

# **Die Rolle des Enhancer Zeste Homologs 2 im malignen Melanom**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Rebecca Hugel**

aus Potsdam

2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 2007 bis September 2013 an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie in der klinischen Forschergruppe Tumormunologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin unter Leitung von Prof. Dr. Peter Walden durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Walden
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 15.12.2015

## Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Peter Walden für die Möglichkeit der Promotion innerhalb seiner Arbeitsgruppe „Tumorimmunologie“ sowie für die zahlreichen Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Rupert Mutzel an der Freien Universität Berlin im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie für die Übernahme der Betreuung.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Florian O. Losch, Melanie Selka, Anja Freier, Dr. Saulius Jarmalavicius, Arthur O'Connor, Ulrike Fritz, Dr. Yvonne Welte und Sabrina Wendt für ihre Unterstützung und hilfreichen Ratschläge.

Florian, ich danke Dir für Deine Diskussionsbereitschaft, Deine Anregungen, für die Hilfestellung am Durchflusszytometer sowie dafür, dass Du mir die Welt der Molekularbiologie näher gebracht hast.

Melli, ich danke Dir für Deine stete Hilfsbereitschaft, Deine Motivationsnachrichten, Deine zahlreichen Tipps im Labor sowie für das Korrekturlesen.

Yvonne, Dir danke ich ganz besonders für Deine moralische Unterstützung in Form verbaler Streicheleinheiten, aber auch für die Bereitstellung der Transkriptomdaten und für das Korrekturlesen.

Saulius, der „Mann zu meiner rechten Seite“. Vielen Dank, dass Du mit mir Deine Erfahrungen rund um das Thema Proteinchemie und Massenspektrometrie geteilt hast und immer für einen Spaß zu haben warst.

Anja, ich danke Dir für Deine Einweisung am Fluoreszenzmikroskop und die Unterstützung beim Umgang mit der Software DNASTAR.

Zudem bedanke ich mich bei Arthur O'Connor und Ulrike Fritz für ihre Unterstützung bei der Durchführung experimenteller Arbeiten und für die vielen kleinen Dinge, die sie getan haben, um den Laborbetrieb aufrechtzuerhalten.

Ich danke der AG Kramer, insbesondere Sabrina Wendt und Sebastian Jäschke, dass ich bei ihnen die real-time PCR-Analysen durchführen durfte und für die Hilfestellung bei der Nutzung des Gerätes sowie der Auswertung der Daten.

Mein Dank gilt außerdem allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der gesamten Arbeitsgruppe sowie den Arbeitsgruppen AG Apoptose und AG Kutane Lymphome für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Danksagung</b>	<b>III</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Tumore und Karzinogenese	3
1.2 Das maligne Melanom	4
1.2.1 Klassifikation	4
1.2.2 Stadieneinteilung	5
1.2.3 Diagnostik	6
1.2.4 Epidemiologie und Ätiologie	7
1.2.5 Genetische Veränderungen	8
1.2.6 Therapie	9
1.3 Epigenetik	11
1.3.1 DNA-Methylierung	12
1.3.2 Histonmodifikation	13
1.3.3 Die Proteine der Polycombgruppe	15
1.3.4 Histonmodifikation durch die PcG-Proteine	16
1.3.5 Rekrutierung und Regulierung der PcG-Proteine	18
1.3.6 EZH2 und Krebs	19
1.4 Zielstellung	22
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Materialien	23
2.2 Zellbiologische Materialien und Methoden	25
2.2.1 Zellen und Ziellinien	25
2.2.2 Antikörper	26
2.2.3 siRNA	26
2.2.4 Zellkultur	26
2.2.5 DNA-Transfektion	26
2.2.6 siRNA-Transfektion	27
2.2.7 MTT-Proliferationsassay	27
2.2.8 Migrationsassay	27
2.2.9 Durchflusszytometrie	28
2.2.10 Probenpräparation und Fluoreszenzmikroskopie	28
2.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden	29
2.3.1 Puffer und Lösungen	29
2.3.2 Enzyme	29
2.3.3 Oligonukleotidprimer	30
2.3.4 RNA-Extraktion	30
2.3.5 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	31
2.3.6 Reverse Transkription	31
2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion	32
2.3.8 Quantitative real-time PCR	34
2.3.9 Genomweite Genexpressionsanalyse	35
2.3.10 TOPO TA-Klonierung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	35
2.3.11 Kolonie-PCR	36
2.3.12 Plasmidisolierung	37
2.3.13 DNA-Restriktionsverdau	37
2.3.14 Auftrennung, Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	37
2.3.15 Ligation	38
2.3.16 Sequenzierung	38

2.3.17	Klonierungsstrategie	39
2.4	Proteinbiochemische Materialien und Methoden	40
2.4.1	Puffer und Lösungen	40
2.4.2	Antikörper	41
2.4.3	Zelllyse	42
2.4.4	BCA-Proteinassay	42
2.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.4.6	Coomassie-Färbung	43
2.4.7	Western Blot	43
2.5	Statistische Auswertung	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	EZH2-Expression in Melanomzellen	45
3.2	Zelluläre Lokalisation von EZH2	48
3.3	siRNA-vermittelter Knockdown von EZH2	49
3.4	EZH2-Knockdown hemmt die Proliferation und Migration	50
3.5	Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems	53
3.6	Induzierte YFP-EZH2-Expression hat keinen Einfluss auf die Proliferation	57
3.7	Induzierte YFP-EZH2-Expression steigert die Migration	58
3.8	Transkriptomanalyse	60
3.9	Korrelationsanalyse zur Identifizierung von EZH2-Zielgenen	61
3.9.1	Proliferation	62
3.9.2	Migration und Invasion	63
3.9.3	Metastasierung	64
3.9.4	Angiogenese	66
3.10	Validierung der EZH2-Zielgene	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1	EZH2-Expression	71
4.2	Regulation der EZH2-Expression	72
4.3	EZH2 als Onkogen	73
4.3.1	Proliferation	73
4.3.2	Migration und Invasion	75
4.3.3	Metastasierung	77
4.3.4	Angiogenese	79
4.4	EZH2 als therapeutisches Ziel	80
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>VI</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XIX</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XX</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XXI</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>XXII</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>XXIII</b>
	<b>Anhang</b>	<b>XXIV</b>

## Zusammenfassung

EZH2 ist eine Histonmethyltransferase, die die Transkription reprimiert und an verschiedenen zellulären Prozessen wie der Stammzelldifferenzierung und frühen Embryonalentwicklung beteiligt ist. Weiterhin ist EZH2 in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert. Diese hohen Expressionslevel sind mit der Invasion und Metastasierung maligner Tumoren wie Brust- und Prostatakrebs assoziiert. Über die Expression und Rolle von EZH2 im malignen Melanom ist bisher wenig bekannt. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit die EZH2-Expression in Melanomzelllinien im Vergleich zu Melanozyten sowie den Einfluß von EZH2 auf Proliferation und Migration zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Melanomzelllinien eine stärkere EZH2-Proteinexpression aufweisen als Melanozyten. Mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wurde die zelluläre Lokalisation von EZH2 im Nukleus bestätigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der siRNA vermittelte Knockdown von EZH2 mit einer verringerten Proliferation sowie migratorischen Aktivität assoziiert ist. Es wurde ein induzierbares Expressionssystem etabliert, mit dessen Hilfe die Expression des Fusionsproteins YFP-EZH2 in den Melanomzellen nach Doxyzyklinzugabe induziert werden konnte. Melanomzellen, die YFP-EZH2 überexprimieren, migrieren schneller als die entsprechenden Zellen mit endogener EZH2-Expression. Dagegen hat die YFP-EZH2-Überexpression keinen weiteren Einfluss auf die Proliferation der Melanomzellen.

