgeführt werden, sofern keine Hinweise auf eine Fernmetastasierung bestehen (Morton, Wanek, Nizze, Elashoff, & Wong, 1991). Die aktuelle Leitlinie spricht eine Empfehlung zur postoperativen adjuvanten Radiotherapie aus, sofern der Befall von wenigstens drei Lymphknoten besteht, bereits ein Durchbruch der Kapsel stattgefunden hat oder eine Lymphknotenmetastase mehr als 3 cm Größe misst. So kann durch eine postoperative Strahlentherapie zwar keine Lebensverlängerung erzielt werden, jedoch sollen Symptomfreiheit und damit verbunden die Lebensqualität der Patient*innen verbessert werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Prospektiv randomisierte Studien zur systemischen adjuvanten Zytostatikatherapie mit Cisplatin, Dacarbazin, Granulozyten Kolonie-Stimulierungs-Faktor, Interleukin2, IFN alfa-2b und Vinblastin zeigten keinen signifikanten Vorteil für die Behandelten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Flaherty et al., 2014), sodass keine Empfehlung zur adjuvanten Chemotherapie ausgesprochen wird.

Jedoch kann bei Patient*innen im Tumorstadium IIA eine niedrig dosierte adjuvante Interferontherapie erwogen werden (Grob et al., 1998; Pehamberger et al., 1998). Patient*innen im Stadium IIB und C, sowie IIIA - C soll hingegen soll die adjuvante

Interferontherapie empfohlen werden, da im Stadium III Interferon das rezidivfreie Überleben verlängert. Ein Gesamtüberlebensvorteil konnte nicht gezeigt werden (Eggermont et al., 2008). Aufgrund des ausgeprägten Nebenwirkungsprofils muss ein individuelles Therapieschema unter Berücksichtigung der Komorbiditäten und des Allgemeinzustandes unter sorgfältiger Nutzen-Risiko-Abwägung erstellt und mit den Patient*innen diskutiert werden.

Zudem kann im Stadium III A - C eine adjuvante Ipilimumab-Therapie erwogen werden, wobei auch hier die schweren unerwünschten Nebenwirkungen berücksichtigt werden müssen. Jedoch konnte ein statistisch signifikanter Vorteil bei Gesamtüberleben und fernmetastasierungs- und progressionsfreiem Intervall gezeigt werden. Den zahlreichen schweren Nebenwirkungen steht ein Überlebensvorteil von ca. 10% gegenüber (Eggermont et al., 2016; Eggermont et al., 2015). Durch den Überlebensvorteil stellt Ipilimumab eine diskutabile alternative zur Interferonbehandlung dar.

Bezüglich einer operativen Therapie bei lokoregionaler Metastasierung wird eine chirurgische Resektion kutaner und subkutaner Metastasen angeraten, sofern eine mikroskopisch vollständige Entfernung (R0-Resektion) der Metastasen erreichbar ist und noch keine weitere Fernmetastasierung stattgefunden hat. Besteht im Bereich einer Extremität eine multiple Hautmetastasierung, kann eine Chemotherapie als isolierte Extremitätenperfusion erwogen werden, wenn die Metastasen durch andere Maßnahmen wie mehrfache Exzision oder CO₂-Laserablation nicht zu beherrschen sind (Turley, Raymond, & Tyler, 2011).

Bei palliativem Therapiekonzept kann zur lokalen Tumorkontrolle zudem bei Satelliten- und In-transit-Metastasen der Einsatz einer lokalen Radiotherapie erwogen werden, da Studien ein gutes Ansprechen ebenjener darauf zeigen (Chadha, Hilaris, Nori, Shiu, & Anderson, 1990; Overgaard et al., 2009). Als medikamentöse Therapiemöglichkeiten stehen bei diesen Patient*innen lokale Verfahren wie die Applikation von Interleukin 2 und die Elektrochemotherapie mit Cisplatin oder Bleomycin zur Verfügung.

Ab Stadium IIIB sollte zudem auf Mutationen wie BRAF getestet werden, was beim Nachweis einer Mutation den Einsatz spezifischer Inhibitoren ermöglicht. Beim Vorliegen von BRAF-Mutationen (ca. 50% der Fälle (Goel et al., 2006)) kann eine Therapie mit BRAF-Inhibitoren erwogen werden. Im durch Fernmetastasen charakterisierten Stadium IV besitzen chirurgische und strahlentherapeutische Maßnahmen einen geringeren Stellenwert. Die Resektion von Fernmetastasen sollte erwogen werden, wenn eine mikroskopisch vollständige Resektion ohne große funktionelle Defizite erreicht werden kann und andere Therapieverfahren weitestgehend

ausgeschöpft sind. Für eine systemische Chemotherapie kommen beispielsweise Dacarbazin oder Temozolamid in Frage. Es kann jedoch aufgrund der unzulänglichen Datenlage keine allgemeine Empfehlung zur adjuvanten Therapie nach Metastasenresektion ausgesprochen werden.

Bei Schleimhautmelanomen ist wie auch bei kutanen Melanomen die vollständige Tumorresektion anzustreben, wobei eine radikale Tumorresektion gegen die anatomischen Gegebenheiten im Operationsgebiet abgewogen werden muss. Hierbei ist auch das Berücksichtigen operationsspezifischer Morbiditäten essentiell (Ciarrocchi, Pietroletti, Carlei, & Amicucci, 2017; Gore & Zanation, 2012). Zu empfohlenen Sicherheitsabständen gibt es in der Literatur keine Angaben, wobei tumorfreie Resektionsränder einen relevanten Prognosefaktor darstellen (Penel, Mallet, Mirabel, Van, & Lefebvre, 2006), sodass sich die Resektionsabstände an jenen für das kutane Melanom orientieren können.

Laut aktueller S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms kann bei Schleimhautmelanomen nach R1- oder R2-Resektion eine Strahlentherapie zur lokalen Beherrschung des Tumors durchgeführt werden. Hat eine Lymphknotenmetastasierung stattgefunden, ist wie auch bei kutanen Melanomen eine adjuvante Bestrahlung möglich. Insgesamt kann jedoch aufgrund der unzulänglichen Datenlage und fehlenden randomisierten Studien keine Empfehlung bezüglich eines Bestrahlungskonzepts ausgesprochen werden. Auch hinsichtlich der Behandlung von Patient*innen im inoperablen oder metastasierten Stadium eines Schleimhautmelanoms existieren wenig relevante Daten zur Systemtherapie, sodass auch hier das Konzept der systemischen Behandlung kutaner Melanome der Orientierung dienen kann. Zu berücksichtigen ist auch hier der Mutationsstatus, wobei beispielsweise wie auch beim kutanen Melanom bei Nachweis einer BRAF-Mutation eine Therapie mit BRAF-Inhibitoren diskutiert werden muss. Diese kann gegebenenfalls in Kombination mit einem MEK-Inhibitor oder Checkpointinhibitor erfolgen. Da in Schleimhautmelanomen gehäuft und deutlich häufiger als in kutanen Melanomen c-KIT-Inhibitor-sensitive c-KIT-Mutationen beschrieben sind (Auftreten in 6-27%, je nach anatomischer Lokalisation (Tcastacas et al., 2014)), spielt hier die Therapie mit c-KIT-Kinaseinhibitoren eine größere Rolle und kann nach erfolgloser Immuntherapie eine Behandlungsoption darstellen.

2.6 Das Chemotherapeutikum Cisplatin

Cisplatin ist eines der bedeutendsten Chemotherapeutika und stellt einen wesentlichen Baustein in der Therapie unterschiedlichster Tumorerkrankungen dar. Den primären Angriffspunkt stellt dabei die DNA dar. Cisplatin besteht aus einem zentralen Platinatom mit je zwei Amin- und zwei Chlorliganden. Durch hydrolytische Prozesse nach Eintritt in das chloridarme Zellplasma wird es zu Komplexen aus Platin und Wasser, welche an der N-7-Position der Basen Adenin und Guanin angreifen. Auf diese Weise entstehen Intra- und -Interstrangvernetzungen der DNA, was eine Strukturveränderung der DNA mit sich bringt. Diese behindert die Replikation der Zelle und schließlich wird über die Induktion unterschiedlicher Signalwege die Apoptose induziert (Basu & Krishnamurthy, 2010). Hierbei spielt der p53-Signalweg als Induktor der Apoptose eine entscheidende Rolle (Siddik, 2003). Studien zeigten, dass die Zellschädigung durch Cisplatin eine Aktivierung der Proteinkinase ATR hervorruft. Dadurch wird direkt oder indirekt p53 phosphoryliert und aktiviert (Damia et al., 2001). P53 aktiviert infolgedessen unter anderem die Expression der pro-apoptotischen Gene der BCL-2 Familie, zu denen unter anderem PUMA gehört (Haupt, Berger, Goldberg, & Haupt, 2003). PUMA aktiviert als Hauptvermittler der pro-apoptotischen Funktion von p53 die pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK (Yu & Zhang, 2008). Diese bilden dann Poren in der äußeren Membran der Mitochondrien, durch welche Cytochrom c abgegeben wird (Westphal, Dewson, Czabotar, & Kluck, 2011). Dieses stimuliert zusammen mit dATP (Deoxyadenosintriphosphat) die Oligomerisierung des Apoptosoms, welches die Caspasen-Kaskade aktiviert (Wu et al., 2016). Im Verlauf kommt es zur Teilung von PARP (poly ADP-ribose polymerase-1), bei der zwei Fragmente entstehen. Eines davon bindet irreversibel an die DNA und hemmt auf diese Weise DNA-Reparaturenzyme (Chaitanya, Steven, & Babu, 2010). Letztendlich wird durch Aktivierung der Caspasen-Kaskade und weiterer nachfolgender Signalwege eine Fragmentierung der DNA erzielt (Kitazumi & Tsukahara, 2011).

2.7 Der Wirkstoff Chloroquin

Chloroquin ist ein klassischer Wirkstoff aus der Gruppe der Anti-Malariamittel mit antiparasitärer und entzündungshemmender Wirkung. Es hat zudem eine alkalisierende

Wirkung in den Lysosomen der Zellen und wirkt dadurch hemmend auf die Autophagie (Sundelin & Terman, 2002). Autophagie ist ein regulierter Prozess, welcher über den Abbau zelleigener beschädigter Organelle über saure Hydrolyse das Überleben der Zelle sichert (B. Levine & Kroemer, 2008). Mit seinen Proteasen, Lipasen und Nukleasen nimmt dabei das Lysosom eine zentrale Position ein (Saftig & Klumperman, 2009). Es kommt zur Formung von Doppelmembran-Vesikeln um Bestandteile des Zytoplasmas herum. Durch die Verschmelzung ebenjener äußerer Membran mit dem Lysosom entsteht ein Autophago-Lysosom. Nach Abbau der inneren Membran wird der Inhalt von den lysosomalen Enzymen hydrolysiert (Klionsky & Codogno, 2013; Kroemer, Marino, & Levine, 2010).

Der Prozess der Autophagie läuft in jeder Zelle stets in geringem Ausmaß ab und kann beispielsweise durch oxidativen Stress (Filomeni, De Zio, & Cecconi, 2015) verstärkt induziert werden. In unterschiedlichen Tumorarten kann eine Fehlregulation der Autophagie zu einem verstärkten Tumorzellüberleben führen, selbst unter für die Zelle ungünstigen Bedingungen (Baehrecke, 2005; White, 2012).

2.8 PUMA

PUMA (p53 upregulated mediator of apoptosis) wurde im Jahre 2001 erstmals identifiziert und als Protein der Gruppe der BCL-2 Familie beschrieben. Als Mitglied ebenjener wird PUMA durch seine hohe pro-apoptotische Aktivität charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass nach p53-Aktivierung eine rasche PUMA-Induktion stattfindet (Nakano & Vousden, 2001). p53 ist bekannt als Tumorsuppressor, welcher das Wachstum mutierter oder beschädigter Zellen hemmt und so eine Tumorentstehung verhindert (A. J. Levine, 1997; Prives & Hall, 1999), indem es einen Zellzyklusarrest herbeiführt und die Apoptose induziert (Bates & Vousden, 1999). Aktiviert wird der p53-Signalweg durch unterschiedlichste Stimuli wie DNA-Schäden, Hypoxie oder durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten (Lohrum & Vousden, 1999). Über die Aktivität von PUMA, welche größtenteils über Transkription reguliert wird, wird beinahe die gesamte pro-apoptotische Wirkung von p53 vermittelt (Yu & Zhang, 2008). Diese pro-apoptotische Wirkung beruht zum einen auf der Bindung der BH3-Domäne von PUMA an anti-apoptotische Proteine der BCL-2-Familie und deren Antagonisierung. Zum anderen erfolgte durch PUMA auch eine direkte Freisetzung der pro-apoptotischen BAX und BAK (Vela, Gonzalo, Naval, &

Marzo, 2013; Westphal et al., 2011; Yu & Zhang, 2008). Aufgrund seiner hohen Potenz als Apoptose Induktor muss die Aktivität von PUMA strengen Kontrollmechanismen unterliegen. Normalerweise ist die PUMA Expression gering, jedoch kann sie rasch durch unterschiedliche Induktoren wie p53, aber auch p73, E2F1 und FOXO3a angehoben werden und so eine Apoptose induziert werden (Fricker, O'Prey, Tolkovsky, & Ryan, 2010).

Aufgrund seiner hohen Potenz als Apoptose Induktor unterliegt Aktivität von PUMA strengen Kontrollmechanismen. Bezüglich des Proteinabbaus konnte in Studien ein Zusammenhang zwischen der PUMA Stabilität und dem Proteasom gezeigt werden, welcher einen Abbau von PUMA im Proteasom nahelegt (Fricker et al., 2010). In Cervixtumorzellen konnte in Studien gezeigt werden, dass deren PUMA Konzentrationen durch Autophagie gesenkt werden kann. Dies soll mit dem Ziel geschehen die mitochondriale Apoptose kontrollieren zu können und gibt der Autophagie die Möglichkeit der Apoptose Inhibition (Thorburn et al., 2014). In Melanomzellen konnte ein Autophagie vermittelter Abbau von PUMA nachgewiesen werden, welcher wiederum mithilfe von Chloroquin als Autophagie Inhibitor gehemmt werden konnte. So konnte durch die Stabilisation der PUMA Konzentrationen in den Zellen eine Apoptose fördernde Wirkung herbeigeführt werden (Lakhter et al., 2013).

2.9 microRNA

miRNAs (microRNA) sind einsträngige, nicht kodierende Nukleotidsequenzen mit einer Länge von 20-25 Basenpaaren. Sie regulieren die Expression unterschiedlichster Zielgene durch sequenzspezifische Hybridisierung an der 3'-UTR (untranslated region) von messenger-RNA (Lai, 2002). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass miRNAs auch Bindungen an der 5'-UTR, mit DNA-Abschnitten oder mit Exonen eingehen können (Small, Frost, & Olson, 2010). Sie blockieren durch die Bindung die Translation ebenjener messenger-RNA (Zeng, Wagner, & Cullen, 2002) oder bewirken ihren direkten Abbau (Meijer et al., 2013). In beiden Fällen wird eine Inhibition der Proteinexpression erreicht. Hierzu ist keine zu ihrer Zielstruktur genau passende komplementäre Basensequenz nötig, sodass eine einzelne miRNA für die Regulation mehrerer messenger-RNAs verantwortlich sein kann (Christopher et al., 2016). Ihnen wird eine beachtliche Funktion bei der Regulation unterschiedlichster biologischer Prozesse wie

Signaltransduktion, Wachstum und Zellzyklus zugesprochen, wobei man davon ausgeht, dass bis zu 30% des menschlichen Genoms von miRNA reguliert wird (Lewis, Burge, & Bartel, 2005). MiRNA-15 und -16 sind die ersten miRNAs, deren Expression in einem Tumor als fehlreguliert beschrieben wurde. Ihre Expression ist in chronisch lymphatischen Leukämien vom B-Zell-Typ heruntergesetzt (Calin et al., 2002). Untersuchungen zeigen, dass eine gestörte miRNA Expression in Tumorzellen eher die Regel statt einer Ausnahme ist. Beschrieben wurde die Rolle ebenjener bereits in Tumoren der Mamma, des Kolons, der Lunge, der Prostata und der Schilddrüse. Zudem wurde eine gestörte miRNA Expression für weitere verschiedene Erkrankungen wie Hepatitis C, Myokardinfarkte, myeloproliferative und metabolische Erkrankungen beschrieben. Die Störungen werden auf unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt. Es kommt in verschiedenen Tumorarten zu einer Über- oder Unterexpression von miRNAs. Vermehrt exprimierte miRNAs können im Falle einer Beteiligung bei der Tumorentstehung auch Tumorsuppressoren inhibieren und in diesem Sinne als Onkogene, sog. „Oncomirs“, betrachtet werden (Lu et al., 2005). Es sind verschiedene miRNAs bekannt, deren Über- oder Unterexpression einen Einfluss auf die Proliferation kutaner Melanome hat (Segura, Greenwald, Hanniford, Osman, & Hernando, 2012). Als Inhibitoren der Tumordinvasion und Metastasierung kutaner Melanome konnten beispielsweise miRNA-382 und miRNA-516b beschrieben werden (Hanniford et al., 2015). Eine erhöhte Expression in Melanomen zeigen besonders miRNA-221 und -222 (Felicetti, Errico, Segnalini, Mattia, & Care, 2008) und stellt möglicherweise einen neuen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie dar. Kutane Melanome weisen eine vergleichsweise niedrige miRNA-221 und -222 Expression auf. Untersuchungen zur Expression der miRNA-221 und -222 in Schleimhautmelanomen zeigen eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu kutanen Melanomen (Marie Kristin Fritsche, 2019).

3. Fragestellung

Maligne Melanome gehen von den Melanozyten der Haut aus und gehen mit einer überaus schlechten Prognose einher. Klinisch zeichnen sie sich durch ein schlechtes Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie aus. Insbesondere klassische p53-induzierende Chemotherapeutika wie Cisplatin zeigen eine schlechte Ansprechrate. Schleimhautmelanome stellen eine besondere Untergruppe der Melanome dar. Der Hals-Nasen-Ohren-Bereich ist hauptsächlich mit dem Sinusnasaltrakt und der Mundhöhle betroffen. Die Operabilität ist im Allgemeinen limitiert. Die komplexe Anatomie des Nasennebenhöhlenbereichs erschwert überdies die komplette Entfernung des Befunds. Damit ist die Prognose dieser Patient*innen in aller Regel infaust und die Etablierung einer erfolgreichen systemischen Therapie essentiell. Die molekularen Mechanismen, die die Entstehung und das überaus aggressive biologische Verhalten von Schleimhautmelanomen unterhalten, sind nicht bekannt. Aberrationen im p53-Tumorsuppressorgen konnten in vielen soliden Tumoren nachgewiesen werden. In der überwiegenden Zahl der malignen Melanome kommt es zu einer konstitutionellen p53-Expression, ohne dass eine Protein-stabilisierende Mutation zugrunde läge. In Vorarbeiten zur p53 Integrität in Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen konnte eine sehr geringe bzw. nicht induzierbare Proteinexpression des p53 Zielgens PUMA, sowie ein rascher PUMA mRNA Abbau detektiert werden (Marie Kristin Fritsche, 2019). In anderen Tumorentitäten wurden miR-221 und -222 als Regulatoren der PUMA Expression beschrieben (Zhang et al., 2009). In vorherigen Untersuchungen konnten in Schleimhautmelanomzellen eine erhöhte Expression der miR-221 und -222 detektiert werden, was eine Beteiligung dieser an der geringen und nicht induzierbaren PUMA Expression nahelegt (Marie Kristin Fritsche, 2019).

Die Rolle des Malariamedikaments Chloroquin bei der Behandlung des Melanoms wurde in der Literatur bereits diskutiert. Chloroquin hemmt den PUMA-Proteinabbau durch einen unbekanntem Mechanismus und erhöht so die Expression von PUMA. Bisher wurde die Wirkung von Chloroquin auf Schleimhautmelanome nicht erforscht (Marie Kristin Fritsche, 2019).

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob die miRNA-221 und -222 für die geringe und nicht durch Chemotherapie induzierbare PUMA-Expression ursächlich sind. Eine Hemmung ebenjener soll die Wiederherstellung der PUMA-Expression erwirken. Bisher wurde die funktionelle Bedeutung der miRNA-221 und -222 in einer Auswahl an Melanom- und Schleimhautmelanom Zellen nur durch einzelne Transfektion der miRNA Inhibitoren

untersucht. Eine Co-Transfektion beider miRNA Inhibitoren in allen vorliegenden Zellen soll deutlichere Ergebnisse liefern. Es soll für TU-MM 1, 3 und 4 gezeigt werden, dass durch eine Inhibition der miRNA-221 und -222 eine Stabilisierung der PUMA Proteinexpression herbeigeführt werden kann. Da Chloroquin außerdem über einen bislang nicht bekannten Mechanismus den PUMA Abbau in Melanomen hemmt, soll die Wirkung von Chloroquin zusätzlich untersucht werden. Dabei ist jedoch fraglich, ob die alleinige Wiederherstellung der PUMA Expression zur Induktion von Apoptose genügt, oder ob es einer weiteren Stimulation des Signalweges bedarf, um Apoptose zu induzieren.

Es kristallisieren sich drei Ansätze heraus, durch deren Stimulation eine erhöhte PUMA Expression möglich und die Induktion des Zelltodes erzielt werden soll. Zum einen die Hemmung des spezifischen PUMA Protein Abbaus mithilfe von Chloroquin, zum anderen die Induktion der PUMA Transkription durch eine p53 Induktion mit Cisplatin. Des Weiteren soll eine Hemmung des PUMA mRNA Abbaus durch miRNA-221 und -222 mithilfe von miRNA Inhibitoren erreicht werden.

Es soll gezeigt werden, dass mithilfe dieser drei Ansatzmöglichkeiten und der dadurch stabilisierten PUMA Proteinexpression in den untersuchten Zellen Apoptose eingeleitet werden kann.

Es soll untersucht werden ob die alleinige Inhibition der miRNA ausreichend für die Induktion der Apoptose ist, ein zusätzlicher Stimulus zur Induktion des Apoptosesignalweges von Nöten ist oder zusätzlich bzw. alleinig noch die Inhibition der Regulation auf Proteinebene notwendig ist.

4. Material und Methoden

4.1 Geräte

Blotapparatur	Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic	Bio-Rad Laboratories GmbH
Einfrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Scientific
Elektrophoreseapparatur (vertikal)	Mini-PROTEAN® 3 -Cell	Bio-Rad
Filmentwickler	ChemiDoc XRS+	Bio-Rad
Mikroskope	Mikroskop Leica DMI 6000B Leica DFC 425C	Leica Microsystems
Waage	Scaltec Rezeptureinwaage SBC21	Scaltec, Göttingen
Zentrifugen	5430R Rotor: FA - 45 - 30 – 11 F - 35 - 6 – 30 Universal 320R 5	Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg Hettich
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific
Thermocycler	CFX96™ C1000 Thermo Cyclers	Bio-Rad
Power Supply	Power Pac 300 Power Supply	Bio-Rad
Wasserbad	Typ 1003	GFL, Burgwedel
Sterilwerkbank	Hera safe KS	Thermo Scientific, Langenselbold
Wärmeschränke	CO2-Inkubator Hera Cell 150i Wärmeschränk	Thermo Scientific, Langenselbold Binder, Tuttlingen
	Absaugpumpe Vacuubrand LE2	Vacuubrand, Wertheim

Multiwell Reader	Multiscan™ FC Microplate Photometer	Thermo Scientific, Langensfeld
Pipetten	Peqette	PeqLab, Erlangen
pH-Messgerät	pH-Meter 766, Calimatic	Knick, Berlin
Mischgeräte	Magnetrührer RCT basic MS2 Minishaker Taumel-Rollenmischer	IKA Werke GmbH& Co. KG, Staufen IKA Werke GmbH& Co. KG, Staufen A. Hartenstein, Würzburg
Zellzähler	Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience LLC

4.2 Verbrauchsmaterialien

Petrischalen		Greiner Bio-One
Pipetten-Spitzen	1000µl, 100µl, 20µl, 10µl	Th. Geyer
PVDF Membran	Immobilon™-P membrane (0.45 µm) PVDF Western Blotting Membranes	Merck Millipore Roche Applied Science
Pasteurpipetten aus Glas		Brand
Serologische Pipetten	25ml, 10ml, 5ml	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße	0,2ml 0,5ml, 1,5ml und 2ml 15 und 50ml 96-well flat bottom Platte 96-well U-bottom Platte	Thermo Scientific, Peqlab Sarstedt, Eppendorf Greiner Bio-One Greiner Bio-One
Whatmann Papier		Carl Roth AG, Karlsruhe
Zellkultur Schalen	Cellstart® 100x20mm, und 6- & 24- well	Greiner Bio-One

4.3 Chemikalien

Acrylamidlösung (30%ig)	Roth
Ammoniumpersulfat	Serva
β -Mercaptoethanol	Merk
Bromphenolblau	Serva
Cell Lysis Buffer 10x	Cell Signaling Technology
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol 98% pa (EtOH)	Roth
Glycerin	Roth
Isopropanol (2-Propanol)	Roth
L-Glutamin	Life Technologies
Methanol 99,5%	Roth
Milchpulver (~1% Fett)	Biomol
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
N, N, N', n'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth
Penicillin-Streptomycin Lösung	Life Technologies
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Life Technologies
Salzsäure (HCl) 37%	Roth
Tris Base	Roth
Triton X-100	Roth
Tween 20	Roth
Bafilomycin A1	Santa Cruz BIOTECHNOLOGY
Cisplatin	Teva
Chloroquin	Bayer

4.4 Assays, Enzyme, Kits und Marker

Enzyme	Trypsin 0,5 %/EDTA (15400-054)	Life Technologies
HRP-Substrate	SignalFire™ ECL Reagent	Cell Signalling Technology
Marker	Prestained Protein Ladder (Pageruler)	Thermo Fisher Scientific
Medien	Gibco® Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
	Gibco® RPMI 1640	Life Technologies
	Opti-MEM® I Reduced Serum Media	Life Technologies
	Melanocyte Growth Medium M2	Promocell
	FCS (fetales Kälberserum)	Life Technologies
Transfektion	Lipofecamine™ RNAiMAX Transfection Reagent	Life Technologies
	mirVana™ miRNA Inhibitor, Negative Control #1	Life Technologies
	mirVana™ miRNA Inhibitor: hsa-miR-221-5p hsa-miR-222-5p	Life Technologies
Bestimmung Proteinkonzentration	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
	Quick Start Bovine Serum Albumin	Bio-Rad
Kits	MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid) Cell Proliferation Kit I	Roche

4.5 Software

Leica Application Suite LAS V4.7	Leica Microsystems
Windows Office 2016	Microsoft
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
ImageLab™ Software	Bio-Rad
Cellometer Auto Counter	Nexcelom Bioscience LLC
Skant Software	Thermo Fisher Scientific

4.6 Antikörper

4.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper (Klon)	Hersteller	Verdünnung	Verdünnungs- lösung
Maus Anti-Tubulin	Cell Signaling Technology (CST)	1: 5 000	Milch
Kaninchen Anti-GAPDH	CST	1: 1 000	BSA
Kaninchen Anti-Caspase 3 (8G10)	CST	1: 1 000	Milch
Kaninchen Anti-Caspase 9	CST	1: 1 000	Milch
Kaninchen Anti-Parp	CST	1: 1 000	Milch
Kaninchen Anti-p53Ser15	CST	1: 500	BSA
Kaninchen Anti-PUMA	CST	1: 2 000	Milch
Kaninchen Anti-Bax (D2E11)	CST	1: 2 000	Milch
Kaninchen Anti-Lc3A/B (D3U4C)	CST	1: 1 000	BSA

4.6.2 Sekundäre Antikörper

	Hersteller	Verdünnung	Verdünnungs- lösung
Anti-Maus HRP	CST	1: 10 000	Milch
Anti-Kaninchen HRP	CST	1: 5 000	Milch

4.7 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Die Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden in einer Sterilwerkbank unter Einhaltung der hygienischen Standards durchgeführt. Es wurden dabei ausschließlich sterile Puffer, Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterialien eingesetzt. Arbeitsflächen und alle verwendeten Materialien und Geräte wurden vor und nach dem Arbeiten mit Bacillol AF bzw. INCIDIN Active 3% gründlich desinfiziert, um keimfreies Arbeiten sicherzustellen. Die Hände wurden mit Soft-Man acute (B. Braun) desinfiziert.

4.7.1 Zellkulturmedien

Zelllinie	Mediumkomponenten	Arbeitskonzentration	Menge
NHEM	Melanocyte Growth Medium M2 (serum-free and PMA-free)		500ml
	10.000 IE Penicillin / 10.000 IE Streptomycin Stammlösung	1% / 1%	5ml
	Melanozyten Supplement-Mix M2		1 Mix
TU-MM 1, MEL-JUSO, IGR-37,	DMEM inkl. 4 mM L-Glutamin, 25mM Glucose, ohne Natriumpyruvat		500ml

SK-MEL 30, LN-229	10.000 IE Penicillin / 10.000 IE Streptomycin Stammlösung	1% / 1%	5ml
	200 mM L-Glutamin	1%	5ml
	Fötale Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	10%	50ml
TU-MM 3, TU-MM 4, SK-MEL 3, COLO-849	RPMI 1640 Grundmedium		500ml
	10.000 IE Penicillin / 10.000 IE Streptomycin Stammlösung	1% / 1%	5ml
	200 mM L-Glutamin	1%	5ml
	Fötale Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	10%	50ml

	Komponenten	Menge
Einfriermedium	FCS	2ml
	Dimethylsulfoxid (DMSO) 5%	0,1ml

4.7.2 Verwendete Zelllinien

Es wurden folgende Zelllinien bzw. Primärkulturen untersucht:

Zelllinie	Zelltyp	p53-Status	DSMZ-Nummer
MEL-JUSO	Kutanes Melanom	Wildtyp (Knopf et al., 2011)	ACC 74
IGR-37	Kutanes Melanom	Deletionsmutante, C229DelTG (Knopf et al., 2011)	ACC 237
COLO-849	Kutanes Melanom	Wildtyp (Knopf et al., 2011)	ACC 216

SK-MEL-30	Kutanes Melanom	Wildtyp (Knopf et al., 2011)	ACC 151
SK-MEL-3	Kutanes Melanom	Punktmutation, heterozygote Missense Mutation (R267W) (Knopf et al., 2011)	ACC 321
NHEM-c M2	Melanozyten	Wildtyp (Terzian et al., 2010)	C-10402
TU-MM 1	Schleimhautmelanom	Wildtyp (M. K. Fritsche et al., 2015)	Primärkultur
TU-MM 3	Schleimhautmelanom	Wildtyp (M. K. Fritsche et al., 2015)	Primärkultur
TU-MM 4	Schleimhautmelanom	Wildtyp (M. K. Fritsche et al., 2015)	Primärkultur
LN-229	Glioblastom	Punktmutation (P98L) (Trepel et al., 1998)	ATCC CRL-211

Die Kultivierung der untersuchten Zelllinien erfolgte im CO₂-Inkubator in 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit.

MEL-JUSO wurde aus dem Primärtumor eines malignen Melanoms einer 58-jährigen Frau isoliert. COLO-849 entstammt einer axillären Lymphknotenmetastase eines 43-jährigen Mannes mit malignem Melanom. Aus einer Lymphknotenmetastase eines 26-jährigen, am malignen Melanom erkrankten Mannes wurde die Zelllinie IGR-37 gewonnen. Die Zelllinie SK-MEL30 wurde aus einer subkutanen Metastase eines 67-jährigen Mannes gewonnen. Die Zelllinie SK-MEL3 stammt aus einer Lymphknotenmetastase einer Frau im Alter von 42 Jahren mit malignem Melanom. Die Zelllinien TU-MM 1, TU-MM 3 und TU-MM 4 stammen aus Tumorproben eines Schleimhautmelanoms. TU-MM 1 stammt aus der Tumorprobe eines 47-jährigen Mannes, TU-MM 3 wurde aus dem Tumor einer 86-jährigen Frau gewonnen und TU-MM 4 entstammt dem Tumor einer 72-jährigen Frau. Es wurden normale humane epidermale

Melanozyten (NHEM) von Promocell (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Als Kontrolle von Nicht-Melanom-Ursprung wurde LN-229, eine Glioblastom-Zelllinie einer 60-jährigen Frau, eingesetzt.

4.7.3 Auftauen, Einfrieren und Kultivierung

Das für die Zelllinien entsprechende Medium wurde im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt und 10ml davon in eine Zellkulturschale vorgelegt. Die Kryoröhrchen mit den gefrorenen Zellen wurden nach Entnahme aus dem Stickstofflagerbehälter kurz im Wasserbad auf 37°C erwärmt und angetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension aus dem Kryoröhrchen in die Kulturschale überführt, welche im Brutschrank kultiviert wurde. Für den nächsten Tag wurde ein Wechsel des Mediums angesetzt, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen.

Während des Kultivierungsprozesses wurden die Zellen gesplittet, bevor sie die stationäre Phase erreichten, um sie in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Je nach Konfluenz wurde regelmäßig ein Mediumwechsel oder eine Passage der Zelllinien vorgenommen. Zur Beurteilung der Konfluenz wurden die Zellen in den Kulturschalen unter dem Mikroskop betrachtet.

Beim Splitten der Zellen wurde zuerst das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen einmal kurz mit 3-4ml PBS gewaschen. Mit 2ml Tryp-LE erfolgte die Ablösung der Zellen für wenige Minuten im Brutschrank. Zu den abgelösten Zellen wurde 4ml frisches Medium gegeben und die Zellen resuspendiert. Anschließend wurde das gewünschte Volumen auf neue Kulturschalen verteilt und im Brutschrank weiterkultiviert.

Beim Mediumwechsel wurde bis zum Spülen mit PBS analog vorgegangen. Als nächstes wurden 10ml frisches Medium zu den Zellen gegeben und diese im Brutschrank weiterkultiviert.

Zum Einfrieren von Zellen wurde zunächst wie bei der Passagierung der Zellen bis zum Erhalt der trypsinierten Zellen vorgegangen. Diese wurden in 8ml Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch Abzentrifugieren bei 800g für 8 Min. pelletiert. Dieses wurde anschließend in dem bei RT angewärmten Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt, so dass $1-3 \times 10^6$ Zellen/ml in einem Volumen von 1 ml pro Ampulle eingefroren wurden. Dieses wurde für 24 Stunden bei -80°C im Einfrierbehälter eingefroren,

welcher ein schonendes Einfrieren durch Absenken der Temperatur um je 1°C pro min erlaubt. Die Langzeitaufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

4.7.4 miRNA-Inhibition

Für die Inhibition der miRNAs miR-221 und miR-222 wurden im 6-Well 200 000 Zellen ausgesät. Die Transfektion erfolgte am folgenden Tag. Nach Vorlegen von 1,2ml Medium in ein 6-Well wurden im Anschluss 300µl Transfektionsmix dazu gegeben. Für diesen Transfektionsmix wurden die Invitrogen™ *mirVana*™ miRNA Inhibitoren, sowie die *mirVana*™ miRNA Inhibitor Negativkontrolle Nr. 1 und Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) genutzt. Es wurden sowohl 3µl miRNA Inhibitor (30µM) in 150µl in OPTI-MEM (Invitrogen) als auch 9µl Lipofectamine in 150µl OPTI-MEM verdünnt. Nach Vermischen dieser Verdünnungen erfolgte die Inkubation für 10min bei RT (Raumtemperatur). Somit betrug die Endkonzentration der miRNA Inhibitoren im Well 60nM. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Inkubation im Brutschrank. Für das Wirkungsmaximum der miRNA Inhibition wurde eine Inkubationsdauer von 48 Stunden ermittelt.

4.7.5 Kristallviolett Färbung

Zur Zellzahlbestimmung von Monolayerkulturen, wurde die Methode der Kristallviolett Färbung angewendet. Es handelt sich dabei um einen basischen Farbstoff, der durch seine Bindung an die negativ geladenen Oberflächenmoleküle und Polysaccharide Zellen anfärbt. Die Zellmasse, welche proportional zur Zellzahl ist, kann somit bestimmt werden (Gillies, Didier, & Denton, 1986). Dafür wurden die Zellen in 24 Well-Platten als Tripletts ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen Chloroquin. Sieben Tage nach der Behandlung erfolgte die Proliferationsbestimmung mit der im Folgenden beschriebenen Methode. Es wurde das Medium aus den Wells abgesaugt, die Zellen 10min bei RT mit 4% Formaldehyd fixiert und im Anschluss mit Tritonlösung einmal und danach mit Aqua dest. zweimal gewaschen. Die Färbung erfolgte nach Zugabe von Kristallviolett Lösung für 10 Minuten bei RT. Es folgte dreimaliges Waschen mit Aqua dest. Mit 300µl 1% SDS-Lösung

wurden die Zellen circa 1 Stunde auf dem Rüttler lysiert. Nach der Lyse wurden jeweils 100µl der Lösung in 96-Well-Platten überführt und bei 595nm die Extinktion gemessen. Die dabei ausgewertete Menge des Farbstoffes korreliert proportional mit der Anzahl der vitalen Zellen. Zur Normalisierung wurde SDS-Lösung verwendet.

Formaldehydlösung	4% Formaldehyd in PBS
Tritonlösung	0,1% Triton in PBS
Kristalviolett-Lösung	0,04% Kristalviolett in 4%igem Ethanol in Aqua dest.
SDS-Lösung	1% SDS in Aqua dest.

4.7.6 MTT Test

Der MTT Test ist ein quantitativer kolorimetrischer Test., mit dessen Hilfe die Zellvermehrung vitaler Zellen durch ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden kann. Den Zellen wird der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zugegeben. Dieser wird von den Mitochondrien lebender Zellen zu violetter Formazan verstoffwechselt (Berridge & Tan, 1993). Verwendet wurde hierfür das MTT Cell Proliferation Kit I von Roche.

Für die Durchführung des MTT-Tests wurden die zu untersuchenden Zellen im 6-well transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erfolgte die Aufnahme der Zellen und die Aussaat in eine 96er-well flat bottom Platte mit 100µl Volumen pro Well. Nach weiterer Inkubation erfolgte die Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen in verschiedenen Konzentrationen. Für die Messung wurden die Zellen mit 10µl MTT-Reagenz pro Well versehen, sodass sich eine Konzentration dieser von 0,5mg/ml ergab. Im Anschluss folgte eine Inkubation im Brutschrank für 4 Stunden.

Nach der Inkubationsperiode wurden 100µl des Lösungspuffers hinzugefügt. Dieser löst während einer erneuten Inkubation über Nacht die Formazankristalle, die sich während der ersten Inkubationszeit bilden. Danach wurde die Extinktion im Multiwellreader (Thermo Fisher) bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen. So kann der violette Farbstoff quantifiziert und Rückschlüsse auf die Zahl der proliferierenden Zellen getroffen werden (Berridge & Tan, 1993).

4.8 Arbeiten mit Proteinen

4.8.1 Herstellen von Ganzzellextrakten aus eukaryotischen Zellen

Die Zellen einer 10 cm Schale wurden zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und im Anschluss in 500µl Lysepuffer mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Nach Überführung der gelösten Zellen in ein 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß erfolgte zunächst eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurde das Lysat bei 10 000g und 4°C 15min zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand zur Proteinbestimmung nach Bradford in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Lysepuffer	10x Cell Lysis Buffer in Aqua dest. auf 1x verdünnt 100mM PMSF
------------	---

4.8.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Tests nach Bradford bestimmt. Dieses kolorimetrische Verfahren basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau an Proteine. Zwischen dem anionischen Farbstoff sowie kationischen und nichtpolaren Seitenketten der Proteine kommt es dabei in saurem Milieu zur Bildung von Komplexen. Durch diese Bindung kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465nm zu einer Wellenlänge von 595nm. Anhand von Eichkurven lässt sich so die Proteinkonzentration in einer Lösung bestimmen (Bradford, 1976).

Für die quantitative Proteinbestimmung wurden 2µl Proteinlysate in 198µl PBS verdünnt und anschließend mit 200µl 0,001%iger Triton X-100 Lösung in PBS gemischt. Dieser Lösung wurden 600µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad) (1:4 in Aqua dest. verdünnt) hinzugesetzt. Zusätzlich wurde eine BSA- Verdünnungsreihe als Eichkurve angelegt. Hierfür wurden Proben mit 0µg, 2µg, 4µg, 6µg und 8µg BSA hergestellt. Entsprechend der benötigten Konzentration wurde die 0,2mg/ml Stocklösung in einem Endvolumen von 400µl in 0,001%-iger Triton X-100 Lösung in PBS verdünnt. Auch den Proben der Eichkurve wurden jeweils 600µl der Bradford-Reagenz zugegeben. Nach einer Inkubation über 5 Minuten wurden je 200µl der Proben in eine 96-Well U-Bottom Platte überführt. Die Extinktion wurde bei 595nm im Multiwellreader (Thermo

Fisher) gemessen. Mithilfe der mit der Eichkurve bestimmten Extinktionswerten konnte die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

4.8.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine unter denaturierten Bedingungen in Polyacrylamid-Gelen nach ihrem Molekulargewicht getrennt und anschließend mittels einer immunologischen Reaktion sichtbar gemacht. Erstbeschreiber dieser Methode des diskontinuierlichen SDS-Page war Laemmli (Laemmli, 1970). Dabei induziert Dithiothreitol (DTT) durch eine reduktive Spaltung der Disulfidbrücken die Auflösung der Quartärstruktur der Proteine. Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet als anionisches Detergens an die hydrophoben Teile der Proteine. Auf diese Weise wird eine Entfaltung der Moleküle herbeigeführt, sodass deren Eigenladung überdeckt wird. Dies ermöglicht den Proteinen unabhängig von ihrer Ladung in Richtung Anode zu wandern. Die Proteine wandern im elektrischen Feld reziprok proportional zum Logarithmus ihrer Molekülmasse, wobei sie zwei Polyacrylamid Gele mit unterschiedlichem pH-Wert passieren. Im ersten Gel, dem Sammelgel, werden die Proteine in einem schmalen Band gebündelt. Durch den Wandel des pH-Wertes im darauffolgenden Trenngel werden die Proteine aufgetrennt. Nach der Auftrennung im elektrischen Feld wird eine lineare Auftrennung der einzelnen Proteine in einem bestimmten Molekulargewichtsbereich bewirkt. Dies geschieht in Abhängigkeit vom Grad der Vernetzung der Polyacrylamidgele.

	Sammelgel (2ml)	Trenngel (5ml)			
		8%	10%	12%	15%
Aqua dest.	1,4µl	2,3ml	1,9ml	1,6ml	1,1ml
30% Acrylamidmix	330µl	1,3ml	1,7ml	2,0ml	2,5ml
1.5M Tris pH 8,8	-	1,3ml	1,3ml	1,3ml	1,3ml
1,5M Tris pH 6,8	250µl	-	-	-	-
10% SDS	20µl	50µl	50µl	50µl	50µl
10% APS	20µl	50µl	50µl	50µl	50µl
TEMED	2µl	4µl	4µl	4µl	4µl

Die Proteinlysate wurden mit 5x Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 10min denaturiert. Anschließend erfolgte mit der Tischzentrifuge ein kurzer Spin down der Proben, um so das bei der Denaturierung entstandene Kondenswasser am Reaktionsgefäßdeckel wieder nach unten zu befördern. 15µg Protein pro Probe wurden im Anschluss auf das Gel aufgetragen. Anfangs startete die Gelelektrophorese zunächst mit einer elektrischen Spannung von 80V für 30min, um die Konzentration der Proteine im Sammelgel in einem Band sicherzustellen. Anschließend wurde die Gelelektrophorese bis zu 120V fortgesetzt.

5x Ladepuffer	10% SDS 50% Glycerol 250mM DTT 0,05% Bromphenol-Blue mit Aqua dest. auf 10ml auffüllen, aliquotieren Lagerung bei -20 °C
10x SDS-Laufpuffer	250mM Tris 1,92M Glycine 1% SDS mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen, Lagerung bei RT

4.8.4 Western-Blot

Im Western Blot nach Renart (Renart, Reiser, & Stark, 1979) werden die Proteine, welche zuvor mit Hilfe des SDS-Page aufgetrennt wurden, zunächst auf eine Trägermembran übertragen. Anschließend werden diese mittels spezifisch bindender Antikörper detektiert.

In der hier verwendete Semi-Dry Blot Methode werden Proteine zwischen zwei horizontalen Plattenelektroden transferiert. Für das diskontinuierliche Puffersystem werden die Filterpapiere (Whatman-3MM Chromatographie Papier) mit Anodenpuffer I, Anodenpuffer II bzw. mit Kathodenpuffer durchfeuchtet. Um die PDVF (Polyvinylidenfluorid)-Membran zu aktivieren, wurde diese zunächst für ca. 5 min in 100%igem Methanol und im Anschluss in Anodenpuffer II inkubiert. Von der Anode aus beginnend wurde der Blot mit sechs von Anodenpuffer I durchfeuchteten Filterpapieren, drei von Anodenpuffer I durchfeuchteten Filterpapieren, der PVDF-Membran, Gel und neun von Kathodenpuffer durchfeuchteten Filterpapieren aufgebaut. Die Proteine wurden dann durch die Anlage eines zum Gel senkrecht gerichteten elektrischen Feldes in Richtung Anode auf die PVDF-Membran übertragen. Dies erfolgte für 1h 20min bei 250mA.

Anodenpuffer I	0,3M Tris 20% Methanol mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen, Lagerung bei RT
Anodenpuffer II	25mM Tris 20% Methanol mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen, Lagerung bei RT
Kathodenpuffer	25mM Tris 20% Methanol 40mM amino-n-caprioic-acid mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen, Lagerung bei RT

4.8.5 Immundetektion

Die Identifizierung der gesuchten Proteine ist mittels spezifischer Antikörper möglich. Diese Methode beruht auf der Affinität eines spezifischen Antikörpers (Primärantikörper) zu seinem Antigen (Protein). Die Visualisierung erfolgt schließlich mit Hilfe eines gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörpers, welcher an ein Enzym gekoppelt ist.

Zunächst erfolgte die Verdünnung der Primärantikörper in 5% Magermilchpulver (Biomol) in TBST oder in 5% BSA (Carl Roth) in TBST. Bei 4°C wurden anschließend die Membranen mit dem Primär-Antikörper über Nacht inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurden die Membranen dreimal 7min bei Raumtemperatur und durch Schwenken in TBST gewaschen. Die Inkubation der Sekundär-Antikörper vollzog sich ebenfalls bei 4°C über zwei Stunden. Anschließend wurden die Membranen erneut dreimal 7min bei Raumtemperatur und Schwenken in TBST gewaschen. Für die Nachweisreaktion wurde SignalFire™ Plus ECL Reagent (Cell Signaling Technology) genutzt. Anschließend wurde die Chemilumineszenz mit dem Imager (Bio-Rad) erfasst.

10x TBS	200 mM Tris 1,4 M NaCl auf pH 7,6 mit Essigsäure einstellen
1X TBST	1 x TBS 0,1 % Tween-20

5. Ergebnisse

5.1 Kutane Melanome

5.1.1 Chloroquin führt in hohen Dosen zu verminderter Proliferation von kutanen Melanomen

Zur Untersuchung der Wirkung von Chloroquin auf die Proliferation von kutanen Melanomen wurden die Zelllinien MEL-JUSO, COLO-849, IGR-37, SK-MEL 3 und SK-MEL 30 mit unterschiedlichen Konzentrationen Chloroquin behandelt und ihr Wachstumsverhalten mittels Kristallviolett Färbung dargestellt. Dem Vergleich diente das Proliferationsverhalten von NHEM und LN-229 bei gleichen Bedingungen.

Bei den untersuchten Melanom Zelllinien ist mit steigender Chloroquin Konzentration ein hemmender Einfluss auf die Proliferation sichtbar. Dennoch zeigen auch mit 50µM Chloroquin behandelte kutane Melanome weiterhin ein Überleben. MEL-JUSO, IGR-37 und SK-MEL 30 reagieren bereits ab Chloroquin Konzentrationen von 10µM einen deutlichen Abfall der Zellzahl (siehe Abb. 1 C, E, G), wohingegen COLO-849 und SK-MEL 3 erst ab 50µM mit einer gehemmten Proliferation reagieren. Dabei sind selbst bei Konzentrationen von 50µM Zellen nachweisbar (siehe Abb. 1 D, F). Bei LN-229 zeigt sich ein Rückgang der Zellzahl ab 25µM (siehe Abb. 1 A). NHEM zeigen bei Chloroquin Konzentrationen von 5µM ein geringeres Überleben gegenüber der Ausgangszellzahl, sowie verglichen mit allen kutanen Melanom Zelllinien bei der gleichen Behandlung. Bei Chloroquin Konzentrationen von 10µM und mehr sind kaum mehr lebende Zellen messbar (siehe Abb. 1 B). Insgesamt reagieren kutane Melanome sowie auch LN-229 deutlich weniger sensibel auf die Behandlung mit Chloroquin als NHEM.

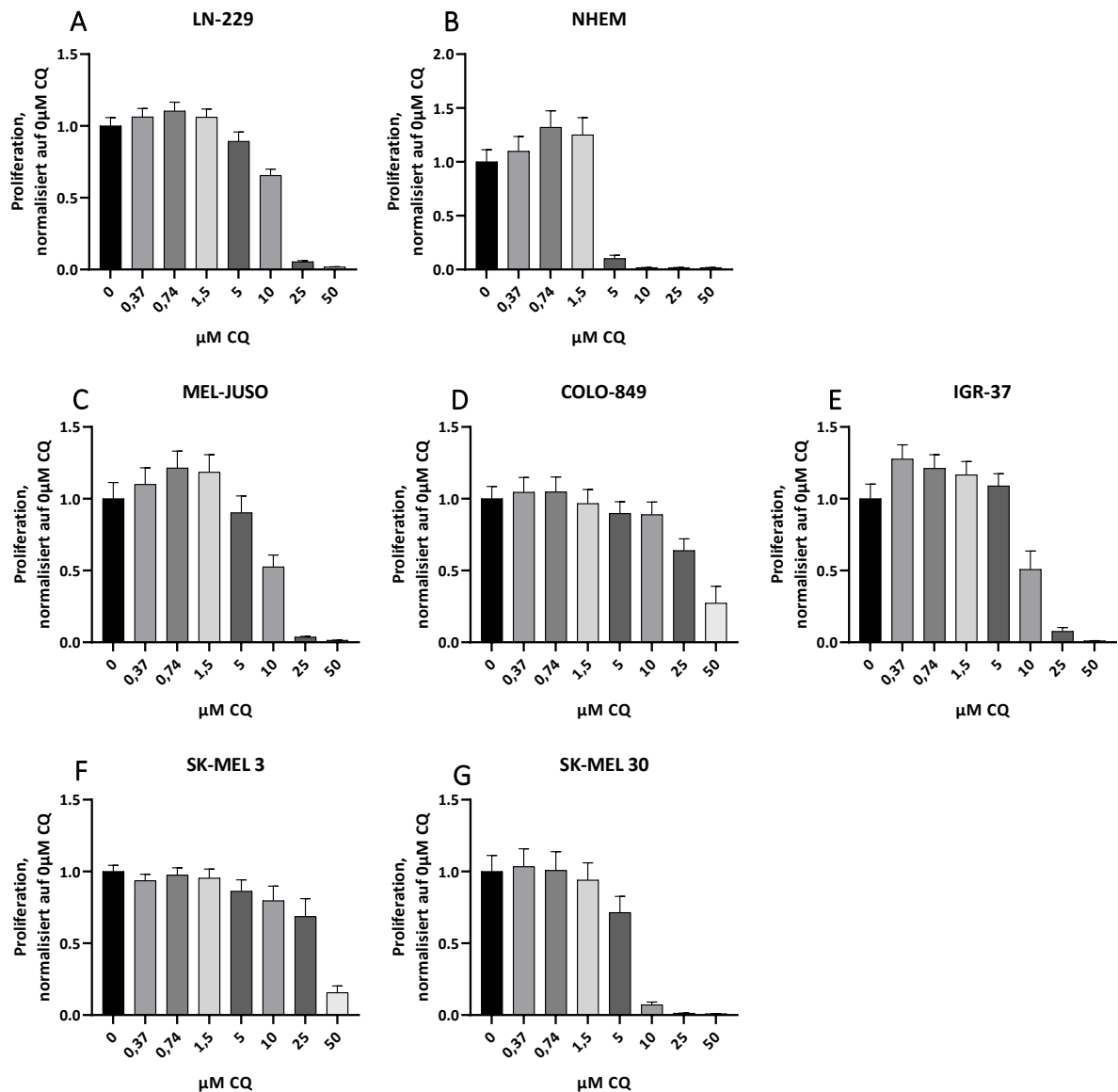


Abbildung 1: Chloroquin hemmt die Proliferation von kutanen Melanomen.