Durch Analyse von Transkriptomdaten wurden CDKN2B, TIMP3 und VASH1 als potentielle Zielgene von EZH2 identifiziert, deren mRNA-Expression invers mit der von EZH2 korrelieren. Nach Hemmung der EZH2-Expression wurde zudem bei CDKN2B, TIMP3 und VASH1 eine gesteigerte mRNA-Expression beobachtet. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass CDKN2B, TIMP3 und VASH1 unter der transkriptionellen Regulation von EZH2 stehen. Es liegt der Verdacht nahe, dass EZH2 die Karzinogenese durch epigenetische Repression dieser und anderer Zielgene vorantreibt. Prozesse wie die Proliferation, Metastasierung und Angiogenese könnten somit im malignen Melanom unter dem Einfluss der EZH2-Expression stehen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bilden die Grundlage weiterer Analysen, um EZH2 als Onkogen im malignen Melanom zu bestätigen.

## Abstract

EZH2 is a histone methyltransferase that represses transcription and is involved in various cellular processes such as stem cell differentiation and early embryonic development. Furthermore, EZH2 is overexpressed in a variety of tumors. These high levels of expression are associated with the invasion and metastasis of malignant tumors such as breast and prostate cancer. However, the expression and role of EZH2 in malignant melanoma is poorly understood. The aim of the present work was to investigate the EZH2 expression level in melanoma cell lines compared to melanocytes as well as the influence of EZH2 on proliferation and migration.

In the present work it was shown that melanoma cell lines express higher protein level of EZH2 compared to melanocytes. Using immunofluorescence microscopy analysis the cellular localization of EZH2 in the nucleus could be confirmed. Furthermore, it was shown that siRNA mediated knockdown of EZH2 is associated with decreased proliferation and migration. An inducible expression system has been established which induce the expression of the fusion protein YFP-EZH2 in melanoma cells after the addition of doxycyclin. Melanoma cells overexpressing YFP-EZH2 migrate faster than corresponding cells expressing endogenous EZH2. In contrast, the overexpression of YFP-EZH2 has no further influence on the proliferation of melanoma cells.

By analyzing the transcriptome data CDKN2B, TIMP3 and VASH1 were identified as potential EZH2 target genes, whose mRNA expression correlates inversely to that of EZH2. The inhibition of EZH2 expression resulted in increased mRNA levels of CDKN2B, TIMP3 and VASH1. These results indicate that CDKN2B, TIMP3 and VASH1 are transcriptionally regulated by EZH2. It is hypothesized that EZH2 promotes carcinogenesis due to epigenetic repression of these and other target genes. Processes such as proliferation, metastasis and angiogenesis could be influenced by the EZH2 expression level in malignant melanoma. The results presented here form the basis of further research to confirm EZH2 as an oncogene in malignant melanoma.

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumore und Karzinogenese

Ein Tumor ist eine anormale Wucherung eines Gewebes, die auf einer Deregulierung von Zellzyklusmechanismen beruht. Es wird zwischen gutartigen bzw. benignen sowie bösartigen bzw. malignen Tumoren unterschieden, die sich u.a. durch ihre Art zu wachsen voneinander unterscheiden. Während benigne Tumoren ein lokal begrenztes Wachstum zeigen, dringen maligne Tumoren in umliegendes Gewebe ein, wobei sie gesundes Gewebe verdrängen und schädigen. Oftmals lösen sich einzelne Tumorzellen vom soliden Primärtumor ab und breiten sich über die Blutgefäße aus. Dieser Prozess der Metastasierung ermöglicht die Bildung neuer Tumoren, den Metastasen, in anderen Geweben oder Organen.

Die maligne Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle (Karzinogenese) ist ein mehrstufiger Prozess, der vermutlich durch Mutationen oder Kanzerogene, z.B. Strahlung, Viren, Chemikalien, ausgelöst wird. Mutationen betreffen entweder die DNA-Sequenz oder Änderungen in der Chromatinstruktur bzw. DNA-Methylierung, die als Epimutationen bezeichnet werden. Die Anhäufung von Mutationen kann hierbei zur unkontrollierten Zellproliferation führen. Es wird zwischen der mutationsbedingten Überexpression von Onkogenen, die die Zellproliferation begünstigen, und der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die u.a. für die Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur verantwortlich sind, unterschieden. Letztlich zeigte die große Zahl der Forschungsergebnisse, dass die Tumorentstehung keinen klaren Regeln folgt.

Die Wissenschaftler Hanahan und Weinberg leiteten im Jahr 2000 aus der Vielzahl an Forschungsergebnissen Kennzeichen von Tumorzellen ab, die diese von einer normalen Zelle unterscheiden (Hanahan und Weinberg, 2000): (1) Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, (2) Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, (3) Invasion und Metastasierung, (4) unbegrenztes Replikationspotential, (5) Angiogenese und (6) Apoptosedefizienz. Im Jahr 2011 wurde das bestehende Modell um weitere Kriterien ergänzt (Hanahan und Weinberg, 2011): (7) genomische Instabilität und spezifische Mutationen, (8) tumorfördernde, entzündliche Prozesse, (9) veränderter Stoffwechsel sowie (10) Meidung des zerstörenden Immunsystems.

## 1.2 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein maligner Tumor, der aus den Melanozyten der Haut, seltener aus der Schleimhaut, der Aderhaut und der Hirnhaut hervorgeht. Melanozyten sind zur Melaninbildung befähigte Zellen, die sich in der Basalzellschicht der Epidermis befinden und ihren Ursprung in der Neuralleiste haben (Dupin und Le Douarin, 2003). Das maligne Melanom macht zwar nur etwa 5 bis 10 % aller Hauttumore aus, ist aber auf Grund seiner frühen Tendenz zur Metastasierung im fortgeschrittenen Stadium für ca. 90 % aller durch Hautkrebs verursachten Todesfälle verantwortlich (Garbe et al., 2010).

Weitere bösartige Neubildungen der Haut, die sehr viel häufiger als das maligne Melanom auftreten, entwickeln sich aus anderen Zellen der Haut und werden als nichtmelanozytäre oder epitheliale Hauttumore zusammengefasst. Die wichtigsten Formen sind auf Grund ihrer Häufigkeit das Basalzellkarzinom und das Plattenepithelkarzinom. Darüber hinaus gibt es noch weitere, seltene Hauttumore, wie beispielsweise das Merkelzellkarzinom, das Kaposi-Sarkom oder die kutanen Lymphome, die zusammen weniger als 1 % aller Hauttumore ausmachen (Kaatsch et al., 2012).

### 1.2.1 Klassifikation

Anhand morphologischer, histologischer und biologischer Kriterien wird das kutane, maligne Melanom in verschiedene Subtypen unterteilt (Clark et al., 1986).

Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) ist mit 66 % aller Melanome das am häufigsten auftretende maligne Melanom (LeBoit P.E., 2006). Das SSM wächst oft über ein bis fünf Jahre aus einem bevorstehenden Nävus (Muttermal) vorwiegend in horizontaler Richtung, bevor es die Basalmembran durchbricht und in tiefere Schichten eindringt. Es handelt sich um einen wenig erhabenen, meist scharf abgegrenzten Tumor. Später kann das SSM auch noduläre Areale aufweisen. Bei Männern tritt das SSM meist am Oberkörper, bei Frauen meist an den Unterschenkeln auf (Garbe et al., 2006).

Das noduläre Melanom (NM) ist mit etwa 10 bis 15 % das zweithäufigste, maligne Melanom (LeBoit P.E., 2006). Es hat von allen Subtypen die schlechteste Prognose, da es meist schnell vertikal wächst und frühzeitig metastasiert. Bereits der frühe Primärtumor ist ein knotiger und scharf begrenzter Hauttumor. Typisch für das NM ist eine geschwürartig veränderte, entzündliche und blutende Oberfläche. Die Tumore und die umliegende Dermis sind verstärkt vaskularisiert. Vorwiegend sind Männer im Bereich des Rumpfes, Nackens und Kopfes vom NM betroffen (Garbe et al., 2006).

Das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) macht etwa 9 % der malignen Melanome aus. Es tritt meist an sonnenexponierten Arealen, insbesondere im Gesicht und auf den Händen, auf. Das LMM ist ein unregelmäßiger und knotiger Hauttumor, dessen Größe variiert. Die Abgrenzung des LMM kann sowohl scharf als auch unscharf sein (Garbe et al., 2006).

Das akral-lentiginöse Melanom (ALM) tritt in ca. 2 % bzw. 80 % der malignen Melanome innerhalb der kaukasischen bzw. afrikanischen Bevölkerung auf (LeBoit P.E., 2006). Es ist ein Hauttumor, der vorwiegend im Bereich der Hände, Füße, Nägel und Schleimhäute zu finden ist. Das ALM wächst sehr schnell und aggressiv (Garbe et al., 2006).

Zu den klinischen Sonderformen zählen das amelanotische Melanom, das Melanom der Uvea, das aus den Melanozyten der Aderhaut hervorgeht, sowie das Schleimhautmelanom, das im Mund, im Genitalbereich, im Respirations- oder dem Gastrointestinaltrakt vorkommen kann. Diese Melanome machen etwa 5 % aller malignen Melanome aus (Barnhill und Mihm, 1993; Garbe et al., 2006).

### 1.2.2 Stadieneinteilung

Eine histologische Stadieneinteilung maligner Melanome wurde bereits im Jahr 1969 von Wallace Clark publiziert (Clark et al., 1969). Der Clark-Level gibt an, wie tief der Primärtumor in die verschiedenen Hautschichten eingedrungen ist.

**Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Clark**

Clark-Level	Eindringtiefe
I	<i>In situ</i> , Tumor befindet sich innerhalb der Epidermis
II	Invasion ins Stratum papillare der Dermis
III	Invasion ins Stratum reticulare der Dermis
IV	Invasion ins Stratum papillare und Stratum reticulare
V	Invasion in das subkutane Fettgewebe

Neben dem Clark-Level wird auch der Breslow-Index bestimmt, bei dem die Tumordicke vom Stratum granulosum der Epidermis bis zur tiefsten Stelle des Tumors gemessen wird (Breslow, 1975).

**Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Breslow**

Breslow-Index	Tumordicke [mm]
I	< 0,75
II	0,76 – 1,5
III	1,51 – 4,0
IV	> 4

Die deutsche Leitlinie für das maligne Melanom empfiehlt darüber hinaus die Einstufung des Tumors entsprechend der TNM-Klassifikation (Pflugfelder et al., 2013). Die TNM-Klassifikation dient der Einteilung maligner Tumoren in verschiedene Stadien. Die Stadieneinteilung basiert dabei auf diversen Eigenschaften des Primärtumors (T) sowie regionärer Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M). Da die TNM-Klassifikation auf statistischen Untersuchungen beruht, können Aussagen über das voraussichtliche Verhalten von Tumorerkrankungen gemacht werden. Die Einstufung einer Tumorerkrankung in ein spezifisches Stadium ermöglicht außerdem prognostische Aussagen und bestimmt oftmals die weitere Therapie.

Die Stadieneinteilung maligner Melanome entsprechend der TNM-Klassifikation erfolgt gemäß den Empfehlungen der American Joint Committee on Cancer (AJCC) aus dem Jahr 2009 (Balch et al., 2009). Zur Bestimmung des Tumorstadiums sind Angaben zur Tumordicke nach Breslow, Mitoserate und Ulzeration des Primärtumors nötig. Die Größe, die Anzahl und die Lokalisation der Metastasen werden ebenfalls zur Einteilung eines malignen Melanoms herangezogen. Darüber hinaus beeinflussen erhöhte Serumwerte der Laktatdehydrogenase die Einteilung maligner Melanome in ein bestimmtes Tumorstadium.

Entsprechend der TNM-Klassifikation stellt das Stadium I ein flaches malignes Melanom *in situ*, welches die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat, dar. Zum Stadium II werden maligne Melanome ohne Metastasierung gezählt, deren Größe 2 mm überschreiten. In Stadium III fallen maligne Melanome, die bereits Satellitenmetastasen und / oder In-Transit-Metastasen oder Lymphknotenmetastasen gebildet haben. Das Stadium IV ist durch die Bildung von Fernmetastasen geprägt. Neben Metastasen in der Haut findet man diese besonders häufig in Herz, Leber, Lunge, Skelett und im Gehirn (Merkel et al., 2002).

### 1.2.3 Diagnostik

Neben der Untersuchung eines verdächtigen Nävus (Muttermal) mit bloßem Auge kann zusätzlich die Auflichtmikroskopie zum Einsatz kommen, bei der das Pigmentnetzwerk in starker Vergrößerung nichtinvasiv eingesehen werden kann. Entsprechend der ABCDE-

Regel (Abbildung 1) kann die melanozytäre Hautveränderung als benigne oder maligne eingestuft werden (Isasi et al., 2011).

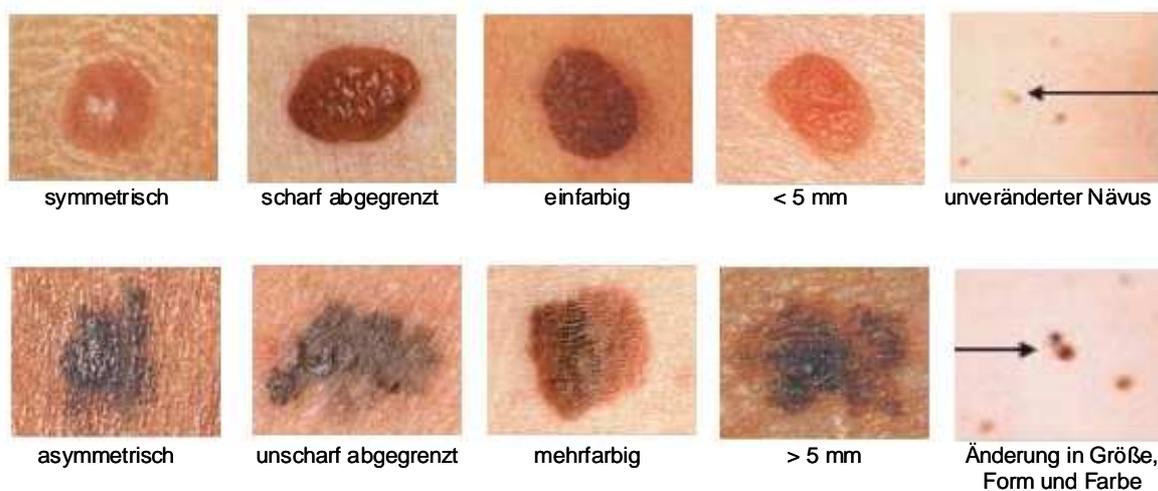
**Asymmetrie:** nicht symmetrisch

**Begrenzung:** unregelmäßig oder unscharf

**Color/Farbe:** unterschiedlich starke Pigmentierung bzw. Mehrfarbigkeit

**Durchmesser:** größer als 5 mm

**Erhabenheit/Entwicklung:** knotiges Wachstum und in kurzer Zeit stark vergrößert



#### Abbildung 1: ABCDE-Regel

Unterscheidungsmerkmale eines unauffälligen Nävus (obere Reihe) im Vergleich zu einem malignen Melanom (untere Reihe) an Hand der ABCDE-Regeln (skinipedia.org)

Eine endgültige Diagnose ist jedoch in manchen Fällen erst nach der Operation durch eine histopathologische Untersuchung möglich.

#### 1.2.4 Epidemiologie und Ätiologie

In Deutschland erkrankten im Jahr 2008 etwa 18.000 Menschen am malignen Melanom. Damit machte das maligne Melanom im Jahr 2008 in Deutschland bei Frauen 4,0 % und bei Männern 3,6 % aller bösartigen Neubildungen aus und verursachte etwa 1 % aller Krebstodesfälle. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 66 und bei Frauen bei 60 Jahren, wobei relevante Erkrankungsraten des malignen Melanoms bereits ab dem 20. Lebensjahr zu beobachten sind. Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Frauen mit einem malignen Melanom 87 % und bei Männern 91 % (Kaatsch et al., 2012). Bei

Auftreten von Fernmetastasen ist die Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von sechs bis zehn Monaten für den Patienten erheblich schlechter (Garbe et al., 2011).