Für die Proliferationskurven wurden 50.000 Zellen der Zelllinien NHEM, LN-229, MEL-JUSO, COLO-849, IGR-37, SK-MEL 3, SK-MEL 30 pro Well einer 24-Well Platte ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit den entsprechenden Chloroquin Konzentrationen von 0,37µM bis 50µM behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach 7 Tagen erfolgte die Färbung mit Kristallviolett. Die Messung der Extinktion bei 595nm erfolgte mit einem Multiwellreader. Dargestellt ist die relative Zellzahl, ermittelt aus der Extinktion einer Vierfachbestimmung (bei NHEM und LN-229 einer Dreifachbestimmung), sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelten Proben der entsprechenden Zelllinie.

5.1.2 Chloroquin hemmt nicht den PUMA Protein Abbau in kutanen Melanomen

Chloroquin ist ein klassischer Wirkstoff aus der Gruppe der Malaria-mittel mit antiparasitärer und entzündungshemmender Wirkung. Es hat zudem eine alkalisierende Wirkung in den Lysosomen der Zellen und wirkt dadurch hemmend auf die Autophagie. Lakhter et. al. zeigten,

dass der Abbau von PUMA in Melanomen spezifisch durch Chloroquin in Konzentrationen von 25 und 50µM gehemmt werden kann. Es wurden dabei die kutanen Melanom Zelllinien SK-MEL23, MEL501, MELSK5, MEL526 und MEL624 untersucht. Dabei scheint die Inhibition des PUMA Abbaus vielmehr Chloroquin- als Autophagie-spezifisch zu sein (Lakhter et al., 2013). Bafilomycin wirkt ebenfalls als Inhibitor der Autophagie, indem es die V-Typ ATPase der Autophagosomen Membran inhibiert. Auf diese Weise wird die Verschmelzung von Autophagosom und Lysosom unterbunden, was sich durch eine Stabilisierung des Autophagie-Markers Lc3 II darstellen lässt (Mauvezin & Neufeld, 2015). Um eine Autophagie bedingte Änderung der PUMA Proteinexpression zu untersuchen soll die Wirkung von Chloroquin auf kutane Melanome untersucht werden.

Hierzu wurden die kutanen Melanom Zelllinien MEL-JUSO, COLO-849, IGR-37, SK-MEL 3 und SK-MEL 30 sowie die Kontrollzelllinie LN-229 und NHEM mit Chloroquin Konzentrationen von 25 und 50µM behandelt. Dem Vergleich diene eine Behandlung mit 30nM Bafilomycin, sowie mit 10µM Etoposid. Die Behandlung mit Etoposid als p53 Induktor diene der vergleichenden Darstellung einer möglichen Induktion der PUMA Transkription durch eine p53 Induktion.

COLO-849 zeigt nach Behandlung mit Chloroquin eine Erhöhung der PUMA Proteinexpression ohne gleichzeitig erhöhte p53 Expression. In der Zelllinie IGR 37, für welche eine p53 Deletionsmutation bekannt ist, ist p53 demnach nicht detektierbar. Es kommt nicht zur vermehrten Induktion von PUMA. In LN-229 zeigen sich nach Behandlung mit 50µM Chloroquin eine leicht erhöhte p53 und PUMA Proteinexpression.

In MEL-JUSO, COLO-849 und SK-MEL 3 sowie in LN-229 gelingt der Nachweis einer erhöhten p53 Proteinexpression nach Behandlung mit Etoposid, jedoch ohne erhöhte PUMA Proteinexpression. Ebenso zeigt sich in NHEM eine leicht erhöhte PUMA Expression nach Behandlung mit 50µM Chloroquin. Eine Induktion von p53 ist nicht nachweisbar.

In allen untersuchten Zelllinien bis auf MEL-JUSO zeigt sich bei Behandlung mit Bafilomycin eine Stabilisierung von LC3 II. Eine Behandlung mit Bafilomycin führt in keiner der untersuchten Zelllinien Veränderungen in der PUMA Expression. Bei Behandlung mit Chloroquin stellt sich in LN-229, NHEM, COLO-849, IGR-37 und SK-MEL 30 eine Stabilisierung von LC3 II dar.

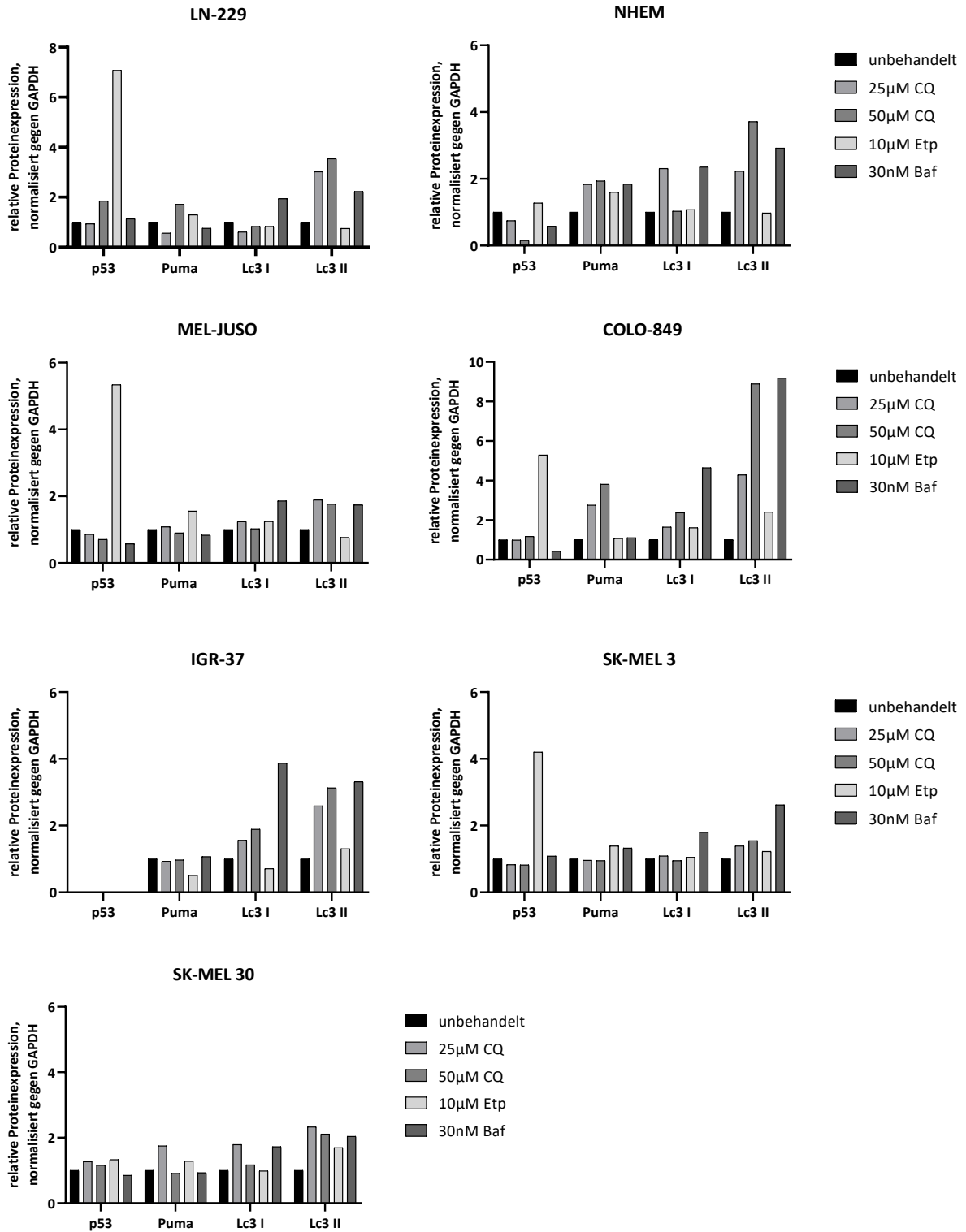


Abbildung 2: Die Behandlung mit Chloroquin zeigt keine Hemmung des PUMA Proteinabbaus in kutanen Melanomen.

Für die Untersuchung der Wirkung von Chloroquin auf die PUMA Proteinexpression in kutanen Melanomen wurden diese mit 25µM Chloroquin (25µM CQ), 50 µM Chloroquin (50µM CQ) für 24h behandelt oder unbehandelt (-) belassen. Zur Kontrolle diente die Behandlung mit 10µM Etoposid (10µM Etp) und 30nM Bafilomycin (30nM Baf). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Dargestellt ist die x-fache Über-/Herabregulation der Proteinexpression von PUMA, p53 und Lc3 gegenüber den unbehandelten Zellen.

5.1.3 Chloroquin zeigt in physiologischer Konzentration keine proliferationshemmende Wirkung in kutanen Melanomen.

Mzayek et. al untersuchten Blutplasmakonzentrationen von Chloroquin nach Gabe für die Behandlung der Malaria therapeutischer Dosen des Medikaments. Es wurden auf diese Weise Blutplasmakonzentrationen von ca. 1,3 – 5,2 μM bei einer Dosis von 600mg, bzw. 1,4 – 5,6 μM bei 1500mg Chloroquin gemessen (Mzayek et al., 2007), weshalb für folgenden Versuch eine mittlere Chloroquin Konzentration von 2,5 μM gewählt wurde. Diese wird im Folgenden als physiologische Chloroquin Konzentration bezeichnet und soll möglichst die Nebenwirkungen des Medikaments, wie unter anderem die sogenannte Chloroquin Retinopathie, welche bis zur Erblindung führen kann, vermeiden. Basierend auf Analysen der maximalen Blutplasmakonzentration von Cisplatin bei täglicher Gabe (Urien & Lokiec, 2004) wurde für den folgenden Versuch eine Konzentration von 8 μM Cisplatin gewählt, welche in dieser Arbeit als physiologische Cisplatin Konzentration bezeichnet wird.

Es soll überprüft werden, inwieweit Chloroquin und die dadurch mögliche erhöhte PUMA-Expression für die Hemmung der Proliferation genügen. In gleichem Zuge soll evaluiert werden, ob ergänzend zusätzliche Stimuli zur Induktion von Apoptose wie beispielsweise Cisplatin nötig sind. Dafür wurden kutane Melanome mit der physiologischen Chloroquin bzw. Cisplatin Konzentration behandelt. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Zell Viabilität mittels in Proliferationskurven visualisierten MTT-Assays zu verschiedenen Zeitpunkten. Zudem erfolgte eine Kombinationsbehandlung aus beiden Substanzen.

Es zeigt sich für alle untersuchten Zelllinien bis auf IGR-37 und SK-MEL 30 kein Unterschied in der Zellproliferation zwischen unbehandelten und mit Chloroquin behandelten Zellen. In den Zelllinien IGR-37 und SK-MEL 30 zeigen die mit Chloroquin behandelten Zellen verglichen mit den unbehandelten Zellen eine Wachstumshemmung.

Mit Chloroquin behandelte und unbehandelte Zellen der Linien MEL-JUSO und LN-229 zeigen bis zur Messung nach 72h ein kontinuierliches Wachstum der unbehandelten, sowie der mit Chloroquin behandelten Zellen, wobei sich nach 96 h ein Abfall der Zellzahl darstellt. Diese Wachstumsinhibition ist auf die räumliche Begrenzung des Zellwachstums nach Erreichen einer 100%-gen Konfluenz zurückzuführen. Eine ähnliche Wachstumsinhibition nach 72h ist bei den unbehandelten Zellen der Linien IGR-37 und SK-MEL 30 zu sehen.

Es erfolgte analog die Behandlung mit Cisplatin sowie eine Kombinationsbehandlung aus Chloroquin und Cisplatin, jeweils in physiologischer Konzentration. In allen untersuchten Zelllinien, sowohl bei der alleinigen Behandlung mit Cisplatin, als auch bei der Kombinationsbehandlung ist eine im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutliche Proliferationshemmung sichtbar. Lediglich LN-229 weist eine weniger deutliche Wachstumshemmung auf. Dabei fällt bei den Zelllinien COLO-849 und SK-MEL 3 auf, dass für die Proliferation der Zellen keinen Unterschied zwischen der alleinigen Cisplatin Behandlung und der zusätzlichen Chloroquin Gabe zu verzeichnen ist. Eine Proliferationshemmung in diesen Zelllinien zeigt sich allein durch die Wirkung von Cisplatin, zumal sich wie bereits beschrieben kein Unterschied in der Zellproliferation zwischen unbehandelten und mit Chloroquin behandelten Zellen zeigt. In den Zelllinien MEL-JUSO, IGR-37 und SK-MEL 30, auf deren Wachstum Chloroquin eine proliferationshemmende Wirkung hat, zeigt die Kombinationsbehandlung aus Cisplatin und Chloroquin verglichen mit der alleinigen Cisplatin Behandlung eine stärkere wachstumshemmende Wirkung. Insgesamt fällt auf, dass die proliferationshemmende Wirkung von Cisplatin allein stets deutlicher ausgeprägt ist als die Wachstumshemmung, welche durch Chloroquin erreicht werden kann. Die mit Chloroquin behandelten Melanozyten NHEM zeigen ein gehemmtes Wachstum im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Bezüglich der Sensitivität gegenüber Cisplatin zeigt sich bei NHEM ein gehemmtes Wachstum nach der Behandlung. Die Kombinationsbehandlung aus Cisplatin und Chloroquin verstärkt zudem die Wirkung der Proliferationshemmung bei NHEM.

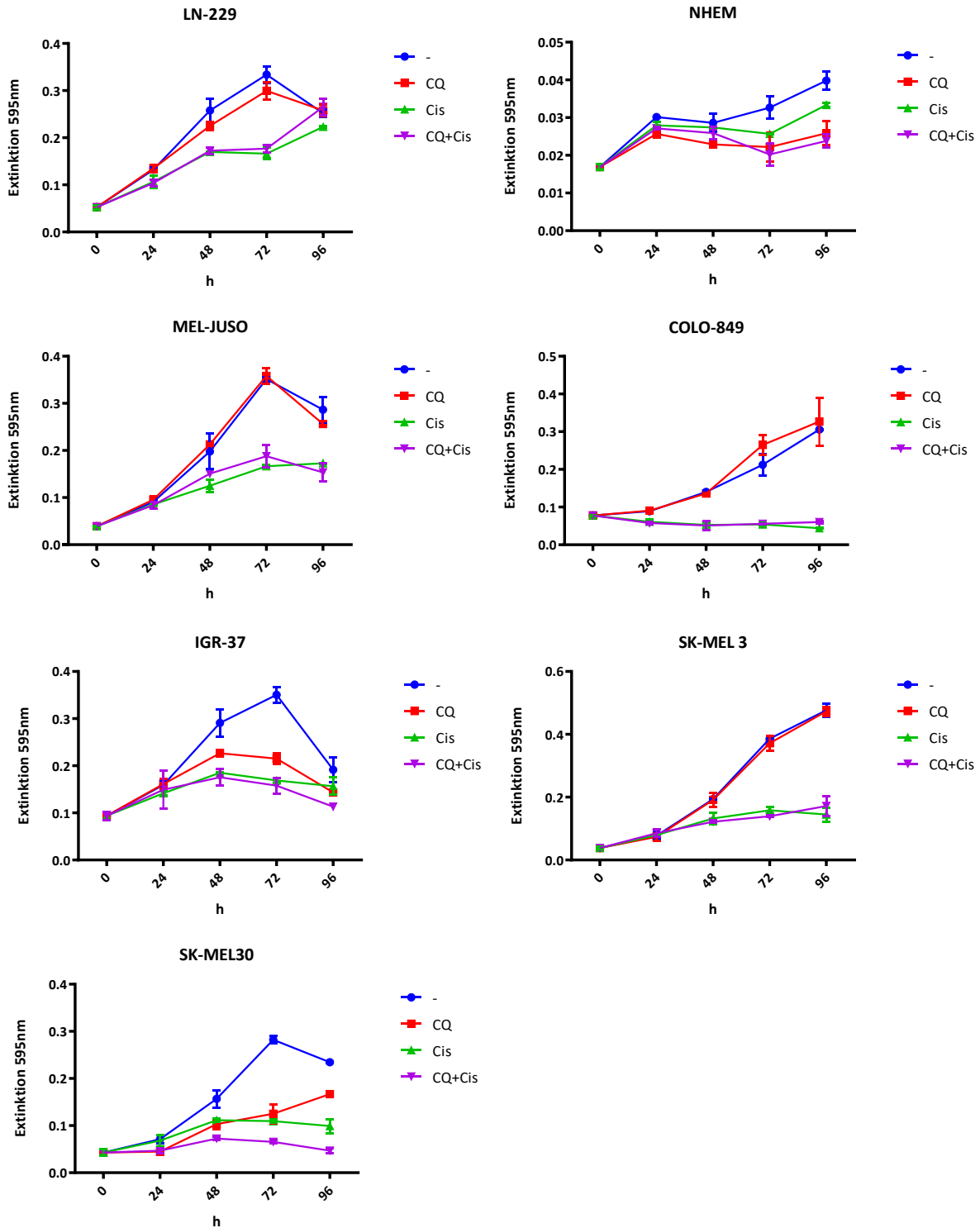


Abbildung 3: Die Behandlung mit 2,5µM Chloroquin zeigt keine proliferationshemmende Wirkung in kutanen Melanomen. Cisplatin in physiologischer Konzentration wirkt proliferationshemmend auf kutane Melanome. Für die Untersuchung der Wirkung von Chloroquin auf das Überleben der Zellen wurden kutane Melanome mit 2,5 µM Chloroquin (CQ) und bzw. oder mit 8µM Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. Für die Proliferationskurven wurden 4.000 Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. An Tag 0 wurden die Zellen mit Chloroquin und bzw. oder Cisplatin behandelt und zu diesem Zeitpunkt, als auch nach 24h, 48h, 72h und 96h nach Durchführen eines MTT-Assays die Extinktion bei 595nm gemessen. Dargestellt ist die Extinktion, ermittelt aus der Extinktion einer Zweifachbestimmung, sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

5.1.4 Die Inhibition der miRNA-221 und -222 führt nicht zur erhöhten PUMA Proteinexpression in kutanen Melanomen

In der Literatur wurde die für PUMA kodierende mRNA als Zielstruktur der miRNA-221 und miRNA-222 beschrieben (C. Zhang et al., 2010). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression dieser miRNAs im malignen Melanom erhöht ist und mit Progression der Melanome steigt (Felicetti et al., 2008). Die Expression eben dieser in MEL-JUSO scheint vergleichbar mit jener der Glioblastomzelllinie LN-229. NHEM, COLO-849, IGR-37, SK-MEL 3 und SK-MEL 30 weisen eine vergleichsweise niedrige miRNA-221 und -222 Expression auf (Marie Kristin Fritsche, 2019). Eine Induktion der PUMA Expression war bisher in NHEM, MEL-JUSO und LN-229 nicht sichtbar (Marie Kristin Fritsche, 2019).

Um zu beleuchten, inwiefern der miRNA und der Autophagie vermittelte PUMA Abbau zusammenwirken, wurde die PUMA Proteinexpression bei miRNA Inhibition und gleichzeitiger Behandlung mit Chloroquin im Western Blot untersucht. Des Weiteren wurde geprüft, ob es einen zusätzlichen Stimulus, wie in diesem Fall Cisplatin, zur Detektion einer erhöhten PUMA Expression bedarf. Da miRNA-221 und -222 in Glioblastomen an der Steuerung und Regulierung der PUMA Expression beteiligt sind (C. Zhang et al., 2010), wurde die Glioblastomzelllinie LN-229 als Kontrolle gewählt. Die Behandlung erfolgte mit physiologischen Chloroquin bzw. Cisplatin Konzentrationen, sowie mit Inhibitoren der miRNA-221 und -222.

In MEL-JUSO bewirken die Behandlungen mit miRNA Inhibitoren, Chloroquin und Cisplatin eine p53 Induktion. Sowohl bei der alleinigen miRNA Inhibition, als auch in der Kombinationsbehandlung mit Chloroquin lässt sich eine erhöhte PUMA Proteinexpression nachweisen, allerdings erzielt auch die Negativkontrolle eine erhöhte PUMA Expression. COLO-849 reagiert auf eine Inhibition der miRNA mit einem Anstieg der PUMA Expression, eine p53 Induktion zeigt sich nicht. Bei zusätzlicher Behandlung der transfizierten Zellen mit Chloroquin reagieren diese mit einer gesteigerten PUMA und p53 Expression. Eine zusätzliche Cisplatin Gabe führt zur p53 Induktion. Verglichen mit der Höhe der PUMA Proteinexpression in der Negativkontrolle kommt es durch eine zusätzliche Cisplatin Gabe jedoch nicht zur PUMA Induktion. Bezogen auf unbehandelte Zellen zeigt sich eine erhöhte PUMA Expression. IGR-37 zeigt bei keiner der Behandlungen weder eine induzierte Expression von p53, noch von PUMA. In SK-MEL 3 wird durch die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibitoren, Chloroquin und Cisplatin eine erhöhte p53 Expression sichtbar, eine PUMA Induktion stellt sich nicht dar. SK-

MEL 30 reagiert auf die miRNA Inhibition und die zusätzlichen Chloroquin und Cisplatin Gaben nicht mit einer p53 oder PUMA Induktion. In Zellen der Linie LN-229 führen eben jene Behandlungen zu einer p53 Induktion, eine PUMA Induktion zeigt sich nicht. Bei NHEM kann weder durch die Inhibition der miRNA-221 und -222, noch durch zusätzliche Chloroquin Behandlung eine p53 Induktion erwirkt werden. Erst nach Zugabe von Cisplatin kann in NHEM eine erhöhte p53 Expression beobachtet werden. Eine vermehrte PUMA Proteinexpression zeigt sich nach keiner der Behandlungen.

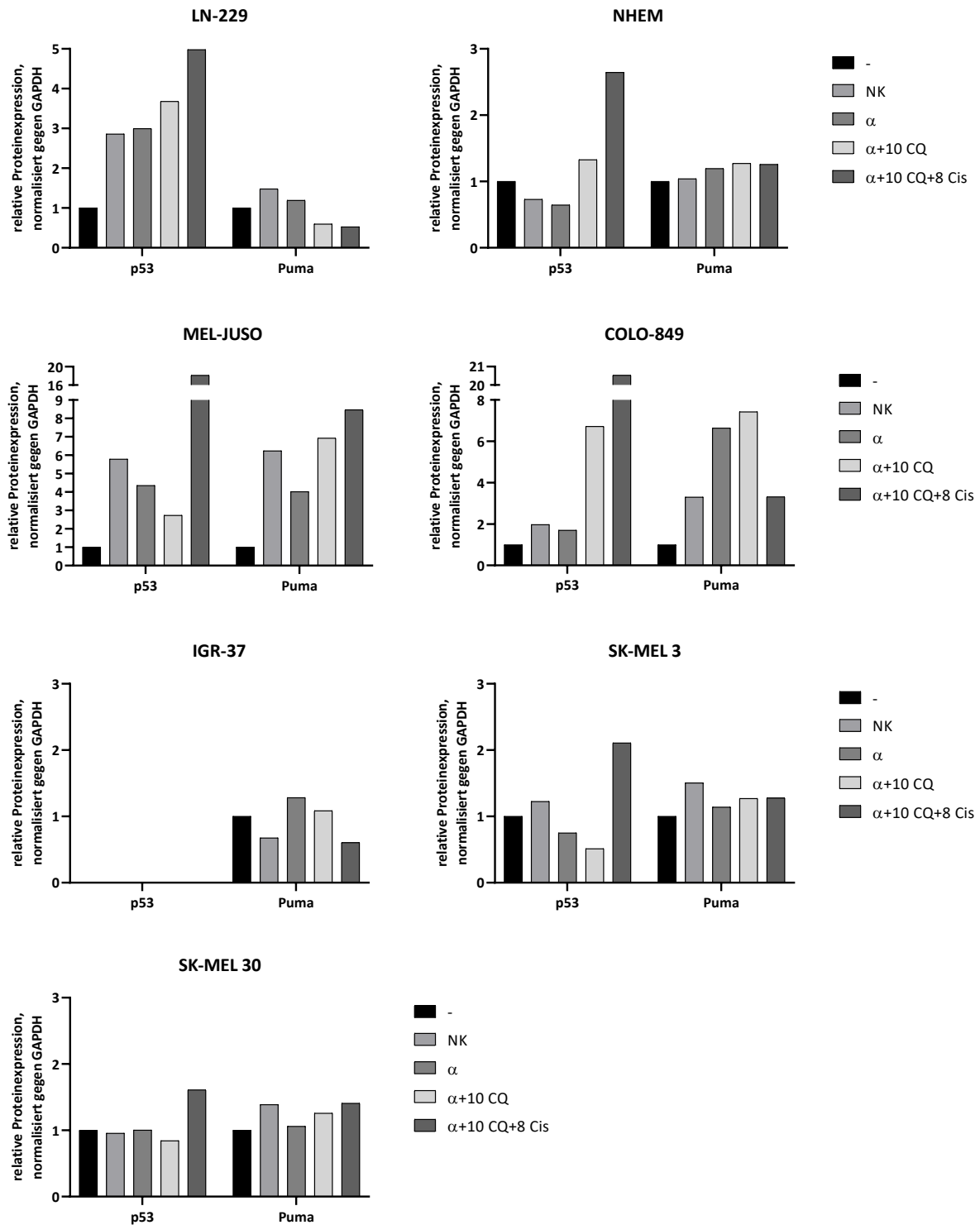


Abbildung 4: Die Inhibition der miRNA-221 und -222 führt nicht zur erhöhten PUMA Proteinexpression in kutanen Melanomen.

Der Einfluss der miRNAs auf die PUMA Proteinestabilität wurde untersucht, indem die Zellen mit mirVana™ miRNA Inhibitor transfiziert wurden. Es erfolgte die Inhibition der miRNA-221 und -222 (α), sowie die Behandlung transfizierter Zellen mit 10 μ M Chloroquin ($\alpha+10$ CQ) und mit 10 μ M Chloroquin und 8 μ M Cisplatin ($\alpha+10$ CQ+8 Cis). Der Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-), sowie mit einer Negativkontrolle (NK) transfizierte Zellen. 48h nach Transfektion, sowie weiteren 24h nach Behandlung mit CQ und Cis erfolgte die Proteinisolierung und der Nachweis von PUMA im Western Blot. Die Proteinexpression wurde gegen GAPDH normalisiert. Dargestellt ist die x-fache Über-/Herabregulation der Proteinexpression von PUMA und p53.

5.1.5 Eine Inhibition der miRNA-221 und 222 zeigt keine proliferationshemmende Wirkung in kutanen Melanomen

Zur Untersuchung der Wirkung einer Inhibition der miRNA-221 und -222 auf das Proliferationsverhalten in kutanen Melanomen erfolgte die Inhibition ebenjener. Anschließend wurde in Proliferationskurven das Wachstum der Zellen dargestellt.

Bei den Zelllinien COLO-849, IGR-37, SK-MEL 3 und SK-MEL 30 zeigt sich kein Unterschied in der Zellproliferation zwischen unbehandelten und transfizierten Zellen. MEL-JUSO reagiert als einzige kutane Melanom Zelllinie mit einer Inhibition des Wachstums nach miRNA Inhibition nach 72h. Nach 96h zeigt sich ein Abfall der Zellzahl der unbehandelten Zellen und der Negativkontrolle, während die miRNA inhibierten Zellen ein weiteres Wachstum zeigen. Die Kontrollzelllinie LN-229 zeigt ein ähnliches Wachstumsverhalten wie MEL-JUSO. Bei NHEM fällt die zu Beginn der Messung bereits im Vergleich zur Negativkontrolle und den unbehandelten Zellen verringerte Zellzahl an transfizierten Zellen auf. Nach 96h zeigen sich mehr unbehandelte und mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen als bei Behandlung mit miRNA Inhibitoren. Die Negativkontrolle nimmt dabei, verglichen mit den unbehandelten Melanozyten, keinen Einfluss auf deren Proliferationsverhalten.

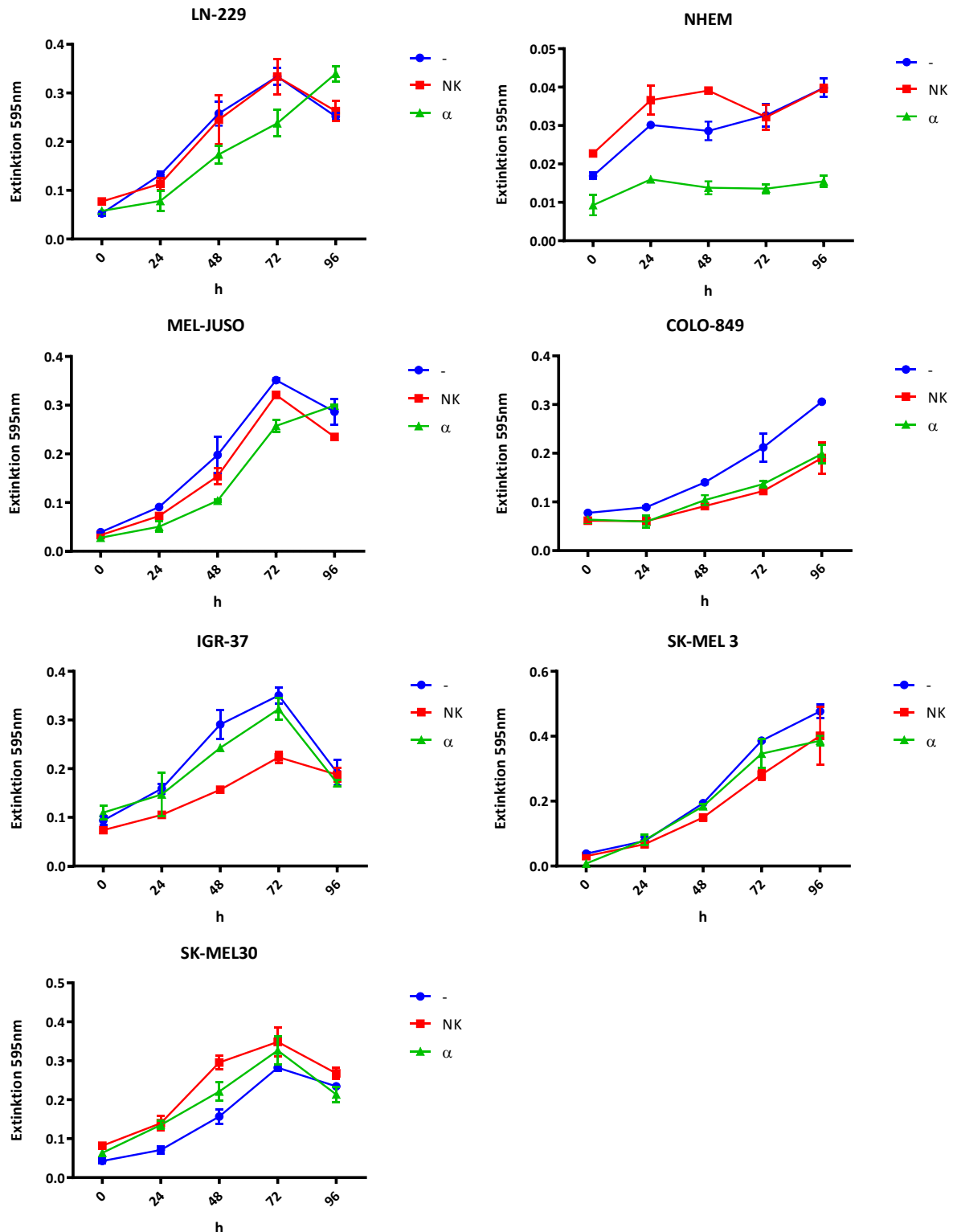


Abbildung 5: Die Inhibition der miRNA-221 und 222 hat keine proliferationshemmende Wirkung in kutanen Melanomen.

Für die Untersuchung der Wirkung einer Inhibition der miRNA-221 und -222 auf das Überleben der Zellen wurden kutane Melanome mit mirVana™ miRNA Inhibitor transfiziert (α) oder unbehandelt (-) gelassen. Als Kontrolle dienten mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen (NK). Für die Proliferationskurven wurden 4.000 unbehandelte bzw. bereits transfizierte Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. An Tag 0 wurde, sowie auch nach 24h, 48h, 72h und 96h nach Durchführen eines MTT-Assays die Extinktion bei 595nm gemessen. Dargestellt ist die Extinktion, ermittelt aus der Extinktion einer Zweifachbestimmung, sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

5.1.6 Die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibitoren mit Chloroquin und Cisplatin bringt keine zusätzliche Proliferationshemmung gegenüber der Behandlung aus Chloroquin und Cisplatin in kutanen Melanomen

Es erfolgte die Untersuchung, inwieweit eine Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibition mit Hemmung des PUMA spezifischen Proteinabbaus und p53 induzierter PUMA Expression durch Cisplatin in kutanen Melanomen Apoptose einleitet. Hierzu erfolgte zunächst die Transfektion mit miRNA Inhibitoren. Zusätzlich wurden die transfizierten Zellen mit Chloroquin und Cisplatin in physiologischen Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde in Proliferationskurven das Wachstum der Zellen dargestellt.

In COLO-849, IGR-37, SK-MEL 3 und SK-MEL 30 zeigt die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibition, Chloroquin und Cisplatin verglichen mit der unbehandelten Kontrolle eine deutliche Proliferationshemmung. Vergleichend mit der Behandlung aus Chloroquin und Cisplatin ohne miRNA Inhibition zeigt sich kein Unterschied im Wachstumsverhalten. Die zusätzliche miRNA Inhibition bringt keinen additiven proliferationshemmenden Effekt. MEL-JUSO reagiert mit einer Proliferationshemmung bei Behandlung mit Cisplatin und Chloroquin. Der wachstumshemmende Effekt wird durch zusätzliche Inhibition der miRNA-221 und -222 verstärkt. In LN-229 ist ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Auch hier bringt die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibitoren, Chloroquin und Cisplatin in der Proliferationshemmung einen stärkeren Effekt als Chloroquin und Cisplatin ohne miRNA Inhibition. Bei NHEM fällt die zu Beginn der Messung bereits im Vergleich zu den anderen Behandlungen verringerte Zellzahl an transfizierten und mit Chloroquin und Cisplatin behandelten Zellen auf. Nach 96h ist die Zahl der unbehandelten Zellen höher als die Anzahl an Zellen, welche mit Chloroquin, Cisplatin oder miRNA-Inhibitoren behandelt wurden. Der stärkste Effekt auf das Proliferationsverhalten der Melanozyten ist nach der Dreifachkombination mit Chloroquin, Cisplatin und miRNA-Inhibitoren zu beobachten. Hier zeigt sich nach 96h keine Vermehrung der Zellzahl, wohingegen unbehandelte Melanozyten ein ungehemmtes Proliferationsverhalten zeigen.

Mit Chloroquin und Cisplatin behandelte Zellen der Linien MEL-JUSO und IGR-37 zeigen bis zur Messung nach 72h ein kontinuierliches Wachstum, wobei sich nach 96 h ein Abfall der Zellzahl darstellt.

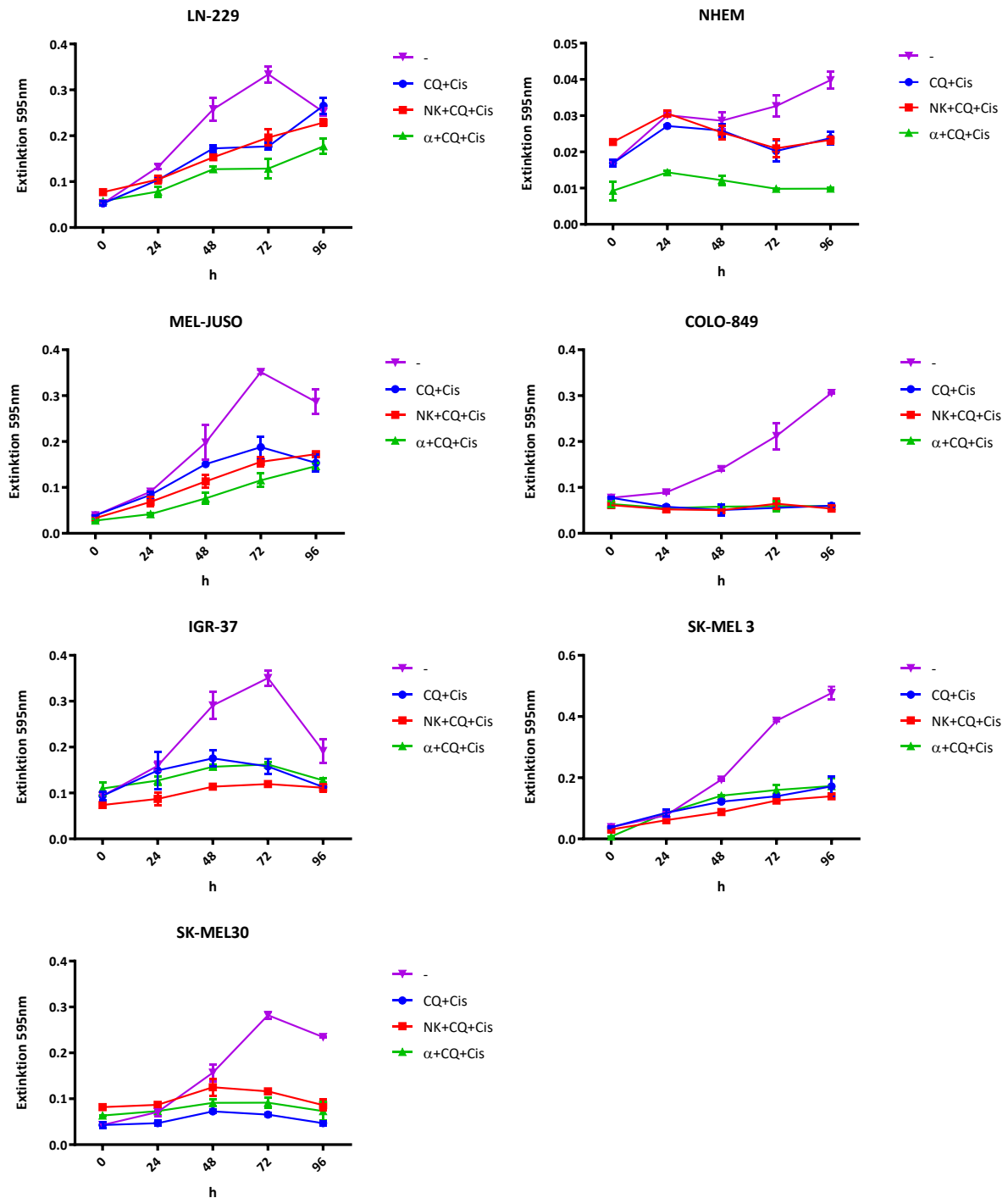


Abbildung 6: Die Inhibition der miRNA-221 und 222 mit gleichzeitiger Behandlung mit Chloroquin und Cisplatin zeigt eine proliferationshemmende Wirkung in kutanen Melanomen, jedoch ist der Effekt nicht größer als bei einer alleinigen CQ und Cis Behandlung.

Für die Untersuchung der Wirkung einer Inhibition der miRNA-221 und -222 auf das Überleben der Zellen wurden kutane Melanome mit mirVana™ miRNA Inhibitor transfiziert und zusätzlich mit 2,5 µM Chloroquin und 8 µM Cisplatin (α+CQ+Cis) behandelt. Als Kontrolle dienten mit einer Negativkontrolle transfizierte und mit 2,5 µM Chloroquin und 8 µM Cisplatin behandelte Zellen (NK+CQ+Cis), sowie nur mit 2,5 µM Chloroquin und 8 µM Cisplatin behandelte (CQ+Cis) Zellen. Für die Proliferationskurven wurden 4.000 unbehandelte bzw. bereits transfizierte Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. An Tag 0 wurden die Zellen mit Chloroquin und Cisplatin behandelt und zu diesem Zeitpunkt, sowie auch nach 24h, 48h, 72h und 96h nach Durchführen eines MTT-Assays die Extinktion bei 595nm gemessen. Dargestellt ist die Extinktion, ermittelt aus der Extinktion einer Zweifachbestimmung, sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

5.2 Schleimhautmelanome

5.2.1 Chloroquin führt in hohen Dosen zu verminderter Proliferation von Schleimhautmelanomen

Zur Untersuchung der Wirkung von Chloroquin auf die Proliferation von Schleimhautmelanomen wurden TU-MM 1, 3 und 4 (im Folgenden bezeichnet als die Gruppe der Schleimhautmelanome) mit unterschiedlichen Konzentrationen Chloroquin behandelt und ihr Wachstumsverhalten mittels Kristallviolett Färbung dargestellt und mit NHEM und LN-229 verglichen.

Schleimhautmelanome reagieren deutlich weniger sensibel auf die Behandlung mit Chloroquin als NHEM und LN-229. Es sind selbst bei hohen Konzentrationen bis 50µM Chloroquin Zellen nachweisbar, wenngleich die Behandlung mit steigender Konzentration einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation hat. Auch mit 50µM Chloroquin behandelte Schleimhautmelanome zeigen weiterhin ein Überleben, jedoch zeigen sie im Vergleich zu kutanen Melanomen ein geringeres Ansprechen auf Chloroquin. TU-MM 1 reagiert, verglichen mit TU-MM 3 und 4 deutlich sensibler, bei einer Konzentration von 25µM mit einer Proliferationshemmung. TU-MM 3 und 4 zeigen erst ab 50µM Chloroquin ein gehemmtes Wachstum.

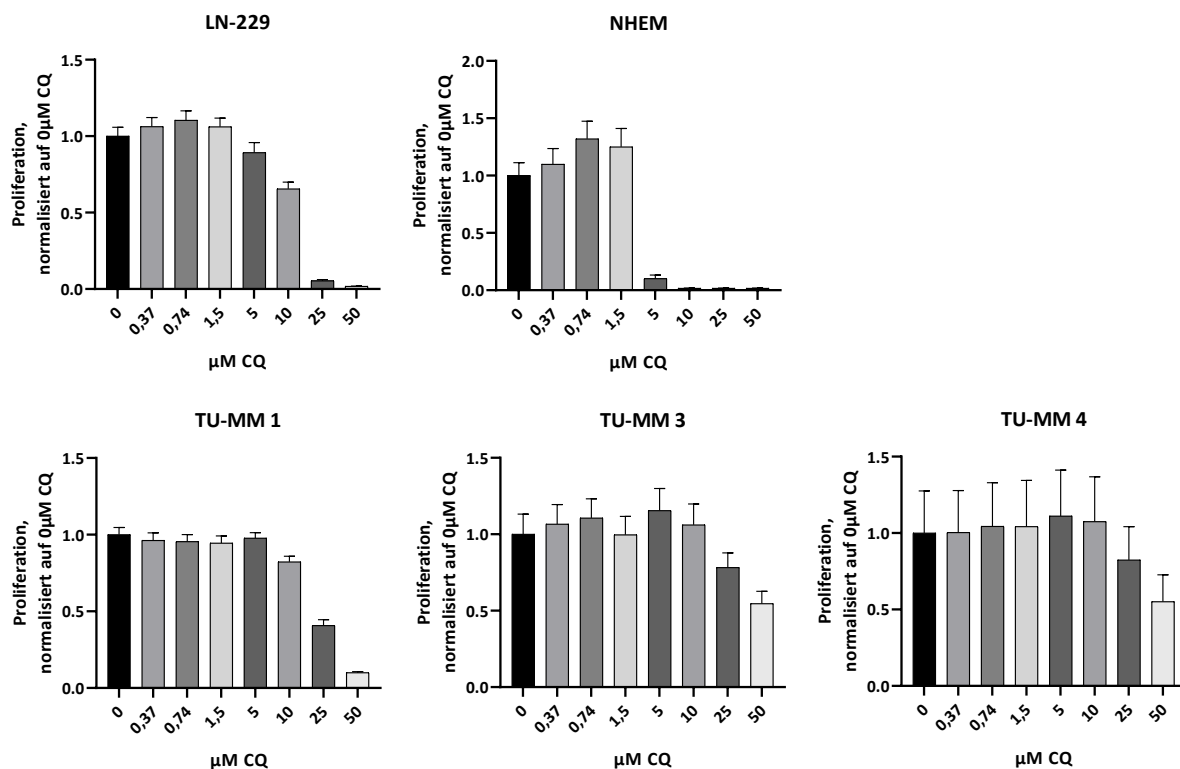


Abbildung 7: Chloroquin hemmt die Proliferation von Schleimhautmelanomen.

Für die Proliferationskurven wurden 50.000 Zellen der Zelllinien NHEM, LN-229, TU-MM 1, TU-MM 3 und TU-MM 4 pro Well einer 24-Well Platte ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit den entsprechenden Chloroquin Konzentrationen von 0,37µM bis 50µM behandelt oder unbehandelt belassen. Nach 7 Tagen erfolgte die Färbung mit Kristallviolett. Die Messung der Extinktion bei 595nm erfolgte mit einem Multiwellreader. Dargestellt ist die relative Zellzahl, ermittelt aus der Extinktion einer Dreifachbestimmung (bei NHEM einer Zweifachbestimmung), sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelten Proben der entsprechenden Zelllinie. Die wiederholte Darstellung von NHEM und LN-229 (siehe Abb. 1) dient dem Vergleich.

5.2.2 Chloroquin hemmt den PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen

Da die Wirkung von Chloroquin auf Schleimhautmelanome bislang nicht überprüft wurde, soll durch die Behandlung von Schleimhautmelanomen mit Chloroquin eine Autophagie bedingte Änderung der PUMA Proteinexpression untersucht werden. Hierzu wurden Zellen der Primärkulturen TU-MM 1, TU-MM 3 und TU-MM 4 sowie als Kontrollzelllinie NHEM und LN-229 mit Chloroquin Konzentrationen von 25 und 50µM behandelt. Dem Vergleich diene auch hier wie in 5.1.2 eine Behandlung mit 30nM Bafilomycin als Autophagie Inhibitor sowie mit 10µM Etoposid als p53 Induktor.

In TU-MM 1 können bei Behandlung mit Etoposid eine erhöhte p53 Expression sowie eine PUMA Induktion gezeigt werden. Eine Behandlung mit Chloroquin zeigt bereits bei Konzentrationen von 25µM deutlich erhöhte PUMA Spiegel ohne gleichzeitiger p53 Induktion

bei Behandlung mit 25µM Chloroquin. Diese p53 unabhängige Erhöhung der PUMA Proteinexpression gelingt durch Chloroquin, nicht jedoch durch Bafilomycin. Durch die Behandlung mit Bafilomycin gelingt keine PUMA Induktion. Bei einer Konzentration von 50µM Chloroquin ist neben der erhöhten PUMA Expression auch eine Induktion von p53 sichtbar. Ähnliches kann bei TU-MM 3 beobachtet werden. Allerdings wird hier im Gegensatz zu TU-MM 1 nach Behandlung mit Etoposid zwar vermehrt p53 in den Zellen, nicht jedoch PUMA messbar. Bei hohen Chloroquin Konzentrationen ist keine p53 Induktion sichtbar, wohingegen sich eine leicht erhöhte PUMA Proteinexpression nachweisen lässt. In Bafilomycin behandelten Zellen zeigt sich eine leichte Induktion von p53 und PUMA. Anders verhalten sich Zellen der Zelllinie TU-MM 4. Hier induziert lediglich die Behandlung mit Etoposid erhöhte p53 Spiegel, jedoch erbringt keine der Behandlungen eine Auswirkung auf die PUMA Proteinlevel. In allen untersuchten Zellen zeigt sich sowohl bei Behandlung mit Chloroquin, als auch mit Bafilomycin eine Stabilisierung des Autophagie Inhibitors LC3 II.

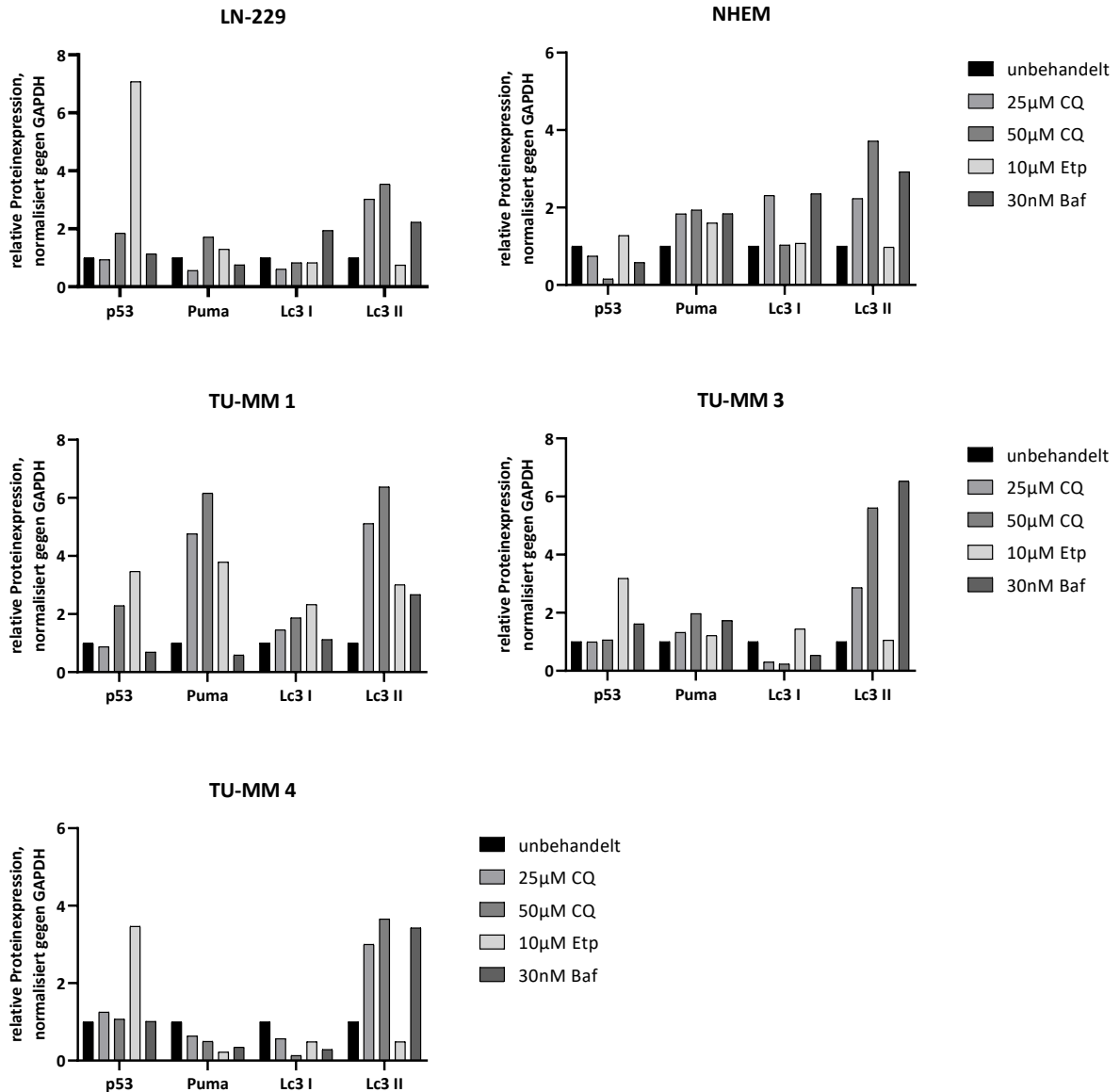


Abbildung 8: Die Behandlung mit Chloroquin führt zur erhöhten PUMA Protein Expression in Schleimhautmelanomen.