Im Zeitraum von 1970 bis 2008 ist in Deutschland die altersstandardisierte Inzidenzrate des malignen Melanoms von drei Fällen auf 21 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr gestiegen. Damit hat die Inzidenz des malignen Melanoms über fast vier Dekaden um das Siebenfache zugenommen. Dagegen sind bei der Sterblichkeit seit den 1970er Jahren keine wesentlichen Veränderungen aufgetreten (Siegel et al., 2012). Als Hauptursache der steigenden Inzidenz wird das veränderte Freizeitverhalten und einer damit einhergehenden zunehmenden Exposition gegenüber ultravioletter (UV-) Strahlung gesehen (Garbe et al., 2006). Aber auch die verbesserte Diagnostik trägt zur steigenden Inzidenz bei.

Als wichtigster exogener Risikofaktor gilt die natürliche (Balch et al., 2001) und künstliche UV-Exposition (Lazovich et al., 2010) durch Sonne und Solarien. Insbesondere Sonnenbrände im Kindesalter erhöhen das Risiko, ein Melanom zu entwickeln (Autier und Dore, 1998; Whiteman et al., 2001). Die UV-Strahlung kann sowohl DNA-Schäden hervorrufen, als auch negative Prozesse des Immunsystems wie Immunsuppression und Entzündungen auslösen (Garibyan und Fisher, 2010).

Menschen mit einem lichtempfindlichen, hellen Hauttyp, mit einer hohen Anzahl an Nävi (> 100) oder Träger dysplastischer Nävi haben ein erhöhtes Risiko (Cho und Chiang, 2010). Ein weiterer endogener Risikofaktor ist die genetische Disposition, denn 5–10 % der Melanome treten in erblich belasteten Familien auf (Garbe et al., 2006).

### **1.2.5 Genetische Veränderungen**

Es wurde bisher angenommen, dass Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen, die durch UV-Strahlung induziert wurden, den initialen Auslöser für die Entstehung von Melanomen darstellen. Wichtige melanomassoziierte Gene wie PTEN, NRAS und BRAF weisen Mutationen auf (Garibyan und Fisher, 2010).

Der Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg, auch MAPK-Signalweg genannt, reguliert Prozesse wie die Proliferation, Wachstum und Invasion. In Melanozyten wird dieser Signalweg durch externe Wachstumsfaktoren aktiviert, wobei nur eine schwache ERK-Aktivierung induziert wird (Bohm et al., 1995). Der MAPK-Signalweg spielt bei der Zellproliferation im Melanom ebenfalls eine zentrale Rolle. ERK ist in 90 % der Melanome hyperaktiviert (Cohen et al., 2002). ERK kann hierbei durch die Produktion autokriner Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Satyamoorthy et al., 2003). Eine weitaus häufigere Ursache für die Hyperaktivierung von ERK ist eine Mutation von NRAS, eines der drei menschlichen Ras-Gene. NRAS ist in 15 bis 30 % der Melanome mutiert (Davies et al., 2002). Die am häufigsten mutierte

Komponente des MAPK-Signalweges ist BRAF, eines von drei humanen Raf-Genen. BRAF ist in 50 bis 70 % der Melanome mutiert (Davies et al., 2002). Der Austausch der Aminosäure Valin gegen Glutaminsäure an Position 600 hat eine zehnfach höhere Kinaseaktivität und damit die konstitutive ERK-Aktivierung zur Folge (Davies et al., 2002). Dies wiederum stimuliert die Proliferation, das Zellüberleben, die Invasion und die Angiogenese des Tumors (Peyssonnaud und Eychene, 2001). Erwähnenswert ist jedoch, dass bereits 80 % der gutartigen Nävi eine derartige Mutation des BRAF aufweisen (Pollock et al., 2003). Es bedarf demnach anderer molekularer Ereignisse, um ein malignes Melanom zu entwickeln.

Ein weiterer Signalweg, der im Melanom ebenfalls von Bedeutung ist, ist der PTEN/PI3K/Akt-Signalweg. Dieser Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Proliferation, Zellüberleben, Wachstum und Motilität. Zudem ist er hyperaktiviert in einer Vielzahl der Melanome. Dies lässt sich dadurch erklären, dass PI3K in 3 % der metastasierten Melanome mutiert (Omholt et al., 2006), PTEN in 5 bis 20 % der Melanome entweder deletiert oder mutiert (Wu et al., 2003) und Akt in 60 % der Melanome überexprimiert ist (Stahl et al., 2004).

### 1.2.6 Therapie

Die einzig effektive Therapieform beim malignen Melanom ist die vollständige, operative Entfernung des Tumors. Beim malignen Melanom im Stadium I liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate nur geringfügig unter dem Wert für die Normalbevölkerung (Gray-Schopfer et al., 2007). Zusätzlich zur operativen Entfernung wird bei malignen Melanomen im Stadium II eine adjuvante Therapie mit Interferon alpha empfohlen.

Etwa 20 % aller malignen Melanome sind bei der Diagnose bereits metastasiert. Im Stadium IV beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate des Patienten nur noch etwa 10 % und die mediane Überlebenszeit nur acht Monate ( $\pm 2$  Monate) (Garbe et al., 2011).

Zur Behandlung des malignen Melanoms im metastasierten Stadium stehen neben der Operation Radio-, Chemo- und Immuntherapien zur Verfügung. Allerdings spricht das Melanom nur selten langfristig auf diese Therapien an. Das als Standardchemotherapeutikum eingesetzte Dacarbazine führt nur bei 5 bis 12 % der Patienten zu einem objektiven Ansprechen, wobei nur einzelne Patienten dauerhaft ansprechen (Middleton et al., 2000; Patel et al., 2011).

Im Jahr 2012 wurde der selektive BRAF-Kinaseinhibitor Vemurafenib (PLX4032) in Deutschland als Melanomtherapeutikum zugelassen. In etwa 50 bis 70 % der malignen Melanome liegt die aktivierende Mutation V600E, ein Austausch der Aminosäure Valin gegen

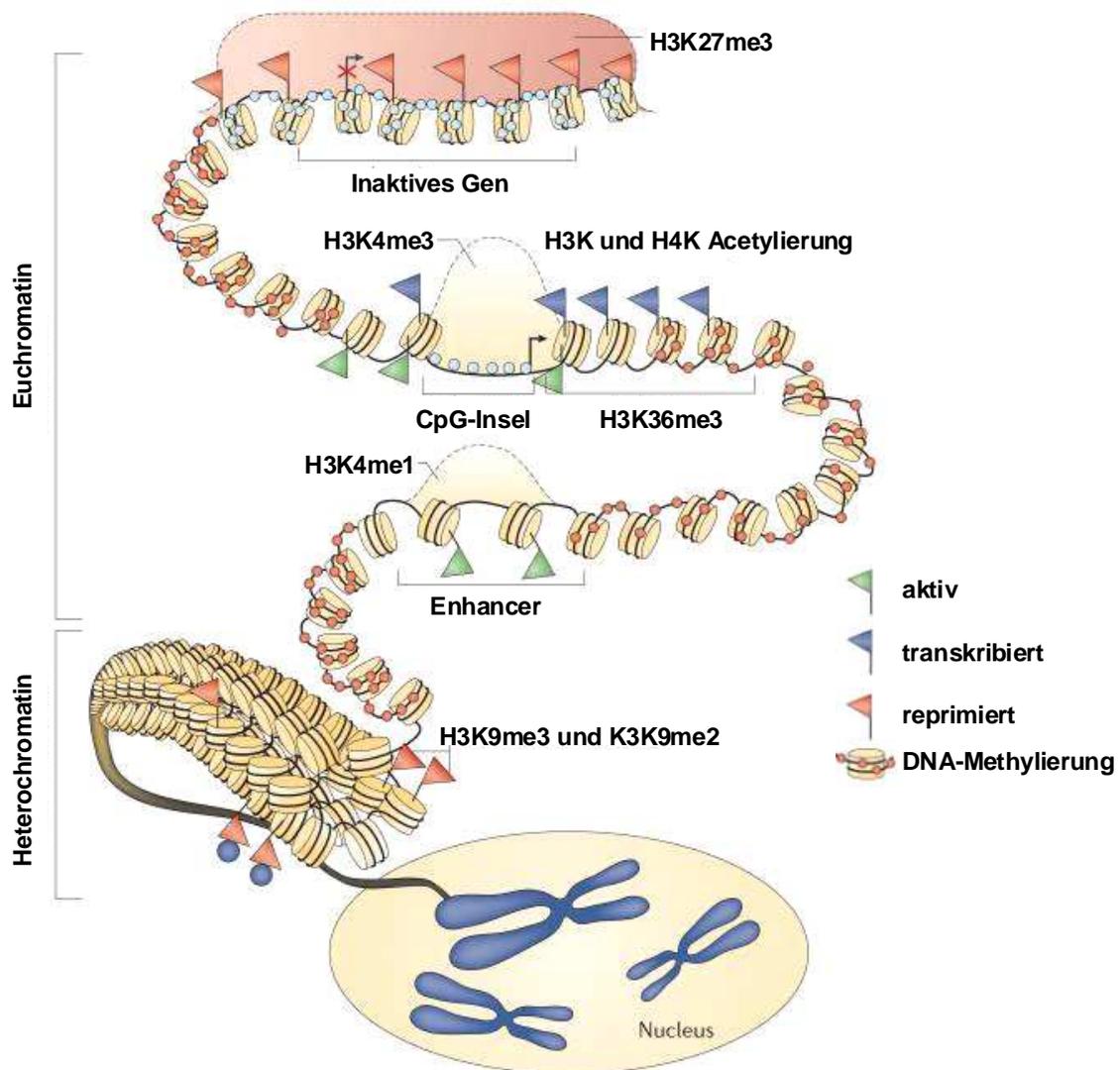
Glutaminsäure an Position 600, der Serin/Threonin-Kinase BRAF vor, welche in den MAPK-Signalweg involviert ist (Davies et al., 2002; Poynter et al., 2006; Dhomen und Marais, 2007). Die Mutation hat zur Folge, dass BRAF konstitutiv aktiv ist. Die erhöhte Kinaseaktivität bewirkt wiederum eine Überaktivierung der MAPK-Signalkaskade (Garibyan und Fisher, 2010). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass gezieltes Ausschalten des mutierten BRAF sowohl durch siRNA, als auch durch den Kinaseinhibitor PLX4032 eine Regression der Tumoren in xenotransplantierten Modellorganismen zur Folge hatte (Sharma et al., 2005; Ji et al., 2007). Nach Behandlung der Melanomzelllinien mit PLX4032 wurde bei diesen Apoptose induziert (Sala et al., 2008).

Vemurafenib wird nunmehr bei Patienten eingesetzt, deren Tumor eine Mutation des BRAF-Gens (V600E) aufweist. Es inhibiert den MAPK-Signalweg, in dem es die ATP-bindende Domäne des mutierten BRAF-Monomers blockiert und es somit inaktiviert (Poulikakos et al., 2010; Yang et al., 2012). Die Therapie führt bei objektiven Ansprechraten von etwa 50 % zunächst auch zu einer Tumoregression (Flaherty et al., 2010; Sosman et al., 2012). Jedoch konnte in *in vitro* Studien gezeigt werden, dass Vemurafenib auch andere Kinasen wie ACK1, SRMS und MAP4K5 inhibieren kann. Es wird vermutet, dass dies zum positiven Ansprechen der Melanompatienten auf Vemurafenib beiträgt (Bollag et al., 2010). Allerdings ist die Ansprechdauer des Patienten auf ca. sieben Monate begrenzt (Chapman et al., 2011), da sich Resistenzen der Tumorzellen gegenüber Vemurafenib ausbilden können. Es wurden vielfältige Resistenzmechanismen identifiziert. Darunter finden sich entweder die Aktivierung alternativer Signalwege (Johannessen et al., 2010) oder die Reaktivierung des MAPK-Signalweges. Eine Möglichkeit der Reaktivierung des MAPK-Signalweges besteht in der Aktivierung des Onkogen NRAS (Nazarian et al., 2010; Romano et al., 2013; Rudin et al., 2013). Weiterhin konnte eine Splicevariante des BRAF, dem die Exons 4 bis 8 fehlen, in vemurafenibresistenten Zellen nachgewiesen werden (Poulikakos et al., 2011). Die Bildung dieser Splicevariante beruht vermutlich auf einer Mutation oder einer epigenetischen Veränderung.

Die derzeit zur Verfügung stehenden Therapien bewirken demnach keine Heilung, sondern vielmehr nur eine Verlängerung der Lebenszeit und Verbesserung der Beschwerdesymptomatik. Zugleich zeigen der Einsatz neuer Inhibitoren und die Resistenzbildung, dass die Entstehung von Melanomen und Tumoren nicht initial durch ein genetisches Ereignis ausgelöst wird. Vielmehr muss die Karzinogenese auf einer anderen Ebene induziert werden. Um geeignete Therapien zu entwickeln, ist ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die bei der Entstehung und Entwicklung des malignen Melanoms eine Rolle spielen, insbesondere auf der bisher wenig untersuchten, epigenetischen Ebene vonnöten.

### 1.3 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik wurde von Conrad Waddington im Jahr 1942 geprägt, als „Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, welche den Phänotyp hervorbringen“. Heutzutage umschreibt der Begriff Epigenetik mitotisch oder meiotisch vererbare Mechanismen, die die Genaktivität steuern, ohne die DNA-Sequenz zu verändern (Weinhold, 2006). Die wesentlichen epigenetischen Änderungen sind die chemische Modifikation der DNA und Veränderungen des Chromatins (Abbildung 2). Die Gesamtheit aller epigenetischen Veränderungen bzw. Markierungen bezeichnet man als Epigenom.



**Abbildung 2: Das Epigenom im Überblick (modifiziert nach Baylin und Jones, 2011)**

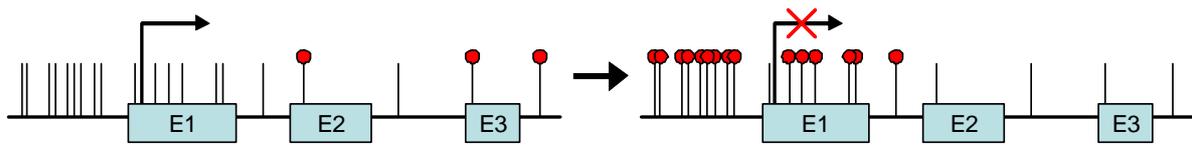
Das Epigenom stellt die Gesamtheit aller epigenetischen Markierungen dar. Dazu zählt zum einen die DNA-Methylierung, zum anderen die Histonmodifikation. Euchromatin ist durch aktive und transkriptionszugängliche Bereiche, Heterochromatin dagegen durch transkriptionsinaktive Bereiche gekennzeichnet.

### 1.3.1 DNA-Methylierung

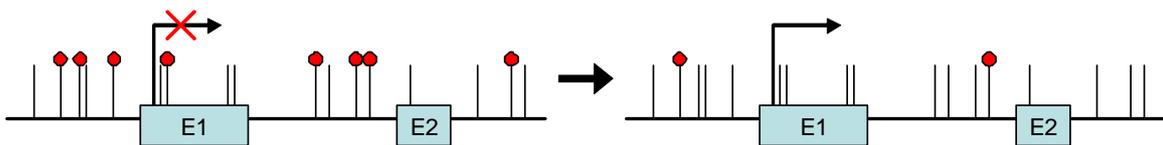
Die am besten untersuchte epigenetische Modifikation ist die DNA-Methylierung. Dabei wird eine Methylgruppe vom S-Adenosylmethionin auf das 5-Kohlenstoffatom eines Cytosins übertragen. Diese Reaktion wird von DNA-Methyltransferasen katalysiert. Nur Cytidine gefolgt von einem Guanidin, die CpG-Dinukleotide, sind von dieser Modifikation betroffen. Etwa 3 – 6 % aller Cytosine liegen in der normalen, humanen DNA methyliert vor (Esteller, 2005). In normalen Zellen sind die CpG-Dinukleotide in den Promotorregionen und 5' untranslatierten Bereichen eines Gens, den CpG-Inseln, vermehrt anzufinden, wo sie der Genregulierung dienen. Unmethylierte Gene können in der Gegenwart von Transkriptionsfaktoren transkribiert werden. Die Methylierung der CpG-Dinukleotide dagegen reprimiert die Genexpression. Es wird vermutet, dass die DNA-Methylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert (Choy et al., 2010). Weiterhin könnten Methyl-CpG-bindende Proteine an die methylierte DNA binden. Diese rekrutieren histonmodifizierende Proteine, die wiederum die Kondensation des Chromatins bewirken (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998).