Für die Untersuchung der Wirkung von Chloroquin auf die PUMA Proteinexpression in Schleimhautmelanomen wurden diese mit 25µM Chloroquin (25µM CQ), 50 µM Chloroquin (50µM CQ) für 24h behandelt oder unbehandelt belassen. Zur Kontrolle diente die Behandlung mit 10µM Etoposid (10µM Etp) und 30nM Bafilomycin (30nM Baf). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Dargestellt ist die x-fache Über-/Herabregulation der Proteinexpression von PUMA, p53 und Lc3 und gegenüber den unbehandelten Zellen. Die wiederholte Darstellung von NHEM und LN-229 (siehe Abb.2) dient dem Vergleich.

5.2.3 Chloroquin zeigt in physiologischer Konzentration keine proliferationshemmende Wirkung in Schleimhautmelanomen

Vergleichend zu den kutanen Melanomen soll geprüft werden, inwiefern bei Schleimhautmelanomen eine Behandlung mit Chloroquin in Kombination mit einem zusätzlichen Stimulus eine Induktion der PUMA Expression und Hemmung der Proliferation bewirkt. Dafür wurden Schleimhautmelanome analog zu den kutanen Melanomen mit der physiologischen Chloroquin bzw. Cisplatin Konzentration behandelt. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Zell Viabilität mittels in Proliferationskurven visualisierten MTT-Assays zu verschiedenen Zeitpunkten. Zudem erfolgte eine Kombinationsbehandlung aus beiden Substanzen.

Die mit Chloroquin behandelten Zellen der Primärkultur TU-MM 3 zeigen ein gehemmttes Wachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Chloroquin hat auf die Proliferation bei TU-MM 1 und TU-MM 4 keine hemmende Wirkung. Bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Cisplatin zeigt sich bei TU-MM 3 ein gehemmttes Wachstum nach Behandlung. Die Kombinationsbehandlung hat keinen zusätzlichen Effekt gegenüber der alleinigen Cisplatin Behandlung. TU-MM 1 zeigt sich hinsichtlich des Zellwachstums gegenüber keiner Behandlung sensibel. Die Behandlung mit Chloroquin sowie die Kombinationsbehandlung haben im Vergleich mit den unbehandelten Zellen keine proliferationshemmende Wirkung. TU-MM 4 reagiert weder auf Chloroquin, noch auf Cisplatin mit einer verringerten Proliferation.

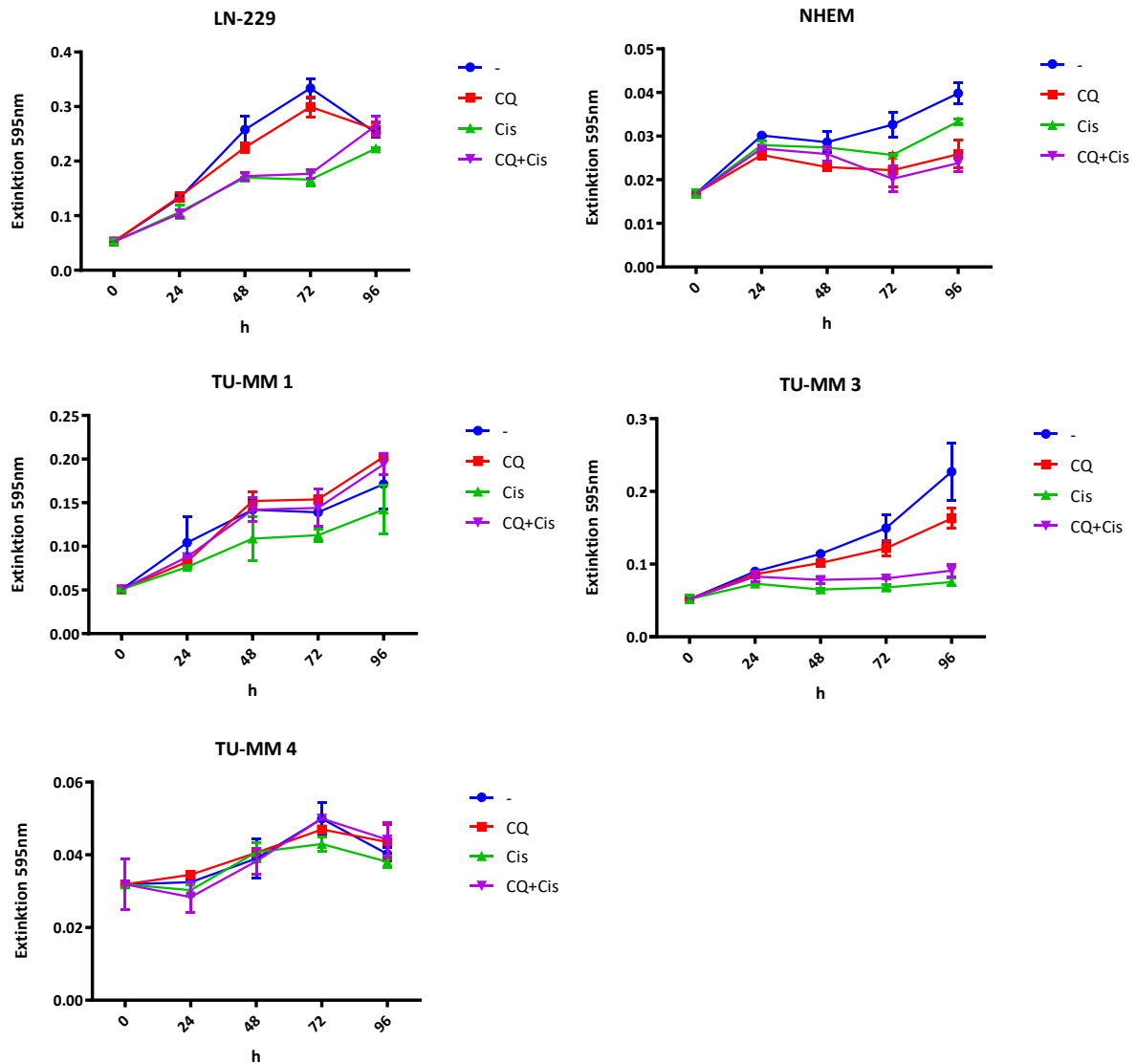


Abbildung 9: Die Behandlung mit 2,5 μ M Chloroquin hat keine proliferationshemmende Wirkung in Schleimhautmelanomen.

Für die Untersuchung der Wirkung von Chloroquin auf das Überleben der Zellen wurden Schleimhautmelanome mit 2,5 μ M Chloroquin (CQ) und bzw. oder mit 8 μ M Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. Für die Proliferationskurven wurden 4.000 Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. An Tag 0 wurden die Zellen mit Chloroquin und bzw. oder Cisplatin behandelt und zu diesem Zeitpunkt, als auch nach 24h, 48h, 72h und 96h nach Durchführen eines MTT-Assays die Extinktion bei 595nm gemessen. Dargestellt ist die Extinktion, ermittelt aus der Extinktion einer Zweifachbestimmung, sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. Die wiederholte Darstellung von NHEM und LN-229 (siehe Abb. 3) dient dem Vergleich.

5.2.4 Die Inhibition der miRNA-221 und -222 führt zur erhöhten PUMA Proteinexpression in Schleimhautmelanomen

Untersuchungen zur Expression der miRNA-221 und -222 in Schleimhautmelanomen zeigen eine deutlich erhöhte Expression in TU-MM1, TU-MM3 und TU-MM4. Kutane Melanome weisen eine vergleichsweise niedrige miRNA-221 und -222 Expression auf (Marie Kristin Fritsche, 2019). Zudem konnte nach Inhibition der miRNA-221 und -222 in TU-MM 1 eine Induktion der PUMA Expression beobachtet werden (Marie Kristin Fritsche, 2019).

Um zu überprüfen, inwiefern der miRNA und der Autophagie vermittelte PUMA Abbau zusammenspielen, wurde analog zum Vorgehen bei der Untersuchung von kutanen Melanomen die PUMA Proteinexpression bei miRNA Inhibition und gleichzeitiger Behandlung mit Chloroquin untersucht. Des Weiteren wurde geprüft, ob es einen zusätzlichen Stimulus, wie in diesem Fall Cisplatin, zur Induktion der PUMA Expression bedarf. Die Behandlung erfolgte mit physiologischen Chloroquin bzw. Cisplatin Konzentrationen, sowie mit Inhibitoren der miRNA-221 und -222.

TU-MM 1 reagiert auf die Inhibition der miRNA mit einem Anstieg der PUMA Expression mit gleichzeitig leichter p53 Induktion. Bei zusätzlicher Behandlung der transfizierten Zellen mit Chloroquin reagieren diese mit einer gesteigerten PUMA und p53 Expression. Eine zusätzliche Cisplatin Gabe führt zur deutlich vermehrten p53 Expression. Verglichen mit der Höhe der PUMA Proteinexpression in den transfizierten und mit Chloroquin behandelten Zellen kommt es durch eine zusätzliche Cisplatin Gabe nicht zur weiteren Erhöhung der PUMA Expression. Bei TU-MM 3 zeigen mit miRNA Inhibitoren transfizierte Zellen eine erhöhte PUMA Proteininduktion ohne Anstieg von p53. Bei zusätzlicher Behandlung mit Chloroquin reagieren TU-MM 3 mit einer weiter gesteigerten PUMA Expression. Gleichzeitig zeigt sich eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte p53 Proteinexpression. Die zusätzliche Behandlung mit Cisplatin führt zu einer weiteren Steigerung der PUMA und p53 Expression. TU-MM 4 zeigt bei keiner der Behandlungen eine Expression von p53 sowie keine erhöhte PUMA Proteinexpression.

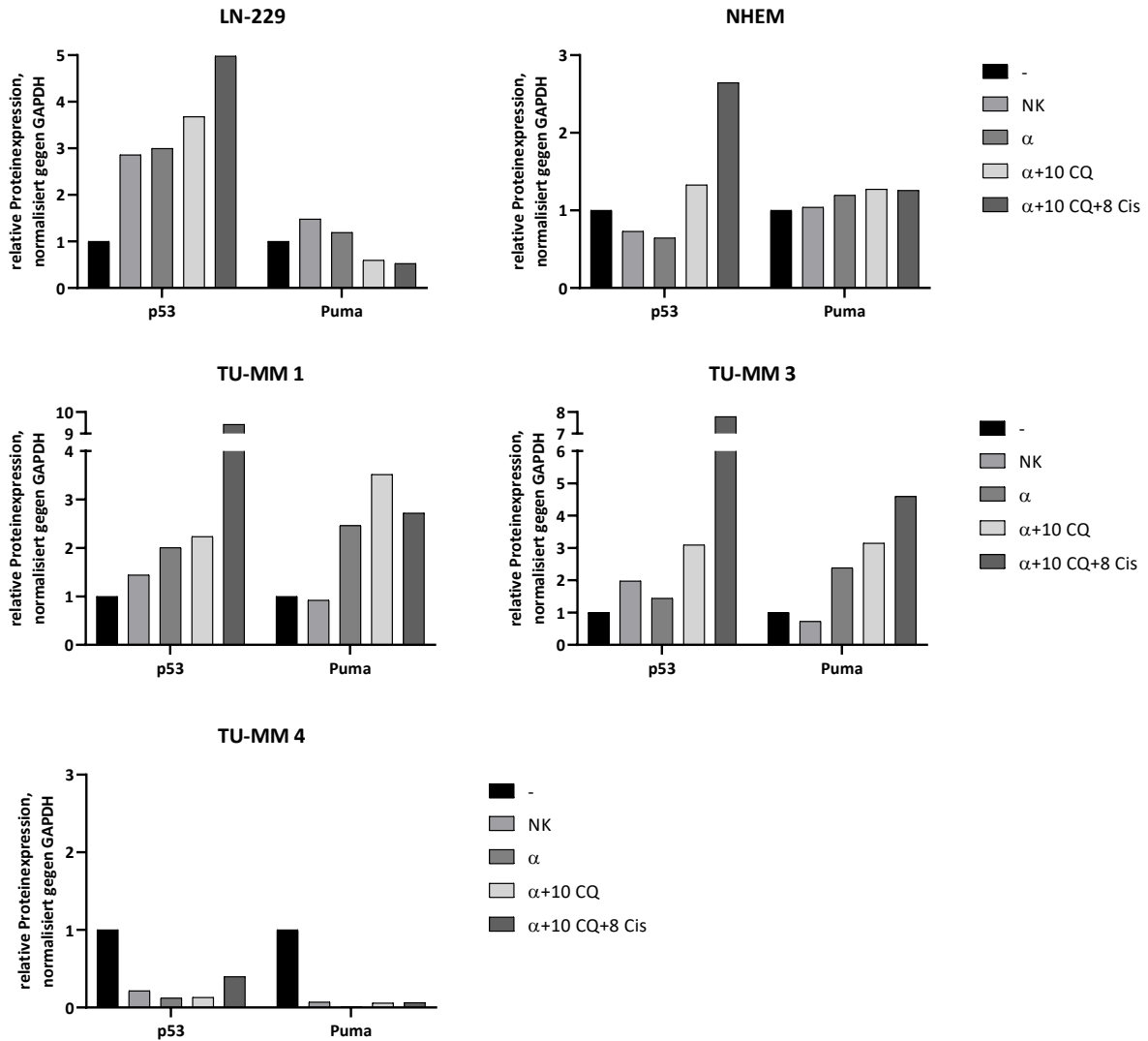


Abbildung 10: Die Inhibition der miRNA-221 und -222 führt zur erhöhten PUMA Proteinexpression in Schleimhautmelanomen

Der Einfluss der miRNAs auf die PUMA Proteinestabilität wurde untersucht, indem die Zellen mit mirVana™ miRNA Inhibitor transfiziert wurden. Es erfolgte die Inhibition der miRNA-221 und -222 (α), sowie die Behandlung transfizierter Zellen mit 10μM Chloroquin (α+10 CQ) und mit 10μM Chloroquin und 8μM Cisplatin (α+10 CQ+8 Cis). Der Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-), sowie mit einer Negativkontrolle (NK) transfizierte Zellen. 48h nach Transfektion, sowie weiteren 24h nach Behandlung mit CQ und Cis erfolgte die Proteinisolierung und der Nachweis von PUMA im Western Blot. Die Proteinexpression wurde gegen GAPDH normalisiert. Dargestellt ist die x-fache Über-/Herabregulation der Proteinexpression von PUMA und p53. Die wiederholte Darstellung von NHEM und LN-229 (siehe Abb. 4) dient dem Vergleich.

5.2.5 Eine Inhibition der miRNA-221 und 222 zeigt eine proliferationshemmende Wirkung in Schleimhautmelanomen

Zur Untersuchung der Wirkung einer Inhibition der miRNA-221 und -222 auf das Proliferationsverhalten in Schleimhautmelanomen erfolgte die Inhibition ebenjener. Anschließend wurde in Proliferationskurven das Wachstum der Zellen dargestellt.

In TU-MM 4 zeigt sich kein Unterschied in der Zellproliferation zwischen unbehandelten und transfizierten Zellen. TU-MM 1 und TU-MM 3 zeigen eine Inhibition des Wachstums nach miRNA Inhibition.

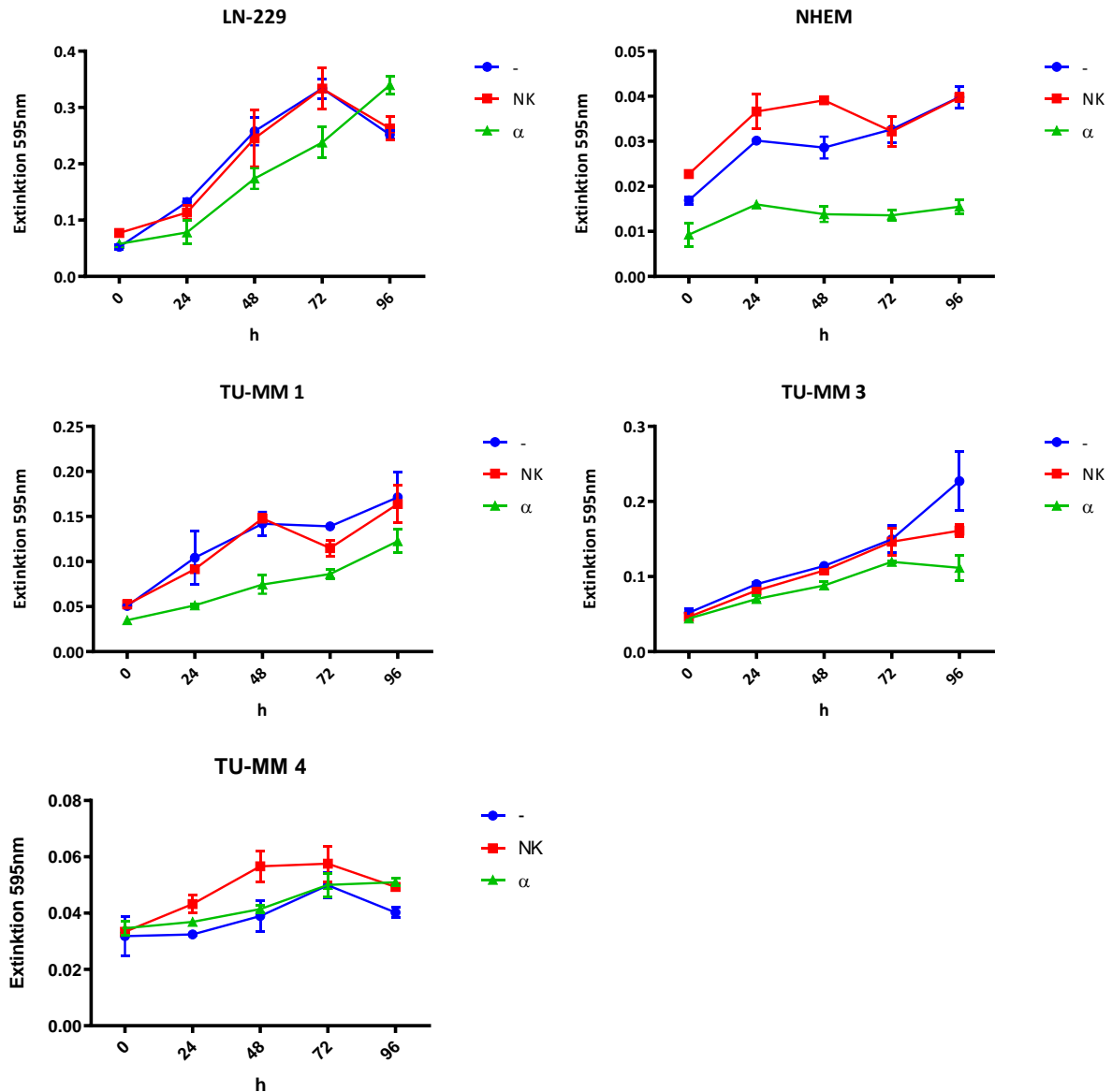


Abbildung 11: Die Inhibition der miRNA-221 und 222 hat eine proliferationshemmende Wirkung in Schleimhautmelanomen

Für die Untersuchung der Wirkung einer Inhibition der miRNA-221 und -222 auf das Überleben der Zellen wurden Schleimhautmelanome mit mirVana™ miRNA Inhibitor transfiziert (α) oder unbehandelt (-) belassen. Als Kontrolle dienten mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen (NK). Für die Proliferationskurven wurden 4.000 unbehandelte bzw. bereits transfizierte Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. An Tag 0 wurde, sowie auch nach 24h, 48h, 72h und 96h nach Durchführen eines MTT-Assays die Extinktion bei 595nm gemessen. Dargestellt ist die Extinktion, ermittelt aus der Extinktion einer Zweifachbestimmung, sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. Die wiederholte Darstellung von NHEM und LN-229 (siehe Abb. 5) dient dem Vergleich.

5.2.6 Die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibitoren mit Chloroquin und Cisplatin bringt keine zusätzliche Proliferationshemmung gegenüber der Behandlung aus Chloroquin und Cisplatin in Schleimhautmelanomen

Zur Untersuchung, inwieweit eine Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibition mit Hemmung des PUMA spezifischen Proteinabbaus und p53 Induktion durch Cisplatin in Schleimhautmelanomen Apoptose einleitet, erfolgte zunächst die Transfektion mit miRNA Inhibitoren. Zusätzlich wurden die transfizierten Zellen mit Chloroquin und Cisplatin in physiologischen Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde in Proliferationskurven das Wachstum der Zellen dargestellt.

TU-MM 3 reagiert mit einer Proliferationshemmung bei Behandlung mit Cisplatin und Chloroquin. Der wachstumshemmende Effekt wird durch zusätzliche Inhibition der miRNA-221 und -222 nicht verstärkt. Bei TU-MM 4 haben weder die Behandlung mit Chloroquin und Cisplatin, noch die zusätzliche miRNA Inhibition einen Effekt auf das Wachstum (siehe Abb. 12 A). In TU-MM 1 zeigt die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibition, Chloroquin und Cisplatin verglichen mit der unbehandelten Kontrolle eine deutliche Proliferationshemmung. Vergleichend mit der Behandlung aus Chloroquin und Cisplatin ohne miRNA Inhibition zeigt sich ein Unterschied im Wachstumsverhalten. Die zusätzliche miRNA Inhibition bringt einen additiven proliferationshemmenden Effekt (siehe Abb. 12 B). Verglichen mit der alleinigen miRNA Inhibition bringt die Kombinationsbehandlung mit zusätzlicher Chloroquin und Cisplatin Gabe eine weitere Steigerung der Proliferationshemmung. (siehe Abb. 12 C).

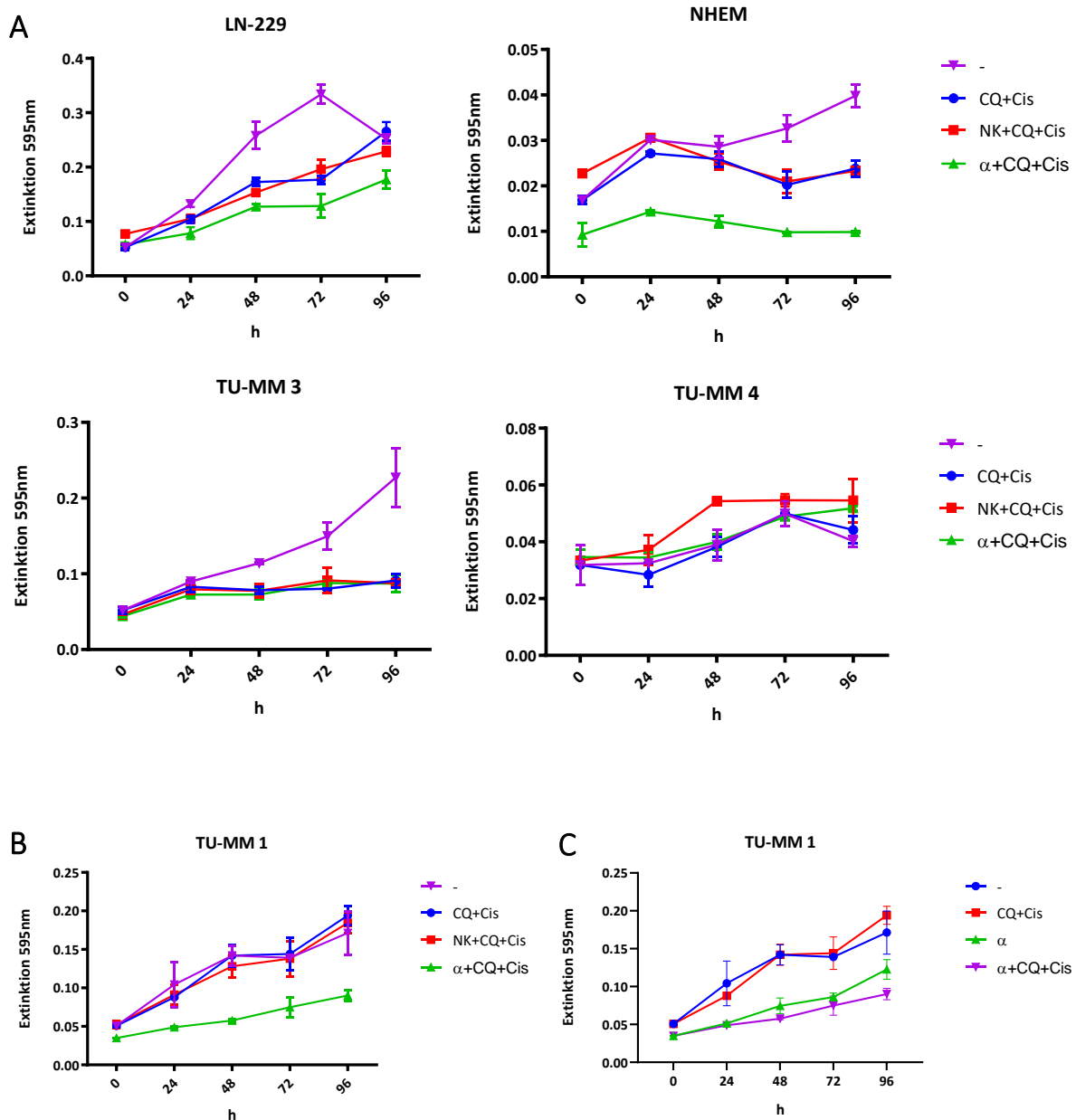


Abbildung 12: Die Inhibition der miRNA-221 und 222 mit gleichzeitiger Behandlung mit Chloroquin und Cisplatin zeigt eine proliferationshemmende Wirkung in Schleimhautmelanomen

A), B), C): Für die Untersuchung der Wirkung einer Inhibition der miRNA-221 und -222 auf das Überleben der Zellen wurden Schleimhautmelanome mit mirVana™ miRNA Inhibitor transfiziert (α) und zusätzlich mit 2,5 μ M Chloroquin und 8 μ M Cisplatin (α +CQ+Cis) behandelt. Als Kontrolle dienten mit einer Negativkontrolle transfizierte und mit 2,5 μ M Chloroquin und 8 μ M Cisplatin behandelte Zellen (NK+CQ+Cis), sowie nur mit 2,5 μ M Chloroquin und 8 μ M Cisplatin behandelte (CQ+Cis) und unbehandelte Zellen (-). Für die Proliferationskurven wurden 4.000 unbehandelte bzw. bereits transfizierte Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. An Tag 0 wurden die Zellen mit Chloroquin und Cisplatin behandelt und zu diesem Zeitpunkt, sowie auch nach 24h, 48h, 72h und 96h nach Durchführen eines MTT-Assays die Extinktion bei 595nm gemessen. Dargestellt ist die Extinktion, ermittelt aus der Extinktion einer Zweifachbestimmung, sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. Die wiederholte Darstellung von NHEM und LN-229 (siehe Abb. 6) dient dem Vergleich.

6. Diskussion

6.1 Chloroquin verlangsamt das Wachstum von kutanen Melanomen und Schleimhautmelanomen

Neben seiner Bedeutung als klassischer Wirkstoff aus der Gruppe der Malariamittel wirkt Chloroquin zudem antiparasitär und entzündungshemmend. Durch seine alkalisierende Wirkung in den Lysosomen der Zellen hemmt es die Autophagie (Sundelin & Terman, 2002). Autophagie ist ein regulierter Prozess, welcher über den Abbau zelleigener beschädigter Organelle über saure Hydrolyse das Überleben der Zelle sichert (B. Levine & Kroemer, 2008). In unterschiedlichen Tumorarten kann eine Fehlregulation der Autophagie zu einem verstärkten Tumorzellüberleben trotz ungünstigen Überlebensbedingungen führen (Baehrecke, 2005; White, 2012).

p53 ist bekannt als Tumorsuppressor, welcher das Wachstum mutierter oder beschädigter Zellen hemmt und so eine Tumorentstehung verhindert (A. J. Levine, 1997; Prives & Hall, 1999), indem es einen Zellzyklusarrest herbeiführt und die Apoptose induziert (Bates & Vousden, 1999). Aktiviert wird der p53-Signalweg durch unterschiedlichste Stimuli wie DNA-Schäden, Hypoxie oder durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten (Lohrum & Vousden, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass nach p53-Aktivierung eine rasche PUMA-Induktion stattfindet (Nakano & Vousden, 2001). Über die Aktivität von PUMA, welche durch Transkription gesteuert wird, wird annähernd die gesamte pro-apoptotische Wirkung von p53 vermittelt (Yu & Zhang, 2008). Die pro-apoptotische Aktivität von PUMA beruht zum einen auf der Bindung der BH3-Domäne von PUMA an anti-apoptotische Proteine der BCL-2-Familie und deren Antagonisierung. Zum anderen wird auch eine direkte Freisetzung der pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK durch PUMA beschrieben (Vela et al., 2013; Westphal et al., 2011; Yu & Zhang, 2008). Unter physiologischen Bedingungen ist die PUMA Expression gering, jedoch kann sie rasch durch unterschiedliche Induktoren wie p53 angehoben werden und so eine Apoptose induziert werden (Fricker et al., 2010). Aufgrund seiner hohen Potenz als Apoptose Induktor unterliegt Aktivität von PUMA strengen Kontrollmechanismen.

In unseren Vorarbeiten zur p53 Integrität in Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen konnten eine sehr geringe bzw. nicht induzierbare Proteinexpression von PUMA sowie ein rascher PUMA mRNA Abbau detektiert werden.

Lakhter et. al. zeigten, dass der Abbau von PUMA in Melanomen (SK-MEL23, MEL501, MELSK5, MEL526 und MEL624) spezifisch durch Chloroquin in Konzentrationen von 25 und 50µM gehemmt werden kann. Dabei scheint die Inhibition des PUMA Proteinabbaus vielmehr Chloroquin- als Autophagie-spezifisch zu sein (Lakhter et al., 2013). So konnte durch die Stabilisation der PUMA Konzentrationen in den Zellen eine Apoptose fördernde Wirkung herbeigeführt werden (Lakhter et al., 2013). Dieser Effekt wurde jedoch durch den Einsatz von Chloroquin Konzentrationen, welche weit über der physiologischen bzw. therapeutischen Dosis liegen, erzielt. Es ist fraglich, in wieweit eine Hemmung des PUMA Proteinabbaus durch niedrige Konzentrationen erzielt werden kann und, ob dieser Effekt alleinig ausreicht, um Apoptose zu induzieren. Vielmehr ergibt sich die Frage, ob es neben der Hemmung des Proteinabbaus zur Induktion von Apoptose eines weiteren Stimulus zur Induktion des Apoptose Signalweges mit Transkription bzw. Translation von PUMA bedarf. Fritsche detektierte eine deutlich höhere Expression der miR-221 und miR-222 in Schleimhautmelanomen gegenüber kutanen Melanomen und wies nach Inhibition der miRNA miR-221 und miR-222 eine leichte Induktion der PUMA Expression nach (Marie Kristin Fritsche, 2019). Einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Erhöhung der PUMA Proteinspiegel in kutanen Melanomen und Schleimhautmelanomen stellt somit die Hemmung des Abbaus der PUMA mRNA dar.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten kutanen Melanomen und Schleimhautmelanomen zeigt Chloroquin mit steigender Konzentration einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Es zeigen jedoch Schleimhautmelanome im Vergleich zu kutanen Melanomen ein geringeres Ansprechen auf Chloroquin. TU-MM 1 reagiert, verglichen mit TU-MM 3 und 4, deutlich sensibler. Dennoch zeigen auch mit 50µM Chloroquin behandelte kutane Melanome sowie auch Schleimhautmelanome weiterhin ein Überleben. Zugleich reagieren sie deutlich weniger sensibel auf die Behandlung mit Chloroquin als NHEM.

Auf Grundlage der von Mzayek et. al untersuchten Blutplasmakonzentrationen von Chloroquin nach Gabe der für die Behandlung der Malaria therapeutischen Dosis (Mzayek et al., 2007) wurde eine mittlere Chloroquin Konzentration von 2,5µM als physiologische Konzentration gewählt. Diese soll möglichst die Nebenwirkungen des Medikaments, wie unter anderem die sogenannte Chloroquin Retinopathie, welche bis zur Erblindung führen kann, vermeiden. Zunächst beklagen betroffene Patient*innen Störungen im Farbsehen, weiterhin Gesichtsfeldausfälle, eine Verminderung des Visus bis hin zur Schießscheiben Makulopathie (Mißner, 2004). Zudem können weitere schwerwiegende Nebenwirkungen einer Therapie mit

Chloroquin auftreten. So weisen aktuelle Untersuchungen auf eine schwerwiegende Nephrotoxizität hin, welche mit glomerulärer Sklerosierung und Tubuluszellnekrose einhergeht (Wang et al., 2019). Der bei hohen Konzentration von bis zu 50µM Chloroquin gemessene proliferationshemmende Effekt auf kutane Melanome und Schleimhautmelanome geht mit einer hohen Gefahr für Nebenwirkungen einher. Eine Therapie mit ebenjenen hohen Blutplasmakonzentrationen von Chloroquin ist klinisch aufgrund der begleitend auftretenden schwerwiegenden Nebenwirkungen nicht sinnvoll.

Eine Behandlung mit der physiologischen Chloroquin-Konzentration bringt uneinheitliche Effekte in den untersuchten Zellen hervor. In den kutanen Melanom Zelllinien IGR-37 und SK-MEL 30 zeigen die mit Chloroquin behandelten Zellen ein verlangsamtes Wachstum. Auch die mit Chloroquin behandelten Zellen der Primärkultur TU-MM 3 zeigen ein gehemmtetes Wachstum.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auf die in dieser Arbeit untersuchten kutanen Melanome und Schleimhautmelanome Chloroquin einen proliferationshemmenden Einfluss hat. Schleimhautmelanome zeigen im Vergleich zu kutanen Melanomen ein geringeres Ansprechen auf Chloroquin. Der bei hohen Konzentrationen von bis zu 50µM Chloroquin gemessene Effekt geht jedoch mit einer hohen Gefahr für Nebenwirkungen einher. Eine Therapie von Tumorpatienten mit ebenjenen hohen Blutplasmakonzentrationen von Chloroquin ist klinisch aufgrund der begleitend auftretenden schwerwiegenden Nebenwirkungen nicht praktikabel. Das allgemeine Ziel einer kurativen Chemotherapie stellt der Erhalt einer vollständigen Remission des Tumors und die Verhinderung eines Rezidivs dar (Neugut & Prigerson, 2017). Die alleinige Proliferationshemmung von Tumorzellen reicht demnach zudem nicht aus, um als wirksame kurative Tumorthherapie bezeichnet werden zu können. Es bedarf neben der Hemmung des PUMA Proteinabbaus durch Chloroquin möglicherweise wie bereits beschrieben der zusätzlichen Hemmung des PUMA Abbaus auf mRNA Ebene und einer weiteren Induktion des Signalweges zur Induktion der Apoptose.

6.2 Proliferationshemmung durch Cisplatin in Chloroquin-behandelten Schleimhautmelanomen

Es konnte gezeigt werden, dass Chloroquin in Schleimhautmelanomen den PUMA Proteinabbau inhibieren und das Wachstum von Schleimhautmelanomen hemmen kann. Für eine effektive Behandlung von Tumorpatient*innen reicht die alleinige Wachstumshemmung der malignen Zellen nicht aus. Es bedarf neben der Hemmung des PUMA Proteinabbaus durch Chloroquin möglicherweise der zusätzlichen Induktion des p53 Signalweges zur Einleitung der Apoptose. Während TP53 Mutationen in verschiedenen Tumorentitäten häufig sind, kommen diese in kutanen Melanomen und Schleimhautmelanomen selten vor (Gwosdz et al., 2006). Basierend auf Analysen der maximalen Blutplasmakonzentration von Cisplatin bei täglicher Gabe (Urien & Lokiec, 2004) wurden die Konzentration von 8µM Cisplatin als physiologische Cisplatin Konzentration festgelegt. In Voruntersuchungen gelang der Nachweis eines grundsätzlich induzierbaren Apoptose Signalweges in kutanen Melanomen und Schleimhautmelanomen, wobei eine Behandlung mit der physiologischen Cisplatin Konzentration keine Induktion von Apoptose erreichen konnte (Marie Kristin Fritsche, 2019). In allen untersuchten kutanen Melanom Zelllinien führt die Behandlung mit Cisplatin zur Wachstumshemmung. In den Zelllinien MEL-JUSO, IGR-37 und SK-MEL 30, auf deren Wachstum Chloroquin eine proliferationshemmende Wirkung hat, zeigt die Kombinationsbehandlung aus Cisplatin und Chloroquin verglichen mit der alleinigen Cisplatin Behandlung eine stärkere wachstumshemmende Wirkung. Insgesamt fällt auf, dass die proliferationshemmende Wirkung von Cisplatin allein stets deutlicher ausgeprägt ist als die Wachstumshemmung, welche durch Chloroquin erreicht werden kann. Es zeigt sich allerdings kein Abfall der Zellzahl unter das anfängliche Niveau, lediglich eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verlangsamte Zunahme der Zellzahl. Diese Beobachtung kann nicht, wie erhofft, durch die Induktion von Apoptose erklärt werden, sondern vielmehr durch eine Verlangsamung des Zellzyklus.

Bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Cisplatin zeigt sich in Schleimhautmelanomen nur bei TU-MM 3 ein gehemmttes Wachstum nach Behandlung. Die Kombinationsbehandlung aus Chloroquin und Cisplatin hat keinen zusätzlichen Effekt gegenüber der alleinigen Cisplatin Behandlung. Dieses geringe Ansprechen von Schleimhautmelanomen auf Cisplatin verdeutlicht die Dringlichkeit der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapieansätze. Bisher orientieren sich

die Therapieempfehlungen für Schleimhautmelanome an den Standards der Melanom Therapie. Da diese für Schleimhautmelanome jedoch deutlich weniger effektiv ist, ist es umso sinnvoller, eine systemische Therapie für Schleimhautmelanome zu etablieren, beispielsweise mit miRNA Inhibitoren, Chloroquin bzw. Kombinationsbehandlungen.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf einen proliferationshemmenden Effekt von Cisplatin auf kutane Melanome hin, wobei eine Kombinationsbehandlung aus Chloroquin und Cisplatin einen synergistisch wirkenden Effekt mit stärkerer Proliferationshemmung zeigt. Der beobachtete Effekt ist jedoch nicht als Induktion von Apoptose, sondern als Verlangsamung des Zellzyklus mit verlangsamer Proliferation zu deuten. Das in den Versuchen aufgezeigte geringe Ansprechen von Schleimhautmelanomen auf Cisplatin verdeutlicht die Dringlichkeit der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapieansätze.

6.3 Chloroquin nimmt Einfluss auf den PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen

Chloroquin hat als klassischer Wirkstoff aus der Gruppe der Anti-Malariamittel mit antiparasitärer und entzündungshemmender Wirkung auch zudem eine alkalisierende Wirkung in den Lysosomen der Zellen. Dadurch wirkt es hemmend auf die Autophagie (Sundelin & Terman, 2002).

Untersuchungen haben gezeigt, dass der Abbau von PUMA in kutanen Melanomen spezifisch durch Chloroquin gehemmt werden kann (Lakhter et al., 2013). Die Wirkung von Chloroquin auf die PUMA Proteinexpression in Schleimhautmelanomen wurde bislang nicht untersucht. Bafilomycin wirkt ebenfalls als Inhibitor der Autophagie, indem es die V-Typ ATPase der Autophagosomen Membran inhibiert. Auf diese Weise wird die Verschmelzung von Autophagosom und Lysosom verhindert, was sich in einer Stabilisierung des Autophagie-Markers Lc3 II darstellen lässt (Mauvezin & Neufeld, 2015).

In TU-MM 1 zeigen die mit Chloroquin behandelten Zellen deutlich erhöhte PUMA Spiegel ohne gleichzeitige p53 Induktion. Diese p53 unabhängige Erhöhung der PUMA Proteinexpression gelingt durch Chloroquin, nicht jedoch durch Bafilomycin. Durch die Behandlung mit Bafilomycin gelingt keine PUMA Stabilisierung. Ähnliches kann bei TU-MM 3 beobachtet werden. Bei hohen Chloroquin Konzentrationen ist keine p53 Induktion sichtbar, wohingegen sich eine leicht erhöhte PUMA Proteinexpression nachweisen lässt. Anders verhalten sich Zellen

der Zelllinie TU-MM 4. Hier bringt weder Chloroquin noch Bafilomycin eine Auswirkung auf die PUMA Proteinlevel. In allen untersuchten Zellen zeigt sich sowohl bei Behandlung mit Chloroquin, als auch mit Bafilomycin eine Stabilisierung des Autophagie Inhibitors LC3 II. Allgemein wird die Phosphatidylethanolamin-Konjugation von LC3-I zu LC3-II zur Quantifizierung von Autophagie genutzt (Klionsky et al., 2008). Die Hemmung der Verschmelzung von Autophagosom und Lysosom zeigt sich durch eine Stabilisierung des Autophagie-Markers Lc3 II (Mauvezin & Neufeld, 2015). So kann von einer erfolgreichen Hemmung der Autophagie ausgegangen werden. Die Behandlung mit Bafilomycin als Autophagie Inhibitor beeinflusst die PUMA Proteinexpression in Schleimhautmelanomen nicht. Diese Ergebnisse stützen den Verdacht auf einen bislang unbekanntem Mechanismus, durch welchen der PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen Chloroquin spezifisch und Autophagie unabhängig inhibiert werden kann (Lakhter et al., 2013). Durch die Verwendung hoher Dosen Chloroquin kann eine Stabilisierung der PUMA Protein Level in Schleimhautmelanomen gezeigt werden.

COLO-849 zeigt als einzige kutane Melanom Zelllinie nach Behandlung mit Chloroquin eine Erhöhung der PUMA Proteinexpression ohne gleichzeitig erhöhte p53 Expression.

In MEL-JUSO, COLO-849 und SK-MEL 3, sowie in LN-229 gelingt der Nachweis einer erhöhten p53 Proteinexpression nach Behandlung mit Etoposid, jedoch ohne konsekutiv erhöhte PUMA Proteinexpression. Durch Chloroquin konnte keine Stabilisierung der PUMA Proteinlevel erreicht werden, was im Widerspruch zu den von Lakhter et al. ermittelten Ergebnissen steht. Es wurden allerdings nicht die gleichen Zelllinien untersucht, wobei sich wie in COLO-849 beschrieben auch durchaus eine Stabilisierung der PUMA Proteinexpression in kutanen Melanomen durch Chloroquin erreichen lässt. Hier scheint neben der intertumoralen Heterogenität von Tumoren unterschiedlicher Patienten auch eine intratumorale Heterogenität eine Rolle zu spielen. Diese bezeichnet unterschiedliche Differenzierungen innerhalb eines einzelnen Tumors, wie sie beispielsweise für Glioblastome beschrieben wurde (Bergmann et al., 2020).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen inhibiert werden kann. Zudem wird der Verdacht auf einen bislang unbekanntem Mechanismus, durch welchen der PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen Chloroquin spezifisch und Autophagie unabhängig gehemmt werden kann, gestützt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es neben der Hemmung des PUMA

Proteinabbau durch Chloroquin möglicherweise einer zusätzlichen Inhibierung des PUMA Abbaus auf mRNA Ebene und einer weiteren Induktion des Signalweges zur Induktion einer suffizienten Apoptose auf dem Weg zur Etablierung wirksamer Therapiestrategien zur Behandlung von Schleimhautmelanomen bedarf.

Kutane Melanome reagieren uneinheitlich auf eine Behandlung mit Chloroquin. In den untersuchten Zelllinien konnte mehrheitlich keine Hemmung des PUMA Proteinabbaus nachgewiesen werden. Es kann hierbei unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Lakther et al. neben der intertumoralen Heterogenität von Tumoren auch eine intratumorale Heterogenität von Bedeutung sein.

6.4 miRNA-221 und -222 nehmen Einfluss auf die Regulation von PUMA in Schleimhautmelanomen

miRNAs regulieren die Expression unterschiedlichster Zielgene durch sequenzspezifische Hybridisierung an der 3'-UTR von messenger-RNA (Lai, 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass miRNAs auch Bindungen an der 5'-UTR, mit DNA-Abschnitten oder mit Exonen eingehen können (Small et al., 2010) und durch die Bindung die Translation ebenjener messenger-RNA blockieren (Zeng et al., 2002) oder ihren direkten Abbau bewirken (Meijer et al., 2013). Auf diese Weise wird eine Inhibition der Proteinexpression erreicht und den miRNAs eine beachtliche Funktion bei der Regulation unterschiedlichster biologischer Prozesse wie Signaltransduktion, Wachstum und Zellzyklus zugesprochen. Dabei sollen miRNAs an der Regulation von bis zu 30% der menschlichen Gene beteiligt sein (Lewis et al., 2005).

MiRNA-15 und -16 sind die ersten miRNAs, deren Expression in einem Tumor als fehlreguliert beschrieben wurde. Ihre Expression ist in chronisch lymphatischen Leukämien vom B-Zell-Typ heruntergesetzt (Calin et al., 2002). Eine gestörte miRNA Expression in Tumorzellen scheint eher die Regel statt einer Ausnahme zu sein, wobei die Störungen auf unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden können. Es kommt in verschiedenen Tumorarten zu einer Über- oder Unterexpression von miRNAs. Vermehrt exprimierte miRNAs können im Falle einer Beteiligung bei der Tumorentstehung auch Tumorsuppressoren inhibieren und in diesem Sinne als Onkogene, sog. „Oncomirs“, betrachtet werden (Lu et al., 2005). Es sind verschiedene miRNAs bekannt, deren Über- oder Unterexpression einen Einfluss auf die Proliferation kutaner

Melanome hat (Segura et al., 2012). Als Inhibitoren der Tumorinvasion und Metastasierung kutaner Melanome konnten beispielsweise miRNA-382 und miRNA-516b ermittelt werden (Hanniford et al., 2015). Studien beschreiben einen Zusammenhang von miRNA-221 und -222 mit der Regulation der PUMA Expression in verschiedenen malignen Tumoren (Sarkar et al., 2013; C. Z. Zhang et al., 2010).

In Melanomen weisen diese eine erhöhte Expression auf (Felicetti et al., 2008) und stellen möglicherweise einen neuen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie dar. Untersuchungen zur Expression der miRNA-221 und -222 in Schleimhautmelanomen zeigen eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu kutanen Melanomen, wobei MEL-JUSO unter den kutanen Melanomen eine Sonderstellung mit einer vergleichsweise hohen Expression von miRNA-221 und -222 aufweist (Marie Kristin Fritsche, 2019). Diese deutlich erhöhte Expression könnte die fehlende Induzierbarkeit von PUMA in Schleimhautmelanomen und das schlechte Ansprechen auf klassische Chemotherapeutika erklären. Darüber hinaus ist ein Einfluss auf weitere unbekannte Signalwege denkbar. Denn da zur Wirkungsentfaltung von miRNAs keine zu ihrer Zielstruktur genau passende komplementäre Basensequenz nötig ist, kann eine einzelne miRNA für die Regulation mehrerer messenger-RNAs verantwortlich sein (Christopher et al., 2016). So scheint ein Einfluss auf weitere bisher unbekannte Signalwege mit ihren Zielgenen durchaus möglich.

Die für PUMA kodierende mRNA wurde in der Literatur als Zielstruktur der miRNA-221 und miRNA-222 beschrieben (C. Zhang et al., 2010). Zudem wurde eine erhöhte Expression dieser miRNAs im malignen Melanom beschrieben (Felicetti et al., 2008). Die Expression eben dieser in MEL-JUSO scheint vergleichbar mit jener der Glioblastom Zelllinie LN-229. NHEM, COLO-849, IGR-37, SK-MEL 3 und SK-MEL 30 weisen eine vergleichsweise niedrige miRNA-221 und -222 Expression auf (Marie Kristin Fritsche, 2019). Untersuchungen von Schleimhautmelanomen zeigen eine deutlich erhöhte Expression der miRNA-221 und -222 in TU-MM1, TU-MM3 und TU-MM4 (Marie Kristin Fritsche, 2019). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen durch Chloroquin inhibiert werden kann. Dieser Effekt scheint jedoch für die Induktion einer suffizienten Apoptose und damit als wirksame kurative Tumorthherapie nicht ausreichend zu sein. Zur Überprüfung inwiefern der miRNA und der Chloroquin vermittelte PUMA Abbau zusammenspielen, wurde die PUMA Proteinexpression bei miRNA Inhibition und gleichzeitiger Behandlung mit Chloroquin im

Western Blot untersucht und ein zusätzlicher, Apoptose induzierender Stimulus mit Cisplatin gesetzt.

In MEL-JUSO als einziger kutaner Melanom Zelllinie bewirken die Behandlungen mit miRNA Inhibitoren und Chloroquin eine erhöhte PUMA Proteinexpression mit p53 Induktion und stärkere PUMA Proteinexpression durch Addition von Cisplatin. COLO-849 reagiert auf eine Inhibition der miRNA, sowie auf Chloroquin mit einem Anstieg der PUMA Expression.

In Schleimhautmelanomen ist eine Steigerung der PUMA Proteinexpression durch miRNA Inhibition und Chloroquin zu beobachten. TU-MM 1 reagiert auf die Inhibition der miRNA mit einem Anstieg der PUMA Expression. Bei zusätzlicher Behandlung der transfizierten Zellen mit Chloroquin reagieren diese mit einer gesteigerten PUMA Expression. Es bleibt jedoch der erhoffte additive Effekt bei zusätzlicher Behandlung mit Cisplatin auf die PUMA Proteinexpression aus. In TU-MM 3 jedoch führt die dreifache Kombinationsbehandlung, verglichen mit der miRNA Inhibition und Chloroquin, zu einer gesteigerten PUMA Proteinexpression. TU-MM 4 zeigt weder nach alleiniger miRNA Inhibition noch bei Kombinationsbehandlung erhöhte PUMA Proteinexpression. Passend hierzu hatte auch die alleinige Behandlung mit Chloroquin keine Auswirkung auf die PUMA Proteinlevel. Es zeigen sich demnach uneinheitliche Ergebnisse innerhalb der untersuchten Primärkulturen, was wiederum auf eine ausgeprägte Heterogenität innerhalb der Gruppe der Schleimhautmelanome zurückzuführen sein kann.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nach mRNA Inhibition eine Stabilisierung der PUMA Proteinlevel in der Zelllinie MEL-JUSO, in welcher in Voruntersuchungen erhöhte miRNA-221 und -222 Spiegel detektiert worden waren (Marie Kristin Fritsche, 2019). In ebenjener Zelllinie kann der PUMA Proteinabbau Chloroquin spezifisch gehemmt werden, zudem erfolgt durch Cisplatin eine Induktion von p53 und PUMA. Auch in COLO-849 steigt die PUMA Expression nach miRNA Inhibition und Chloroquin Behandlung an, wobei hier vorherige Ergebnisse eine vergleichsweise niedrige miRNA-221 und -222 Expression gezeigt hatten (Marie Kristin Fritsche, 2019).

Auch in den untersuchten Schleimhautmelanomen konnte bereits eine erhöhte Expression der miRNA-221 und -222 gemessen werden (Marie Kristin Fritsche, 2019). In den durchgeführten Versuchen bestätigte sich die prinzipielle Induzierbarkeit einer gesteigerten PUMA Proteinexpression durch miRNA Inhibition und Chloroquin, jedoch legt das teilweise uneinheitliche Verhalten der Schleimhautmelanome weitere bislang unbekanntes zelluläre

Mechanismen im Rahmen einer ausgeprägten Heterogenität innerhalb der Gruppe der Schleimhautmelanome dar.