Abweichende Methylierungsmuster von CpG-Inseln in den Promoterbereichen einzelner Gene können zu einer gestörten Genexpression und damit zu Krankheiten führen (Abbildung 3). Im Jahr 1983 wurde erstmalig bestätigt, dass Tumorzellen einen global veränderten Methylierungsstatus aufweisen (Feinberg und Vogelstein, 1983). Hypermethylierungen einzelner Gene können beispielsweise zur transkriptionellen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen, während die Hypomethylierung von Onkogenen zu deren Aktivierung führen (Hanahan und Weinberg, 2000; Feinberg und Tycko, 2004).

### Hypermethylierung eines Tumorsuppressorgens



### Hypomethylierung eines Onkogens



unmethyliertes CpG-Dinukleotid



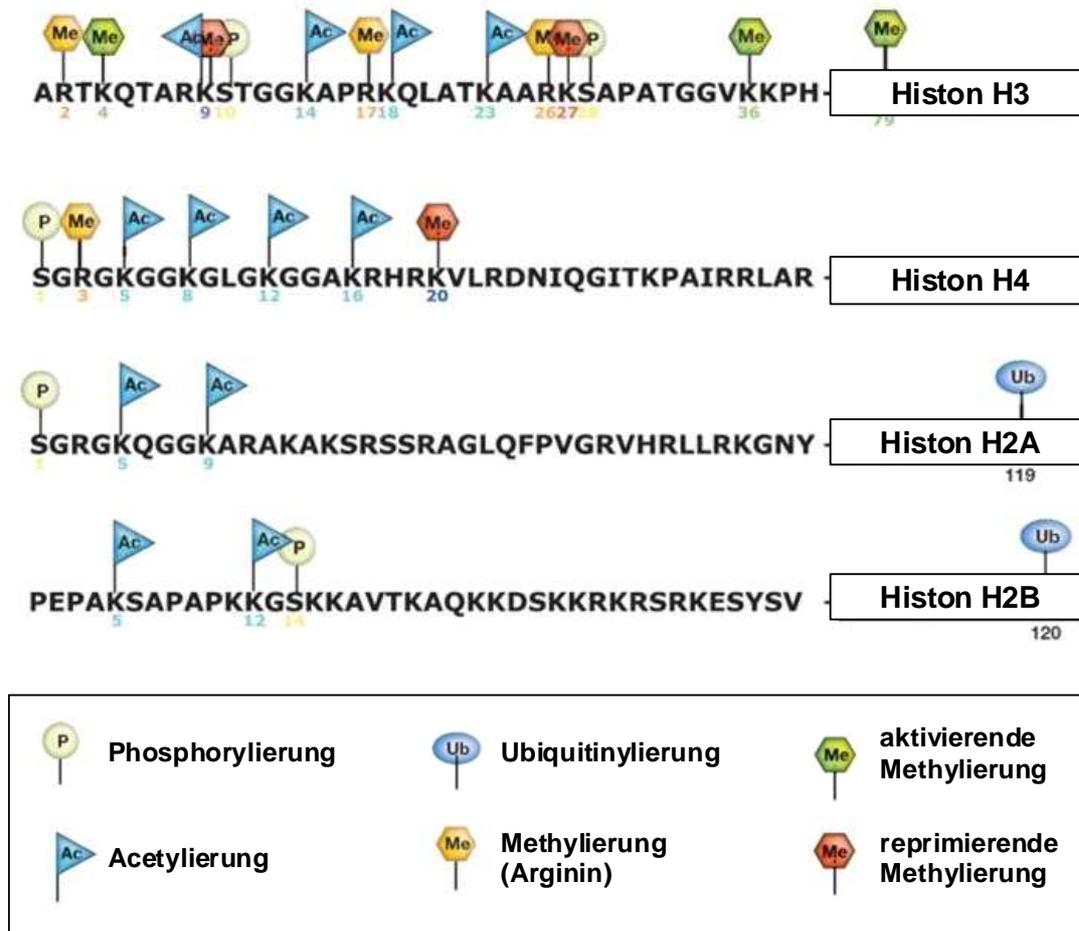
methyliertes CpG-Dinukleotid

### Abbildung 3: Veränderte DNA-Methylierung und deren Einfluss auf die Genexpression (modifiziert nach Esteller, 2007)

Die Hypermethylierung eines Tumorsuppressorgens führt zur transkriptionellen Repression. Das transkriptionell inaktive Onkogen kann nach Hypomethylierung exprimiert werden.

#### 1.3.2 Histonmodifikation

Eine weitere bedeutende epigenetische Veränderung ist die Histonmodifikation. Histonproteine sind von einer Vielzahl kovalenter Modifikationen, insbesondere an ihren aminoterminalen Enden, betroffen. Zu den Modifikationen zählen u.a. Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung sowie Ubiquitylierung (Abbildung 4). Diese Modifikationen bewirken eine Strukturveränderung des Chromatins und regulieren darüber die Zugänglichkeit der DNA, abhängig von der Position, dem Grad und der Art der Modifikation.



**Abbildung 4: Lokalisation verschiedener, kovalenter Modifikationen der Histone H3, H4, H2A und H2B (modifiziert nach Allis et al., 2007)**

Während die Acetylierung des Lysinrestes eines Histonproteins die Repression der Genexpression zur Folge hat, kann die Methylierung des Lysins in Abhängigkeit von der Position sowohl aktivierend, als auch reprimierend wirken.

Chromatin besteht aus DNA, die um die Histone H2A, H2B, H3 und H4 gewickelt ist, sowie aus weiteren Proteinen, die sich an die DNA anlagern. Durch die Komplexbildung wird ein höherer Verpackungsgrad der DNA erreicht. Im Allgemeinen werden DNA-Abschnitte, die in Bereichen des Heterochromatins (transkriptionsinaktiv) liegen, nicht exprimiert, während solche in Euchromatinbereichen (transkriptionsaktiv) exprimiert werden (Abbildung 2) (Grunstein et al., 1995). Die Einteilung des Chromatins beruht auf dem Wissenschaftler Emil Heitz, der nach Färbung des Chromatins die intensiv gefärbten Chromatinbereiche als Heterochromatin und die diffus gefärbten Bereiche als Euchromatin bezeichnete. Auf Grund der starken Kondensation des Chromatins in heterochromatischen Bereichen wird viel Farbstoff gebunden. Dagegen liegt das Chromatin in euchromatischen Bereichen in aufgelockerter Form vor, so dass weniger Farbstoff gebunden wird (Passarge, 1979).

Insbesondere der Acetylierungs- und Methylierungszustand der Histone hat einen großen Einfluss auf die Genexpression.

Die Acetylierung kann ausschließlich an Lysinresten der Histone erfolgen. Die Acetylgruppe bewirkt eine Neutralisierung der positiven Ladung des Lysins, so dass sich die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Lysin und der negativen Ladung der DNA verringert. Die Chromatinstruktur öffnet sich und die Transkription wird ermöglicht. Die Übertragung einer Acetylgruppe auf den Lysinrest eines Histons wird von Histonacetyltransferasen, die Abspaltung der Acetylgruppe von Histondeacetylasen (HDAC) katalysiert (Choudhary et al., 2009).

Histonmethylierungen erfolgen sowohl an Lysin- als auch an Argininresten der Histone. Während die Acetylierung die Transkription begünstigt, kann die Methylierung sowohl einen positiven als auch einen negativen Effekt auf die Genexpression haben (Abbildung 4).

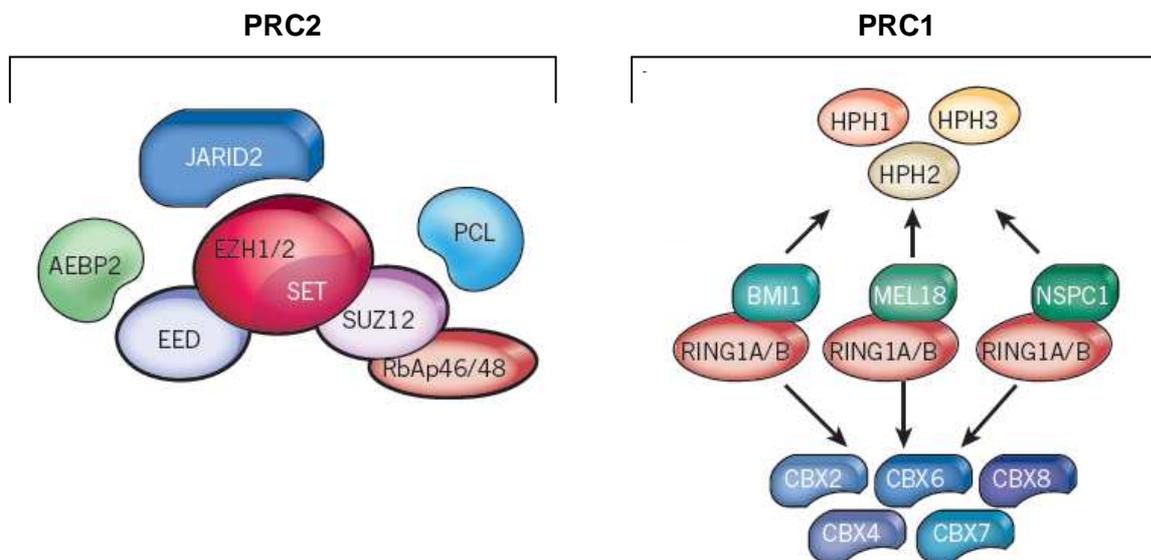
Zudem können Lysinreste mono-, di- oder trimethyliert, Argininreste mono- oder dimethyliert vorliegen. Histonmethyltransferasen übertragen Methylgruppen auf Lysin- und Argininreste, während Histondemethylasen für die Abspaltung der Methylgruppen verantwortlich sind (Kooistra und Helin, 2012).

### 1.3.3 Die Proteine der Polycombgruppe

Die Proteine der Polycombgruppe (PcG) wurden ursprünglich in der Taufliège *Drosophila melanogaster* als negative Regulatoren der Hox-Gene beschrieben. Die Hox-Gene sind für die Gliederung der Körperlängsachse während der Embryonalentwicklung sowohl bei Insekten als auch bei Vertebraten notwendig. Die Polycombgruppe hat dabei die Aufgabe, den reprimierten Zustand der Hox-Gene sicherzustellen. Als Antagonist fungiert die Trithoraxgruppe (TrxG), die das Expressionsmuster aktiver Hox-Gene aufrechterhält (Lewis, 1978). Neben den Hox-Genen werden zahlreiche andere Gene durch die PcG-Proteine reguliert (Kirmizis et al., 2004; Boyer et al., 2006; Bracken et al., 2006; Lee et al., 2006; Squazzo et al., 2006).

Die Proteine der Polycombgruppe bilden in Vertebraten zwei verschiedene Multiproteinkomplexe (Abbildung 5), die als Polycomb Repressive Complex (PRC) bezeichnet werden. Die Zusammensetzung der beiden Polycombkomplexe ist variabel (Sauvageau und Sauvageau, 2010). Die funktionelle und physiologische Rolle der verschiedenen zusammengesetzten Komplexe ist bisher nicht geklärt. Es wird vermutet, dass die verschiedenen Komplexe eine unterschiedliche biochemische Aktivität und daher auch unterschiedliche funktionelle Rollen haben könnten, so dass sie sich zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung und Entwicklung bilden (Di Croce und Helin, 2013).

Der PRC2 besteht aus den vier Kernkomponenten EZH2 (Enhancer Zeste Homolog 2), EED (Embryonic Ectoderm Development), SUZ12 (Suppressor of Zeste 12) und RbAp46/48 (Retinoblastoma Associated Protein 46/48) (Kuzmichev et al., 2002). Darüber hinaus konnten AEBP2, PCL1/2/3 und JARID2 als weitere Cofaktoren identifiziert werden (Smits et al., 2013). Die Zusammensetzung des PRC1 ist mit nur zwei Kernkomponenten, RING1A/B zusammen mit BMI1, MEL18 oder NSPC1, dagegen variabler.



**Abbildung 5: Zusammensetzung der Polycomb-Multiproteinkomplexe PRC2 und PRC1 (modifiziert nach Margueron und Reinberg, 2011)**

Die Kernkomponenten des PRC2 sind EZH2, dessen SET-Domäne Histonmethyltransferaseaktivität besitzt, EED, SUZ12 sowie RbAp46/48. PCL1/2/3, JARID2 und AEBP2 sind Cofaktoren, die je nach Kontext variieren können. RING1A oder RING1B zusammen mit entweder BMI1, MEL18 oder NSPC1 bilden die Kernkomponenten des PRC1. Die Bindung weiterer Cofaktoren ist auch hier vom Kontext abhängig.

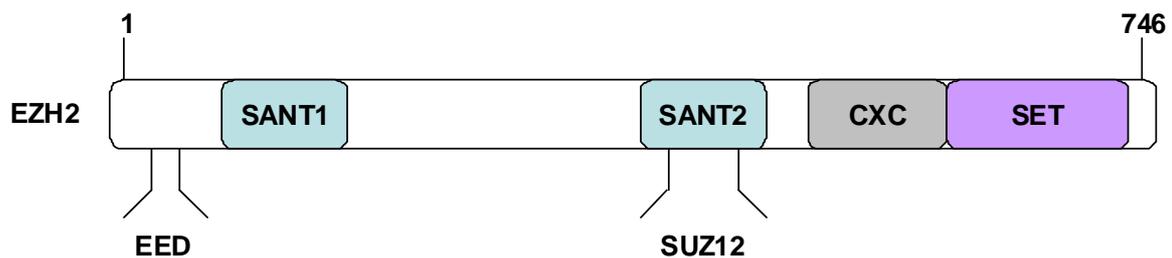
### 1.3.4 Histonmodifikation durch die PcG-Proteine

Die Bedeutung der PcG-Proteine in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen wird dadurch unterstrichen, dass der Verlust einer der PcG-Kernkomponenten sich in Mausexperimenten als embryonal letal erweist (O'Carroll et al., 2001; Pasini et al., 2004). Darüber hinaus spielen die PcG-Proteine eine wichtige Rolle in der Stammzellbiologie (Rajasekhar und Begemann, 2007; Pietersen und van Lohuizen, 2008), Tumorepigenetik (Sparmann und van Lohuizen, 2006; Ting et al., 2006; Jones und Baylin, 2007; Rajasekhar und Begemann, 2007), bei der X-Chromosomeninaktivierung (Wutz, 2007; Payer und Lee, 2008) und beim Imprinting (Sha, 2008; Wu und Bernstein, 2008).

Der PRC2 spielt eine essentielle Rolle bei der Histonmodifikation, indem er die Di- und Trimethylierung des Lysin 27 des Histons H3 (H3K27me<sub>2/3</sub>) katalysiert (Cao et al., 2002; Kirmizis et al., 2004). In höheren Eukaryoten ist die Di- und Trimethylierung von H3K27 mit

der transkriptionellen Repression und der Genstilllegung assoziiert (Schuettengruber et al., 2007).