6.5 Die Inhibition von miRNA-221 und -222 führt zur Wachstumsverlangsamung von Schleimhautmelanomen

Es wird von einer Akkumulation von p53 zwischen 50-94% in kutanen Melanomen und 21-80% in Schleimhautmelanomen berichtet (M. K. Fritsche & Knopf, 2017), sodass theoretisch eine alleinige Inhibition der miRNA-221 und miRNA-222 ausreichen könnte, um PUMA zu stabilisieren und Apoptose einzuleiten. Jedoch gibt es Gegenregulationsmöglichkeiten für den p53 Signalweg, wie beispielsweise durch anti-apoptotische Proteine der BCL-2 Familie (Youle & Strasser, 2008), welche im Malignen Melanom eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Apoptose zu spielen scheinen (Eberle & Hossini, 2008). Die anti- und pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie stellen einen essenziellen Faktor in der Regulation der Apoptose dar (Gross, McDonnell, & Korsmeyer, 1999). Eine über das physiologische Maß hinausgehenden Wirkung anti-apoptotisch wirkender Proteine der Bcl-2 Familie scheint eine wichtige Rolle in der verminderten Induzierbarkeit von Apoptose in Melanomen zu spielen (Eberle & Hossini, 2008). Die zu jener Gruppe gehörenden Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 zeigen in Melanomen, verglichen mit regulären Melanozyten, eine erhöhte Expression (Hossini, Eberle, Fecker, Orfanos, & Geilen, 2003; Selzer et al., 1998; Wolter et al., 2007). Zudem ist eine Zunahme des Proteingehaltes von Bcl-2 und Bcl-xL mit steigender Tumorprogression beschrieben (Leiter, Schmid, Kaskel, Peter, & Krahn, 2000). Eine Überexpression von Bcl-2 scheint in engem Zusammenhang mit einer reduzierten basalen Apoptose Rate und einer verminderten Empfindlichkeit von Melanomen gegenüber Apoptose induzierender Stimuli zu stehen (Kurbanov, Geilen, Fecker, Orfanos, & Eberle, 2005; Raisova et al., 2002).

PUMA vermittelt seine pro-apoptotische Funktion durch die Bindung und Inhibierung der anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie und entfaltet somit als indirekter Aktivator der pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK seine Apoptose fördernde Wirkung (Yu & Zhang, 2008). Durch einen zusätzlichen p53 und somit PUMA induzierenden Stimulus soll durch eine vermehrte Induktion von PUMA und seiner eben beschriebenen Wirkung auf die anti-

apoptotischen Proteine eine weitere Steigerung der Apoptose erreicht werden. Hierfür wird Cisplatin als p53 Induktor gewählt.

Bei der Untersuchung der Wirkung der Inhibition der miRNA-221 und -222 auf das Proliferationsverhalten in kutanen Melanomen zeigen sich in COLO-849, IGR-37, SK-MEL 3 und SK-MEL 30 kein Einfluss der Inhibition auf das Zellwachstum. Die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibition, Chloroquin und Cisplatin erbringt eine deutliche Proliferationshemmung, wobei sich im Vergleich zu der Behandlung aus Chloroquin und Cisplatin ohne miRNA Inhibition kein Unterschied ebenjener Kombinationsbehandlung im Wachstumsverhalten zeigt. Die zusätzliche miRNA Inhibition bringt demnach keinen additiven proliferationshemmenden Effekt und keinen Vorteil gegenüber der Cisplatin und Chloroquin Behandlung. MEL-JUSO reagiert als einzige kutane Melanom Zelllinie mit einer Inhibition des Wachstums nach miRNA Inhibition. Da hier in Voruntersuchungen eine vergleichsweise hohe miRNA-221 und -222 Expression detektiert worden war, ist der wachstumshemmende Effekt auf eine Inhibition ebenjener zurückzuführen. Der wachstumshemmende Effekt einer Behandlung mit Cisplatin und Chloroquin wird durch die zusätzliche Inhibition der miRNA-221 und -222 verstärkt.

In den untersuchten Schleimhautmelanom Zellen lässt sich keine einheitliche Reaktion beobachten. Während TU-MM 1 und TU-MM 3 durch eine miRNA Inhibition in ihrem Wachstum gehemmt werden, reagiert TU-MM 4 nicht auf die Behandlung. In TU-MM 1 zeigt die Kombinationsbehandlung aus miRNA Inhibition, Chloroquin und Cisplatin verglichen mit der unbehandelten Kontrolle eine deutliche Proliferationshemmung. Vergleichend mit der Behandlung aus Chloroquin und Cisplatin ohne miRNA Inhibition zeigt sich ein Unterschied im Wachstumsverhalten. Die zusätzliche miRNA Inhibition bringt einen additiven proliferationshemmenden Effekt. TU-MM 3 reagiert mit einer Proliferationshemmung bei Behandlung mit Cisplatin und Chloroquin. Der wachstumshemmende Effekt wird durch zusätzliche Inhibition der miRNA-221 und -222 jedoch nicht verstärkt. Bei TU-MM 4 haben weder die Behandlung mit Chloroquin und Cisplatin, noch die zusätzliche miRNA Inhibition einen Effekt auf das Wachstum.

Die Untersuchungen zur PUMA Proteinexpression zeigen eine Steigerung ebenjener durch miRNA Inhibition und Chloroquin. So zeigt TU-MM 1 eine erhöhte PUMA Expression nach miRNA Inhibition und Chloroquin Behandlung. In TU-MM 3 führt die dreifache Kombinationsbehandlung zu einer deutlich gesteigerten PUMA Proteinexpression. TU-MM 4, wo weder die Behandlung mit Chloroquin und Cisplatin, noch die zusätzliche miRNA Inhibition

einen Effekt auf das Wachstum haben, zeigt weder nach alleiniger miRNA Inhibition, noch bei Kombinationsbehandlung erhöhte PUMA Proteinexpression.

Die beobachteten Ergebnisse lassen rückschließen, dass nicht alle Zellen nach vermehrter PUMA Expression die sofortige Apoptose einleiten, was auf einen Mechanismus hinweist, der das hohe pro-apoptotische Potential von PUMA hemmt. Dies könnte durch einen Apoptose Nachweis festgestellt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass PUMA einer post-translationalen Modifikation unterliegt, welche über Phosphorylierung von Serin 10 eine Degradierung von PUMA erreicht und ein Zellüberleben ermöglicht (Fricker et al., 2010). ZNF509L und seine -S1 Isoform sind Proteine, welche bei einem DNA Schaden von p53 induziert werden. Diese aktivieren p21/CDKN1A und führen zur vermehrten RB Transkription, wodurch sie hemmend auf die Proliferation der Zelle wirken. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass die p53 getriggerte Aktivierung von PUMA durch ZNF509S1 gehemmt und somit die Einleitung von Apoptose verhindert werden kann (Jeon et al., 2017).

In der Entstehung des malignen Melanoms sind auch aktivierende Mutationen in Onkogenen zu berücksichtigen. Die häufigste Mutation findet sich im Onkogen BRAF, welche bei ca. 50% aller primären malignen Melanome nachweisbar ist (Goel et al., 2006). Obwohl die hoch spezifischen BRAF Inhibitoren (PLX4032, Vemurafenib) erfolgreich Apoptose in mutierten Zellen einleiten können, sind bislang die molekularen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden. Rohrbeck et al. zeigen, dass eine durch PLX4032 induzierte Apoptose in malignen Melanomen größtenteils PUMA vermittelt stattfindet. Obwohl das anfängliche Ansprechen auf die Therapie sehr hoch ist, stellt sich im klinischen Verlauf die Wirkung im Sinne einer Resistenzentwicklung ein (Rohrbeck et al., 2016). Hierbei scheint die Aktivierung der Rezeptor Tyrosinkinase cMET durch HGF (hepatocyte growth factor), der von den Tumorzellen selbst exprimiert werden kann, eine wichtige Rolle zu spielen. Studien zeigen, dass in BRAF mutierten Melanomen HGF eine Herabregulation von PUMA bewirkt, bzw. dessen Induktion verhindert und den Tumorzellen somit ein Überleben ermöglicht (Rohrbeck et al., 2016).

Dennoch bleibt die Frage bestehen, wie genau die Induktion von PUMA durch HGF inhibiert werden kann, was wiederum auf eine post-translationalen Modifikation mit Phosphorylierung und Degradierung von PUMA hinweist (Fricker et al., 2010).

Zusammenfassend reagiert passend zu den bisher erhobenen Daten MEL-JUSO als einzige kutane Melanom Zelllinie mit einer Inhibition des Wachstums nach miRNA-221 und -222 Inhibition. In Schleimhautmelanomen ist durch miRNA Inhibition und Chloroquin Behandlung

eine Stabilisierung der PUMA Proteinexpression detektierbar, ebenso zeigt sich eine Proliferationshemmung. Die durchgeführten Versuche zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Zellen legen jedoch nahe, dass trotz der grundsätzlich induzierbaren PUMA Expression, nicht die sofortige Einleitung von Apoptose erfolgt. Denkbar ursächlich hierfür sind beschriebene PUMA inaktivierende Mechanismen durch HGF vermittelte PUMA Herabregulation, sowie auch posttranslationale Modifikation und Degradierung von PUMA.

6.6 Zusammenfassung

Das maligne Melanom geht von Melanozyten der Haut aus und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Unter den Hauttumoren weist es die höchste Metastasierungsrate auf und ist die Ursache für mehr als 90% der durch Hauttumoren ausgelösten Sterbefälle. Die verglichen mit anderen Tumorerkrankungen hohe Inzidenz in jungen Jahren ist ungewöhnlich. Erfolgt die Diagnosestellung im bereits metastasierten Stadium bleibt den Patient*innen eine sehr geringe durchschnittliche Lebenserwartung.

Schleimhautmelanome stellen als seltene Neoplasie eine besondere Untergruppe der malignen Melanome dar, da sie an sonnenabgewandten Körperstellen entstehen. Die molekularen Mechanismen, die bei der Entstehung der Neoplasien eine Rolle spielen, sind noch nicht verstanden. Aufgrund guter vaskulärer und lymphatischer Anbindung, sowie einer hohen Mitoserate und aggressivem Wachstum mit Infiltration der Submukosa befinden sich Schleimhautmelanome bei Erstdiagnose häufig in fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Bei fehlenden Therapierichtlinien zeigt sich zudem ein schlechtes Therapieansprechen bei Erkrankten. Für die Betroffenen ergibt sich zumeist eine infauste Prognose. Dies verdeutlicht den dringenden Bedarf der Etablierung eines wirksamen Therapieregimes.

p53 ist bekannt als Tumorsuppressor, welcher die Apoptose mutierter oder beschädigter Zellen einleitet. Über die Aktivität von PUMA, welche durch Transkription reguliert wird, wird beinahe die gesamte pro-apoptotische Wirkung von p53 vermittelt. In Vorarbeiten zur p53 Integrität in Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen konnten eine sehr geringe bzw. nicht induzierbare Proteinexpression von PUMA sowie ein rascher PUMA mRNA Abbau detektiert werden.

In anderen Tumorentitäten wurden miR-221 und -222 als Regulatoren der PUMA Expression beschrieben. In vorherigen Untersuchungen konnten in Schleimhautzellen eine erhöhte Expression der miR-221 und -222 als Regulatoren der PUMA Expression detektiert werden. Die Rolle des Antimalariamittels Chloroquin zur Behandlung von Melanomen wurde in der Literatur diskutiert, wobei Chloroquin über einen bislang unbekanntem Mechanismus den PUMA-Proteinabbau hemmen soll.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die miRNA-221 und -222 für die geringe und nicht durch Chemotherapie induzierbare PUMA Expression ursächlich sind. Eine Hemmung ebenjener sollte die Wiederherstellung der PUMA Expression erwirken. Zusätzlich sollte die Wirkung von Chloroquin auf den PUMA Proteinabbau untersucht werden. Dabei war jedoch fraglich, ob die alleinige Wiederherstellung der PUMA Expression zur Induktion von Apoptose ausreicht, oder ob es einer weiteren Induktion des Signalweges der Apoptose bedarf. Es hatten sich drei Ansätze herauskristallisiert, durch deren Stimulation eine erhöhte PUMA Expression möglich und die Induktion des Zelltodes erzielt werden sollte. Zum einen die Hemmung des spezifischen PUMA Protein Abbaus mithilfe von Chloroquin, zum anderen die Induktion der PUMA Transkription durch eine p53 Induktion mit Cisplatin. Des Weiteren sollte eine Hemmung des PUMA mRNA Abbaus durch miRNA-221 und -222 mithilfe von miRNA Inhibitoren erreicht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Chloroquin auf die in dieser Arbeit untersuchten kutanen Melanome und Schleimhautmelanome einen proliferationshemmenden Einfluss hat, wobei Schleimhautmelanome im Vergleich zu kutanen Melanomen ein geringeres Ansprechen auf Chloroquin zeigen. Die alleinige Proliferationshemmung von Tumorzellen reicht jedoch nicht aus, um als wirksame kurative Tumorthherapie bezeichnet werden zu können. Ein ähnlicher proliferationshemmender Effekt auf kutane Melanome konnte durch Behandlung mit Cisplatin erzielt werden. Dabei zeigte eine Kombinationsbehandlung aus Chloroquin und Cisplatin einen synergistisch wirkenden Effekt mit stärkerer Proliferationshemmung. Dieser ist jedoch nicht als Induktion von Apoptose, sondern als Verlangsamung des Zellzyklus mit verlangsamter Proliferation zu deuten. Schleimhautmelanome konnten durch Cisplatin in ihrem Wachstum nicht gehemmt werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass der PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen durch Chloroquin inhibiert werden kann. Diese Beobachtung stützt den Verdacht auf einen bislang unbekanntem Mechanismus, durch welchen der PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen Chloroquin spezifisch und Autophagie unabhängig

gehemmt werden kann. In kutanen Melanomen konnte mehrheitlich keine Hemmung des PUMA Proteinabbaus nachgewiesen werden, wobei an dieser Stelle neben der intertumoralen Heterogenität auch eine intratumorale Heterogenität eine Rolle spielen könnte.

Hinsichtlich der Rolle der miRNA-221 und -222 wurde nach mRNA Inhibition eine Stabilisierung der PUMA Proteinlevel in der Zelllinie MEL-JUSO, in welcher in Voruntersuchungen erhöhte miRNA-221 und -222 Spiegel detektiert worden waren (Marie Kristin Fritsche, 2019), beobachtet. In ebenjener Zelllinie war auch der PUMA Proteinabbau Chloroquin spezifisch gehemmt worden.

Passend hierzu reagierte MEL-JUSO als einzige kutane Melanom Zelllinie mit einer Inhibition des Wachstums nach miRNA-221 und -222 Inhibition. Auch in den untersuchten Schleimhautmelanomen konnte bereits eine erhöhte Expression der miRNA-221 und -222 gemessen werden (Marie Kristin Fritsche, 2019). In Schleimhautmelanomen war durch miRNA Inhibition und Chloroquin Behandlung eine Stabilisierung der PUMA Proteinexpression detektierbar, ebenso konnte eine Hemmung der Proliferation beobachtet werden. Die durchgeführten Versuche zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Zellen legen jedoch nahe, dass trotz der grundsätzlich induzierbaren PUMA Expression, nicht die sofortige Einleitung von Apoptose erfolgt. Eine wirksame Induktion von Apoptose konnte nicht erzielt werden. Denkbar ursächlich hierfür sind PUMA inaktivierende zelluläre Mechanismen, durch HGF vermittelte PUMA Herabregulation, sowie auch posttranslationale Modifikation und Degradierung von PUMA.

6.7 Ausblick

Chloroquin hat auf die in dieser Arbeit untersuchten kutanen Melanome und Schleimhautmelanome einen proliferationshemmenden Einfluss. Ein ähnlicher proliferationshemmender Effekt auf kutane Melanome konnte durch Behandlung mit Cisplatin erzielt werden. Dieser ist jedoch nicht als Induktion von Apoptose, sondern als Verlangsamung des Zellzyklus mit verlangsamter Proliferation zu werten. Eine alleinige Proliferationshemmung von Tumorzellen reicht für eine wirksame kurative Tumorthherapie jedoch nicht aus. Die Beobachtung, dass der PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen durch Chloroquin inhibiert werden kann, stützt den Verdacht auf einen bislang unbekanntem Mechanismus,

durch welchen der PUMA Proteinabbau in Schleimhautmelanomen Chloroquin spezifisch und Autophagie unabhängig gehemmt werden kann. Eine Inhibition der miRNA-221 und -222 führt eine Stabilisierung der PUMA Proteinlevel sowie eine Hemmung des Zellwachstums in der Zelllinie MEL-JUSO herbei, in welcher in Voruntersuchungen erhöhte miRNA-221 und -222 Spiegel detektiert worden waren (Marie Kristin Fritsche, 2019). Auch in den untersuchten Schleimhautmelanomen konnte bereits eine erhöhte Expression der miRNA-221 und -222 gemessen werden (Marie Kristin Fritsche, 2019). In Schleimhautmelanomen war durch miRNA Inhibition und Chloroquin Behandlung eine Stabilisierung der PUMA Proteinexpression detektierbar, ebenso konnte eine Hemmung der Proliferation beobachtet werden. Die Ergebnisse legen jedoch nahe, dass trotz der grundsätzlich induzierbaren PUMA Expression, nicht die sofortige Einleitung von Apoptose erfolgt.

Dies weist auf einen Mechanismus hin, der das hohe pro-apoptotische Potential von PUMA hemmt. Es gibt Hinweise darauf, dass PUMA einer post-translationalen Modifikation unterliegt, welche über Phosphorylierung von Serin 10 eine Degradierung von PUMA erreicht und ein Zellüberleben ermöglicht (Fricker et al., 2010). ZNF509L und seine -S1 Isoform sind Proteine, welche bei einem DNA Schaden von p53 induziert werden. Diese aktivieren p21/CDKN1A und führen zur vermehrten RB Transkription, wodurch sie hemmend auf die Proliferation der Zelle wirken. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass die p53 getriggerte Aktivierung von PUMA durch ZNF509S1 gehemmt und somit die Einleitung von Apoptose verhindert werden kann (Jeon et al., 2017).

In der Entstehung des malignen Melanoms sind auch aktivierende Mutationen in Onkogenen zu berücksichtigen. Die häufigste Mutation findet sich im Onkogen BRAF, welche bei ca. 50% aller primären malignen Melanome nachweisbar ist (Goel et al., 2006). Obwohl die hoch spezifischen BRAF Inhibitoren (PLX4032, Vemurafenib) erfolgreich Apoptose in mutierten Zellen einleiten können, sind die genauen molekularen Mechanismen bislang nicht vollständig verstanden. Rohrbeck et al. zeigen, dass eine durch PLX4032 induzierte Apoptose in malignen Melanomen größtenteils PUMA vermittelt stattfindet. Obwohl das anfängliche Ansprechen auf die Therapie sehr hoch ist, stellt sich im klinischen Verlauf die Wirkung im Sinne einer Resistenzentwicklung ein (Rohrbeck et al., 2016). Hierbei scheint die Aktivierung der Rezeptor Tyrosinkinase cMET durch HGF (hepatocyte growth factor), der von den Tumorzellen selbst exprimiert werden kann, eine wichtige Rolle zu spielen. Studien zeigen, dass in BRAF mutierten

Melanomen HGF eine Herabregulation von PUMA bewirkt, bzw. dessen Induktion verhindert und den Tumorzellen somit ein Überleben ermöglicht (Rohrbeck et al., 2016).

Dennoch bleibt die Frage bestehen, wie genau die Induktion von PUMA durch HGF inhibiert werden kann.

7 Referenzen

- Armstrong, B. K., & Kricger, A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*, 63(1-3), 8-18. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684447>
- Ascierto, P. A., Accorona, R., Botti, G., Farina, D., Fossati, P., Gatta, G., . . . Vanella, V. (2017). Mucosal melanoma of the head and neck. *Crit Rev Oncol Hematol*, 112, 136-152. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.01.019
- Ascierto, P. A., Schadendorf, D., Berking, C., Agarwala, S. S., van Herpen, C. M., Queirolo, P., . . . Dummer, R. (2013). MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol*, 14(3), 249-256. doi:10.1016/S1470-2045(13)70024-X
- Axell, T., & Hedin, C. A. (1982). Epidemiologic study of excessive oral melanin pigmentation with special reference to the influence of tobacco habits. *Scand J Dent Res*, 90(6), 434-442. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6961509>
- Azzola, M. F., Shaw, H. M., Thompson, J. F., Soong, S. J., Scolyer, R. A., Watson, G. F., . . . Zhang, Y. (2003). Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer*, 97(6), 1488-1498. doi:10.1002/cncr.11196
- Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(6), 505-510. doi:10.1038/nrm1666
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., . . . Sondak, V. K. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27(36), 6199-6206. doi:10.1200/JCO.2009.23.4799
- Basu, A., & Krishnamurthy, S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids*, 2010. doi:10.4061/2010/201367
- Bates, S., & Vousden, K. H. (1999). Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 55(1), 28-37. doi:10.1007/s000180050267
- Batsakis, J. G., Regezi, J. A., Solomon, A. R., & Rice, D. H. (1982). The pathology of head and neck tumors: mucosal melanomas, part 13. *Head Neck Surg*, 4(5), 404-418. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7096100>
- Bergmann, N., Delbridge, C., Gempt, J., Feuchtinger, A., Walch, A., Schirmer, L., . . . Schlegel, J. (2020). The Intratumoral Heterogeneity Reflects the Intertumoral Subtypes of Glioblastoma Multiforme: A Regional Immunohistochemistry Analysis. *Front Oncol*, 10, 494. doi:10.3389/fonc.2020.00494
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2), 474-482. doi:10.1006/abbi.1993.1311
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., . . . Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15524-15529. doi:10.1073/pnas.242606799
- Carvajal, R. D., Spencer, S. A., & Lydiatt, W. (2012). Mucosal melanoma: a clinically and biologically unique disease entity. *J Natl Compr Canc Netw*, 10(3), 345-356. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393195>

- Casiraghi, O., & Lefevre, M. (2009). [Undifferentiated malignant round cell tumors of the sinonasal tract and nasopharynx]. *Ann Pathol*, 29(4), 296-312. doi:10.1016/j.annpat.2009.09.004
- Chadha, M., Hilaris, B., Nori, D., Shiu, M. H., & Anderson, L. L. (1990). Role of brachytherapy in malignant melanoma: a preliminary report. *J Surg Oncol*, 43(4), 223-227. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2325420>
- Chaitanya, G. V., Steven, A. J., & Babu, P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal*, 8, 31. doi:10.1186/1478-811X-8-31
- Chang, A. E., Karnell, L. H., & Menck, H. R. (1998). 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*, 83(8), 1664-1678. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781962>
- Christopher, A. F., Kaur, R. P., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V., & Bansal, P. (2016). MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res*, 7(2), 68-74. doi:10.4103/2229-3485.179431
- Ciarrocchi, A., Pietroletti, R., Carlei, F., & Amicucci, G. (2017). Extensive surgery and lymphadenectomy do not improve survival in primary melanoma of the anorectum: results from analysis of a large database (SEER). *Colorectal Dis*, 19(2), 158-164. doi:10.1111/codi.13412
- Clark, W. H., Jr., From, L., Bernardino, E. A., & Mihm, M. C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*, 29(3), 705-727. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5773814>
- Conley, J. J. (1989). Melanomas of the mucous membrane of the head and neck. *Laryngoscope*, 99(12), 1248-1254. doi:10.1288/00005537-198912000-00008
- Dahlgren, L., Schedvins, K., Kanter-Lewensohn, L., Dalianis, T., & Ragnarsson-Olding, B. K. (2005). Human papilloma virus (HPV) is rarely detected in malignant melanomas of sun sheltered mucosal membranes. *Acta Oncol*, 44(7), 694-699. doi:10.1080/02841860500247461
- Damia, G., Filiberti, L., Vikhanskaya, F., Carrassa, L., Taya, Y., D'Incalci, M., & Broggin, M. (2001). Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia*, 3(1), 10-16. doi:10.1038/sj.neo.7900122
- Dong, X. D., Tyler, D., Johnson, J. L., DeMatos, P., & Seigler, H. F. (2000). Analysis of prognosis and disease progression after local recurrence of melanoma. *Cancer*, 88(5), 1063-1071. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699896>
- Dulon, M., Weichenthal, M., Blettner, M., Breitbart, M., Hetzer, M., Greinert, R., . . . Breitbart, E. W. (2002). Sun exposure and number of nevi in 5- to 6-year-old European children. *J Clin Epidemiol*, 55(11), 1075-1081. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507670>
- Eberle, J., & Hossini, A. M. (2008). Expression and function of bcl-2 proteins in melanoma. *Curr Genomics*, 9(6), 409-419. doi:10.2174/138920208785699571
- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17(6), 1471-1474. doi:10.1245/s10434-010-0985-4
- Eggermont, A. M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J. J., Dummer, R., Wolchok, J. D., Schmidt, H., . . . Testori, A. (2016). Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med*, 375(19), 1845-1855. doi:10.1056/NEJMoa1611299
- Eggermont, A. M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J. J., Dummer, R., Wolchok, J. D., Schmidt, H., . . . Testori, A. (2015). Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of

- high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 16(5), 522-530. doi:10.1016/S1470-2045(15)70122-1
- Eggermont, A. M., Suci, S., Santinami, M., Testori, A., Kruit, W. H., Marsden, J., . . . Group, E. M. (2008). Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet*, 372(9633), 117-126. doi:10.1016/S0140-6736(08)61033-8
- Farshad, A., Burg, G., Panizzon, R., & Dummer, R. (2002). A retrospective study of 150 patients with lentigo maligna and lentigo maligna melanoma and the efficacy of radiotherapy using Grenz or soft X-rays. *Br J Dermatol*, 146(6), 1042-1046. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072074>
- Felicetti, F., Errico, M. C., Segnalini, P., Mattia, G., & Care, A. (2008). MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8(11), 1759-1765. doi:10.1586/14737140.8.11.1759
- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*, 22(3), 377-388. doi:10.1038/cdd.2014.150
- Flaherty, L. E., Othus, M., Atkins, M. B., Tuthill, R. J., Thompson, J. A., Vetto, J. T., . . . Sondak, V. K. (2014). Southwest Oncology Group S0008: a phase III trial of high-dose interferon Alfa-2b versus cisplatin, vinblastine, and dacarbazine, plus interleukin-2 and interferon in patients with high-risk melanoma--an intergroup study of cancer and leukemia Group B, Children's Oncology Group, Eastern Cooperative Oncology Group, and Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol*, 32(33), 3771-3778. doi:10.1200/JCO.2013.53.1590
- Fogarty, G. B., & Tartaglia, C. (2006). The utility of magnetic resonance imaging in the detection of brain metastases in the staging of cutaneous melanoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 18(4), 360-362. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16703756>
- Foot, M. C., Burmeister, B., Burmeister, E., Bayley, G., & Smithers, B. M. (2008). Desmoplastic melanoma: the role of radiotherapy in improving local control. *ANZ J Surg*, 78(4), 273-276. doi:10.1111/j.1445-2197.2008.04436.x
- Francken, A. B., Accortt, N. A., Shaw, H. M., Colman, M. H., Wiener, M., Soong, S. J., . . . Thompson, J. F. (2008). Follow-up schedules after treatment for malignant melanoma. *Br J Surg*, 95(11), 1401-1407. doi:10.1002/bjs.6347
- Fricke, M., O'Prey, J., Tolkovsky, A. M., & Ryan, K. M. (2010). Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability. *Cell Death Dis*, 1, e59. doi:10.1038/cddis.2010.38
- Fritsche, M. K. (2019). p53 Signalweg in Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen.
- Fritsche, M. K., & Knopf, A. (2017). The Tumor Suppressor p53 in Mucosal Melanoma of the Head and Neck. *Genes (Basel)*, 8(12). doi:10.3390/genes8120384
- Fritsche, M. K., Metzler, V., Becker, K., Plettenberg, C., Heiser, C., Hofauer, B., & Knopf, A. (2015). Cisplatin fails to induce puma mediated apoptosis in mucosal melanomas. *Oncotarget*, 6(12), 9887-9896. doi:10.18632/oncotarget.3195
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M. S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., & Melchi, C. F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*, 41(1), 45-60. doi:10.1016/j.ejca.2004.10.016
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M. S., Pasquini, P., Zanetti, R., Masini, C., . . . Melchi, C. F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*, 41(14), 2040-2059. doi:10.1016/j.ejca.2005.03.034
- Garbe, C., & Blum, A. (2001). Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14(5), 280-290. doi:10.1159/000056358

- Gillies, R. J., Didier, N., & Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*, *159*(1), 109-113. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3812988>
- Gilligan, D., & Slevin, N. J. (1991). Radical radiotherapy for 28 cases of mucosal melanoma in the nasal cavity and sinuses. *Br J Radiol*, *64*(768), 1147-1150. doi:10.1259/0007-1285-64-768-1147
- Giraud, G., Ramqvist, T., Ragnarsson-Olding, B., & Dalianis, T. (2008). DNA from BK virus and JC virus and from KI, WU, and MC polyomaviruses as well as from simian virus 40 is not detected in non-UV-light-associated primary malignant melanomas of mucous membranes. *J Clin Microbiol*, *46*(11), 3595-3598. doi:10.1128/JCM.01635-08
- Goel, V. K., Lazar, A. J., Warneke, C. L., Redston, M. S., & Haluska, F. G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*, *126*(1), 154-160. doi:10.1038/sj.jid.5700026
- Gondak, R. O., da Silva-Jorge, R., Jorge, J., Lopes, M. A., & Vargas, P. A. (2012). Oral pigmented lesions: Clinicopathologic features and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, *17*(6), e919-924. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22549672>
- Gore, M. R., & Zanation, A. M. (2012). Survival in Sinonasal Melanoma: A Meta-analysis. *J Neurol Surg B Skull Base*, *73*(3), 157-162. doi:10.1055/s-0032-1301400
- Gray-Schopfer, V. C., Cheong, S. C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z. A., . . . Bennett, D. C. (2006). Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer*, *95*(4), 496-505. doi:10.1038/sj.bjc.6603283
- Grob, J. J., Dreno, B., de la Salmoniere, P., Delaunay, M., Cupissol, D., Guillot, B., . . . Bonerandi, J. J. (1998). Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma. *Lancet*, *351*(9120), 1905-1910. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9654256>
- Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, *13*(15), 1899-1911. doi:10.1101/gad.13.15.1899
- Gru, A. A., Becker, N., Dehner, L. P., & Pfeifer, J. D. (2014). Mucosal melanoma: correlation of clinicopathologic, prognostic, and molecular features. *Melanoma Res*, *24*(4), 360-370. doi:10.1097/CMR.0000000000000082
- Gwosdz, C., Scheckenbach, K., Lieven, O., Reifenberger, J., Knopf, A., Bier, H., & Balz, V. (2006). Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer*, *118*(3), 577-582. doi:10.1002/ijc.21366
- Hanniford, D., Segura, M. F., Zhong, J., Philips, E., Jirau-Serrano, X., Darvishian, F., . . . Hernando, E. (2015). Identification of metastasis-suppressive microRNAs in primary melanoma. *J Natl Cancer Inst*, *107*(3). doi:10.1093/jnci/dju494
- Harwood, A. R. (1983). Conventional fractionated radiotherapy for 51 patients with lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *9*(7), 1019-1021. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6863069>
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., & Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, *116*(Pt 20), 4077-4085. doi:10.1242/jcs.00739
- Holmstrom, M., & Lund, V. J. (1991). Malignant melanomas of the nasal cavity after occupational exposure to formaldehyde. *Br J Ind Med*, *48*(1), 9-11. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1993163>
- Hossini, A. M., Eberle, J., Fecker, L. F., Orfanos, C. E., & Geilen, C. C. (2003). Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts. *FEBS Lett*, *553*(3), 250-256. doi:10.1016/s0014-5793(03)01017-2

- Jeon, B. N., Yoon, J. H., Han, D., Kim, M. K., Kim, Y., Choi, S. H., . . . Hur, M. W. (2017). ZNF509S1 downregulates PUMA by inhibiting p53K382 acetylation and p53-DNA binding. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1860(9), 962-972. doi:10.1016/j.bbagr.2017.07.008
- Kerr, E. H., Hameed, O., Lewis, J. S., Jr., Bartolucci, A. A., Wang, D., & Said-Al-Naief, N. (2012). Head and neck mucosal malignant melanoma: clinicopathologic correlation with contemporary review of prognostic indicators. *Int J Surg Pathol*, 20(1), 37-46. doi:10.1177/1066896911417970
- Kitazumi, I., & Tsukahara, M. (2011). Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J*, 278(3), 427-441. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07975.x
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., . . . Deter, R. L. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4(2), 151-175. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18188003>
- Klionsky, D. J., & Codogno, P. (2013). The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun*, 5(5), 427-433. doi:10.1159/000351979
- Knopf, A., Plettenberg, C., Pickhard, A., Bas, M., Reifenberger, J., Bier, H., & Balz, V. (2011). Analysis of the functional integrity of the p53 tumor-suppressor gene in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 21(5), 380-388. doi:10.1097/CMR.0b013e328347ee04
- Kroemer, G., Marino, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40(2), 280-293. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023
- Kunte, C., Geimer, T., Baumert, J., Konz, B., Volkenandt, M., Flaig, M., . . . Schmid-Wendtner, M. H. (2010). Prognostic factors associated with sentinel lymph node positivity and effect of sentinel status on survival: an analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res*, 20(4), 330-337. doi:10.1097/CMR.0b013e32833ba9ff
- Kurbanov, B. M., Geilen, C. C., Fecker, L. F., Orfanos, C. E., & Eberle, J. (2005). Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Invest Dermatol*, 125(5), 1010-1019. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23900.x
- Kvaskoff, M., Whiteman, D. C., Zhao, Z. Z., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Hayward, N. K., & Duffy, D. L. (2011). Polymorphisms in nevus-associated genes MTAP, PLA2G6, and IRF4 and the risk of invasive cutaneous melanoma. *Twin Res Hum Genet*, 14(5), 422-432. doi:10.1375/twin.14.5.422
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
- Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*, 30(4), 363-364. doi:10.1038/ng865
- Lakhter, A. J., Sahu, R. P., Sun, Y., Kaufmann, W. K., Androphy, E. J., Travers, J. B., & Naidu, S. R. (2013). Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation. *J Invest Dermatol*, 133(9), 2247-2254. doi:10.1038/jid.2013.56
- Leiter, U., Buettner, P. G., Eigentler, T. K., Brocker, E. B., Voit, C., Gollnick, H., . . . Garbe, C. (2012). Hazard rates for recurrent and secondary cutaneous melanoma: an analysis of 33,384 patients in the German Central Malignant Melanoma Registry. *J Am Acad Dermatol*, 66(1), 37-45. doi:10.1016/j.jaad.2010.09.772
- Leiter, U., Schmid, R. M., Kaskel, P., Peter, R. U., & Krahn, G. (2000). Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res*, 292(5), 225-232. doi:10.1007/s004030050479

- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF). (2014). S3-Leitlinie Prävention von Hautkrebs, Langversion 1.1, AWMF Registernummer: 032/052OL. Retrieved from <http://leitlinienprogrammonkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
- Leitlinienprogramm Onkologie, D. K., Deutsche Krebshilfe, AWMF. (2018). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.1, AWMF Registernummer: 032/024OL. Retrieved from <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/>
- Lengyel, E., Gilde, K., Remenar, E., & Esik, O. (2003). Malignant mucosal melanoma of the head and neck. *Pathol Oncol Res*, 9(1), 7-12. doi:PAOR.2003.9.1.0007
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), 323-331. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039259>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15-20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
- Lohrum, M. A., & Vousden, K. H. (1999). Regulation and activation of p53 and its family members. *Cell Death Differ*, 6(12), 1162-1168. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637431>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., . . . Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834-838. doi:10.1038/nature03702
- Lundberg, R., Brytting, M., Dahlgren, L., Kanter-Lewensohn, L., Schloss, L., Dalianis, T., & Ragnarsson-Olding, B. (2006). Human herpes virus DNA is rarely detected in non-UV light-associated primary malignant melanomas of mucous membranes. *Anticancer Res*, 26(5B), 3627-3631. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17094377>
- Mauvezin, C., & Neufeld, T. P. (2015). Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11(8), 1437-1438. doi:10.1080/15548627.2015.1066957
- Mays, M. P., Martin, R. C., Burton, A., Ginter, B., Edwards, M. J., Reintgen, D. S., . . . Scoggins, C. R. (2010). Should all patients with melanoma between 1 and 2 mm Breslow thickness undergo sentinel lymph node biopsy? *Cancer*, 116(6), 1535-1544. doi:10.1002/cncr.24895
- McMasters, K. M., Wong, S. L., Edwards, M. J., Ross, M. I., Chao, C., Noyes, R. D., . . . Reintgen, D. S. (2001). Factors that predict the presence of sentinel lymph node metastasis in patients with melanoma. *Surgery*, 130(2), 151-156. doi:10.1067/msy.2001.115830
- Meijer, H. A., Kong, Y. W., Lu, W. T., Wilczynska, A., Spriggs, R. V., Robinson, S. W., . . . Bushell, M. (2013). Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science*, 340(6128), 82-85. doi:10.1126/science.1231197
- Mißner, S. (2004). Analyse verschiedener Screeningmethoden zur Früherkennung von Netzhautschäden bei Langzeittherapie mit Chloroquin und Hydroxychloroquin.
- Morton, D. L., Thompson, J. F., Cochran, A. J., Mozzillo, N., Elashoff, R., Essner, R., . . . Group, M. (2006). Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*, 355(13), 1307-1317. doi:10.1056/NEJMoa060992
- Morton, D. L., Wanek, L., Nizze, J. A., Elashoff, R. M., & Wong, J. H. (1991). Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann*

- Surg*, 214(4), 491-499; discussion 499-501. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1953101>
- Mzayek, F., Deng, H., Mather, F. J., Wasilevich, E. C., Liu, H., Hadi, C. M., . . . Krogstad, D. J. (2007). Randomized dose-ranging controlled trial of AQ-13, a candidate antimalarial, and chloroquine in healthy volunteers. *PLoS Clin Trials*, 2(1), e6. doi:10.1371/journal.pctr.0020006
- Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7(3), 683-694. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463392>
- Neugut, A. I., & Prigerson, H. G. (2017). Curative, Life-Extending, and Palliative Chemotherapy: New Outcomes Need New Names. *Oncologist*, 22(8), 883-885. doi:10.1634/theoncologist.2017-0041
- Nowecki, Z. I., Rutkowski, P., Kulik, J., Siedlecki, J. A., & Ruka, W. (2008). Molecular and biochemical testing in stage III melanoma: multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of lymph fluid after lymph node dissection and preoperative serum lactate dehydrogenase level. *Br J Dermatol*, 159(3), 597-605. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08710.x
- Overgaard, J., Gonzalez Gonzalez, D., Hulshof, M. C., Arcangeli, G., Dahl, O., Mella, O., & Bentzen, S. M. (2009). Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. 1996. *Int J Hyperthermia*, 25(5), 323-334. doi:10.1080/02656730903091986
- Papaspyrou, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Werner, J. A., Hauschild, A., & Egberts, F. (2011). Mucosal melanomas of the head and neck: new aspects of the clinical outcome, molecular pathology, and treatment with c-kit inhibitors. *Melanoma Res*, 21(6), 475-482. doi:10.1097/CMR.0b013e32834b58cf
- Pehamberger, H., Soyer, H. P., Steiner, A., Kofler, R., Binder, M., Mischer, P., . . . Wolff, K. (1998). Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 16(4), 1425-1429. doi:10.1200/JCO.1998.16.4.1425
- Penel, N., Mallet, Y., Mirabel, X., Van, J. T., & Lefebvre, J. L. (2006). Primary mucosal melanoma of head and neck: prognostic value of clear margins. *Laryngoscope*, 116(6), 993-995. doi:10.1097/01.mlg.0000217236.06585.a9
- Petro, A., Schwartz, J., & Johnson, T. (2004). Current melanoma staging. *Clin Dermatol*, 22(3), 223-227. doi:10.1016/j.clindermatol.2003.12.010
- Pfister, D. G., Ang, K. K., Brizel, D. M., Burtness, B., Cmelak, A. J., Colevas, A. D., . . . National Comprehensive Cancer, N. (2012). Mucosal melanoma of the head and neck. *J Natl Compr Canc Netw*, 10(3), 320-338. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393194>
- Prives, C., & Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol*, 187(1), 112-126. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<112::AID-PATH250>3.0.CO;2-3
- Raisova, M., Goltz, G., Bektas, M., Bielawska, A., Riebeling, C., Hossini, A. M., . . . Geilen, C. C. (2002). Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett*, 516(1-3), 47-52. doi:10.1016/s0014-5793(02)02472-9
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7), 3116-3120. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/91164>
- Rivers, J. K. (2004). Is there more than one road to melanoma? *Lancet*, 363(9410), 728-730. doi:10.1016/S0140-6736(04)15649-3

- Robert-Koch-Institut, Z. f. K. i. (2016). Bericht zum Krebs-geschehen in Deutschland 2016.
- Rohrbeck, L., Gong, J. N., Lee, E. F., Kueh, A. J., Behren, A., Tai, L., . . . Herold, M. J. (2016). Hepatocyte growth factor renders BRAF mutant human melanoma cell lines resistant to PLX4032 by downregulating the pro-apoptotic BH3-only proteins PUMA and BIM. *Cell Death Differ*, 23(12), 2054-2062. doi:10.1038/cdd.2016.96
- Rule, W. G., Allred, J. B., Pockaj, B. A., Markovic, S. N., DiCaudo, D. J., Erickson, L. A., . . . Schild, S. E. (2016). Results of NCCTG N0275 (Alliance) - a phase II trial evaluating resection followed by adjuvant radiation therapy for patients with desmoplastic melanoma. *Cancer Med*, 5(8), 1890-1896. doi:10.1002/cam4.783
- Saftig, P., & Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(9), 623-635. doi:10.1038/nrm2745
- Sarkar, S., Dubaybo, H., Ali, S., Goncalves, P., Kollepara, S. L., Sethi, S., . . . Li, Y. (2013). Down-regulation of miR-221 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through up-regulation of PTEN, p27(kip1), p57(kip2), and PUMA. *Am J Cancer Res*, 3(5), 465-477. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24224124>
- Schlamann, M., Loquai, C., Goericke, S., Forsting, M., & Wanke, I. (2008). [Cerebral MRI in neurological asymptomatic patients with malignant melanoma]. *Rofo*, 180(2), 143-147. doi:10.1055/s-2007-963711
- Schmid-Wendtner, M. H., Brunner, B., Konz, B., Kaudewitz, P., Wendtner, C. M., Peter, R. U., . . . Volkenandt, M. (2000). Fractionated radiotherapy of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma in 64 patients. *J Am Acad Dermatol*, 43(3), 477-482. doi:10.1067/mjd.2000.106241
- Seetharamu, N., Ott, P. A., & Pavlick, A. C. (2010). Mucosal melanomas: a case-based review of the literature. *Oncologist*, 15(7), 772-781. doi:10.1634/theoncologist.2010-0067
- Segura, M. F., Greenwald, H. S., Hanniford, D., Osman, I., & Hernando, E. (2012). MicroRNA and cutaneous melanoma: from discovery to prognosis and therapy. *Carcinogenesis*, 33(10), 1823-1832. doi:10.1093/carcin/bgs205
- Selzer, E., Schlagbauer-Wadl, H., Okamoto, I., Pehamberger, H., Potter, R., & Jansen, B. (1998). Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res*, 8(3), 197-203. doi:10.1097/00008390-199806000-00001
- Shah, J. P., Huvos, A. G., & Strong, E. W. (1977). Mucosal melanomas of the head and neck. *Am J Surg*, 134(4), 531-535. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/911040>
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279. doi:10.1038/sj.onc.1206933
- Skalicky, S. E., Holt, P. E., Giblin, M., Taylor, S., & Conway, R. M. (2008). Australian Cancer Network clinical practice guidelines for the management of ocular and periocular melanoma: an evidence-based literature analysis. *Clin Exp Ophthalmol*, 36(7), 646-658. doi:10.1111/j.1442-9071.2008.01815.x
- Sladden, M. J., Balch, C., Barzilai, D. A., Berg, D., Freiman, A., Handiside, T., . . . Thompson, J. F. (2009). Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev*(4), CD004835. doi:10.1002/14651858.CD004835.pub2
- Small, E. M., Frost, R. J., & Olson, E. N. (2010). MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*, 121(8), 1022-1032. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.889048
- Sundelin, S. P., & Terman, A. (2002). Different effects of chloroquine and hydroxychloroquine on lysosomal function in cultured retinal pigment epithelial cells. *APMIS*, 110(6), 481-489. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193209>

- Tacastacas, J. D., Bray, J., Cohen, Y. K., Arbesman, J., Kim, J., Koon, H. B., . . . Gerstenblith, M. R. (2014). Update on primary mucosal melanoma. *J Am Acad Dermatol*, *71*(2), 366-375. doi:10.1016/j.jaad.2014.03.031
- Terzian, T., Torchia, E. C., Dai, D., Robinson, S. E., Murao, K., Stiegmann, R. A., . . . Box, N. F. (2010). p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation. *Pigment Cell Melanoma Res*, *23*(6), 781-794. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00773.x
- Testori, A., De Salvo, G. L., Montesco, M. C., Trifiro, G., Mocellin, S., Landi, G., . . . Italian Melanoma, I. (2009). Clinical considerations on sentinel node biopsy in melanoma from an Italian multicentric study on 1,313 patients (SOLISM-IMI). *Ann Surg Oncol*, *16*(7), 2018-2027. doi:10.1245/s10434-008-0273-8
- Thorburn, J., Andrysik, Z., Staskiewicz, L., Gump, J., Maycotte, P., Oberst, A., . . . Thorburn, A. (2014). Autophagy controls the kinetics and extent of mitochondrial apoptosis by regulating PUMA levels. *Cell Rep*, *7*(1), 45-52. doi:10.1016/j.celrep.2014.02.036
- Trepel, M., Groscurth, P., Malipiero, U., Gulbins, E., Dichgans, J., & Weller, M. (1998). Chemosensitivity of human malignant glioma: modulation by p53 gene transfer. *J Neurooncol*, *39*(1), 19-32. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9760067>
- Tronnier, M., Garbe, C., Brocker, E. B., Stadler, R., Steinkraus, V., Soyer, H. P., & Wolff, H. H. (1997). [Standards in histopathologic diagnosis of malignant melanomas. Recommendations of the Working Group of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatologic Society]. *Hautarzt*, *48*(10), 720-729. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9441164>
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L. A., & Fisher, D. E. (2012). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev*, *26*(11), 1131-1155. doi:10.1101/gad.191999.112
- Turley, R. S., Raymond, A. K., & Tyler, D. S. (2011). Regional treatment strategies for in-transit melanoma metastasis. *Surg Oncol Clin N Am*, *20*(1), 79-103. doi:10.1016/j.soc.2010.09.008
- Urien, S., & Lokiec, F. (2004). Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *Br J Clin Pharmacol*, *57*(6), 756-763. doi:10.1111/j.1365-2125.2004.02082.x
- Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J., & Marzo, I. (2013). Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J Biol Chem*, *288*(7), 4935-4946. doi:10.1074/jbc.M112.422204
- Veronesi, U., & Cascinelli, N. (1991). Narrow excision (1-cm margin). A safe procedure for thin cutaneous melanoma. *Arch Surg*, *126*(4), 438-441. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2009058>
- Vongtama, R., Safa, A., Gallardo, D., Calcaterra, T., & Juillard, G. (2003). Efficacy of radiation therapy in the local control of desmoplastic malignant melanoma. *Head Neck*, *25*(6), 423-428. doi:10.1002/hed.10263
- Wang, B., Guo, H., Ling, L., Ji, J., Niu, J., & Gu, Y. (2019). The Chronic Adverse Effect of Chloroquine on Kidney in Rats through an Autophagy Dependent and Independent Pathways. *Nephron*, 1-12. doi:10.1159/000503882
- Warycha, M. A., Zakrzewski, J., Ni, Q., Shapiro, R. L., Berman, R. S., Pavlick, A. C., . . . Osman, I. (2009). Meta-analysis of sentinel lymph node positivity in thin melanoma (<or=1 mm). *Cancer*, *115*(4), 869-879. doi:10.1002/cncr.24044
- Wechter, M. E., Gruber, S. B., Haefner, H. K., Lowe, L., Schwartz, J. L., Reynolds, K. R., . . . Johnson, T. M. (2004). Vulvar melanoma: a report of 20 cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*, *50*(4), 554-562. doi:10.1016/j.jaad.2003.07.026

- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E., & Kluck, R. M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*, 1813(4), 521-531. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.12.019
- White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 12(6), 401-410. doi:10.1038/nrc3262
- Whiteman, D. C., Watt, P., Purdie, D. M., Hughes, M. C., Hayward, N. K., & Green, A. C. (2003). Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 95(11), 806-812. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783935>
- Wolter, K. G., Verhaegen, M., Fernandez, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Riblett, M., de la Vega, C. M., . . . Soengas, M. S. (2007). Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ*, 14(9), 1605-1616. doi:10.1038/sj.cdd.4402163
- Wu, C. C., Lee, S., Malladi, S., Chen, M. D., Mastrandrea, N. J., Zhang, Z., & Bratton, S. B. (2016). The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. *Nat Commun*, 7, 13565. doi:10.1038/ncomms13565
- Xing, Y., Bronstein, Y., Ross, M. I., Askew, R. L., Lee, J. E., Gershenwald, J. E., . . . Cormier, J. N. (2011). Contemporary diagnostic imaging modalities for the staging and surveillance of melanoma patients: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 103(2), 129-142. doi:10.1093/jnci/djq455
- Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 47-59. doi:10.1038/nrm2308
- Yu, J., & Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S71-83. doi:10.1038/onc.2009.45
- Zeng, Y., Wagner, E. J., & Cullen, B. R. (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*, 9(6), 1327-1333. doi:10.1016/s1097-2765(02)00541-5
- Zhang, C., Zhang, J., Zhang, A., Wang, Y., Han, L., You, Y., . . . Kang, C. (2010). PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers. *Int J Oncol*, 37(6), 1621-1626. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042732>
- Zhang, C. Z., Kang, C. S., Pu, P. Y., Wang, G. X., Jia, Z. F., Zhang, A. L., . . . Xu, P. (2009). [Inhibitory effect of knocking down microRNA-221 and microRNA-222 on glioma cell growth in vitro and in vivo]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 31(10), 721-726. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20021821>
- Zhang, C. Z., Zhang, J. X., Zhang, A. L., Shi, Z. D., Han, L., Jia, Z. F., . . . Kang, C. S. (2010). MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol Cancer*, 9, 229. doi:10.1186/1476-4598-9-229

8 Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Hals- Nasen- Ohren- und Poliklinik des Universitätsklinikums Rechts der Isar unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Knopf durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich vorrangig Herrn Prof. Dr. Knopf für die Bereitstellung dieses reizvollen und vielseitigen Themas danken. Besonders dankbar bin ich für die äußerst gute Betreuung mit vielen förderlichen Ratschlägen und der verlässlichen und immerwährenden Unterstützung.

Frau Dr. Marie Kristin Fritsche möchte ich von Herzen für ihre begeisterte Unterstützung danken, besonders dann, wenn die Zeit knapp bemessen war. Neben ihrer Geduld, konstruktiven Kritik und motivierenden Worte waren auch ihre Offenheit und Nähe für mich sehr wertvoll.

Weiterer Dank gilt meinem Mentor Prof. Dr. med. Clemens Heiser für die Begleitung dieser Arbeit.

Auch bei meiner Familie möchte ich mich besonders bedanken für ihr Verständnis, ihre Rücksichtnahme und die moralische Unterstützung in jeder Hinsicht.

Mein Dank gilt auch meinem Ehemann, der mich mit geduldigem Zuhören und uneingeschränkten Aufmunterungen immerzu unterstützt und motiviert hat.

9 Eidesstaatliche Erklärung

Ich, Jozefina Maria Lengauer, erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung der Fakultät für Medizin, der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Die Bedeutung der miRNA-221 und -222 für die Puma vermittelte Apoptose in
Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen

in der Hals-, Nasen-, Ohren- und Poliklinik des Universitätsklinikums Rechts der Isar unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Andreas Knopf ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 7 Abs. 6 und 7 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer*innen für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vollständige Dissertation wurde nicht veröffentlicht.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe keine Kenntnis über ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren in Bezug auf wissenschaftsbezogene Straftaten gegen mich oder eine rechtskräftige strafrechtliche Verurteilung mit Wissenschaftsbezug.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung sowie die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und für den Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten der TUM sind mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 27 PromO (Nichtigkeit der Promotion) und § 28 PromO (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich einverstanden.

München, 13.04.2023