Die enzymatische Methyltransferaseaktivität wird durch das Enhancer Zeste Homolog 2 (EZH2) mit seiner carboxyterminalen SET-Domäne vermittelt (Abbildung 6). Die SET-Domäne ist charakteristisch für chromatinmodifizierende Proteine (Jenuwein et al., 1998). Die hoch konservierte und cysteinreiche CXC-Domäne soll die Methyltransferaseaktivität des EZH2 steigern (Ketel et al., 2005). Darüber hinaus enthält EZH2 zwei SANT-Domänen, die sich häufig in chromatinmodellierenden Komplexen finden und für die DNA-Bindung verantwortlich sind (Boyer et al., 2004).



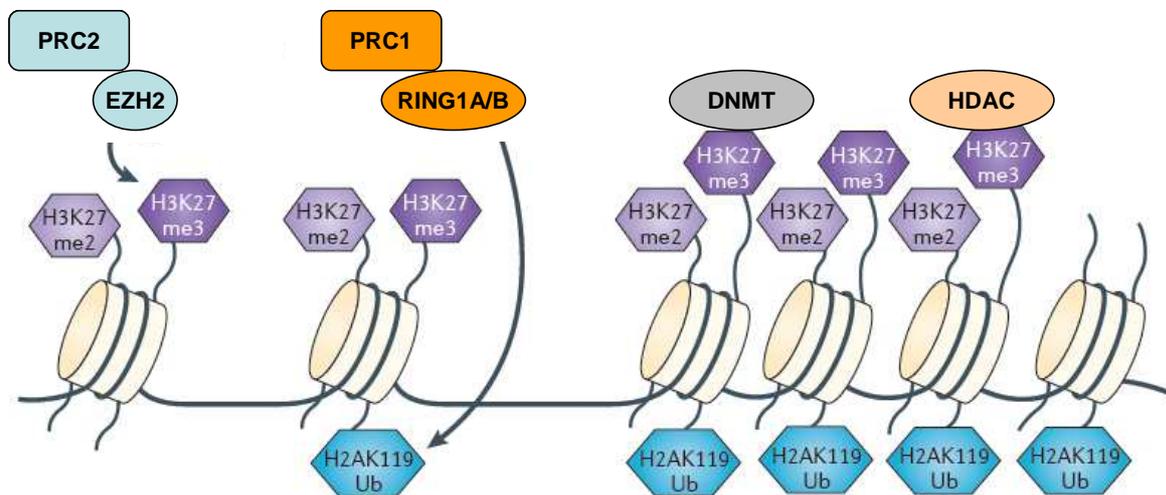
**Abbildung 6: Charakterisierte Domänen und Interaktionsbereiche von EZH2**

EZH2 ist 746 Aminosäuren lang und besteht aus zwei SANT-Domänen (DNA-bindende Domänen), der cysteinreichen CXC-Domäne und der SET-Domäne mit Methyltransferaseaktivität. Das Protein verfügt zudem über Interaktionsbereiche für die Bindungspartner EED und SUZ12.

Die nichtkatalytischen Untereinheiten des PRC2 übernehmen eine wichtige Rolle in der Regulierung der katalytischen Aktivität des Komplexes. Das Enzym EZH2 ist ausschließlich in der Gegenwart des Zinkfingerproteins SUZ12 und des WD40-Domäne enthaltenden EED aktiv (Pasini et al., 2004; Margueron et al., 2009). RbAp48 besitzt ebenfalls eine WD40-Domäne, die für die Interaktion mit SUZ12 und den ersten zehn Aminosäuren des unmodifizierten Histons H3 notwendig ist. Der Kernkomplex bindet weitere Proteine und nichtcodierende RNA (ncRNA), die wiederum die Aktivität und die Lokalisation des Komplexes regulieren. Das Zinkfingerprotein AEBP2 unterstützt den PRC2 bei der Interaktion mit der spezifischen DNA (Kim et al., 2009) und verstärkt die Methyltransferaseaktivität des Komplexes (Cao und Zhang, 2004). PCL1, PCL2 und PCL3 interagieren mit EZH2 und zu einem gewissen Grad mit SUZ12 und den Histonchaperonen RbAp46 und RbAp48 (Nekrasov et al., 2007). Den PCL werden verschiedene Funktionen zugeschrieben, von der Regulierung der enzymatischen Aktivität des PRC2 (Nekrasov et al., 2007; Sarma et al., 2008) bis hin zur Rekrutierung des Komplexes zum Chromatin (Savla et al., 2008; Walker et al., 2010). Mit biochemischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass EZH2 und JARID2 in embryonalen Stammzellen interagieren (Pasini et al.; Peng et al., 2009; Shen et al., 2009; Landeira et al., 2010).

### 1.3.5 Rekrutierung und Regulierung der PcG-Proteine

Im vorherrschenden Modell ermöglicht die Trimethylierung des Lysins 27 des Histons H3 wiederum die Rekrutierung und Bindung von PRC1 über die Chromodomäne von Polycomb (Pc). Nach der Bindung monoubiquitinyliert PRC1 den Lysinrest 119 des Histons H2A (H2AK119) mittels der Ubiquitinligasen RING1A und RING1B (Wang et al., 2004). Des Weiteren ist die Trimethylierung des Lysins 27 am Histon H3 für die Rekrutierung weiterer DNA-Methyltransferasen (DNMT) und Histondeacetylasen verantwortlich (Abbildung 7) (Vire et al., 2006; Shih et al., 2012). Dies trägt dazu bei, dass das Chromatin stark kondensiert und die Transkription der Zielstrukturen gehemmt werden (Bracken und Helin, 2009).



**Abbildung 7: Epigenetische Repression durch PRC2, PRC1 und DNMT (modifiziert nach Shih et al., 2012)**

Nach Bindung des PRC2 und Methylierung von H3K27 durch EZH2, wird PRC1 zum Chromatin rekrutiert. PRC1 wiederum katalysiert die Ubiquitinylierung von H2AK119. Weiterhin hat die Trimethylierung von H3K27 die Rekrutierung von DNMT und HDAC zur Folge.

Es wird angenommen, dass PRC2 als erstes zu den Zielgenen rekrutiert wird und anschließend die Methylierung von H3K27 katalysiert. Diesem Schritt folgen dann die Rekrutierung von PRC1 und die Ubiquitinylierung von H2AK119. Dieses Modell wird durch genomweite Lokalisationsanalysen in humanen, embryonalen Fibroblasten unterstützt, bei denen mehr als 1.000 stillgelegte Zielgene beider Proteinkomplexe überlappen (Bracken et al., 2006).

PcG-Proteine regulieren die Transkription mehrerer Tausend Gene, die abhängig vom Zelltyp exprimiert werden. Daher binden PcG-Proteine nicht in allen Zelltypen den gleichen

Satz an Genen. Die Mechanismen und DNA-Elemente, die die Bindung und Dissoziation der PcG-Proteine regulieren, sind bisher nicht eindeutig geklärt. (Di Croce und Helin, 2013)

In *Drosophila melanogaster* wurden in der Nähe der Zielgene cis-regulatorische DNA-Elemente, die Polycomb Response Elemente (PRE), entdeckt, die PRC2 zum Chromatin rekrutieren (Ringrose und Paro, 2007).

In humanen, embryonalen Stammzellen wurde ein potentielles, 1,8 kb PRE zwischen dem HOXD11 und HOXD12 Locus identifiziert (Woo et al., 2010). Diese Sequenz besitzt zudem Bindungsstellen für Yin und Yang 1 (YY1), ein Cofaktor, der mit der Rekrutierung der PcG-Proteine in Verbindung gebracht wird (Caretti et al., 2005). Die YY1-Bindungsstellen tragen zwar zur transkriptionellen Repression des Locus bei, sind aber nicht unentbehrlich. Dies legt die Vermutung nahe, dass weitere intermediäre Faktoren in die Regulierung involviert sein könnten (Morey und Helin, 2010).

Lange, nichtkodierende RNA (ncRNA) könnten ebenfalls an der Rekrutierung des PRC2 zu den relevanten Chromatinstrukturen beteiligt sein. Die ncRNA HOTAIR beispielsweise bindet PRC2 und reguliert dessen Aktivität und Lokalisation (Rinn et al., 2007). Auf Grund der Vielzahl an ncRNA bieten diese eine neue Dimension der spezifischen Rekrutierung der PcG-Proteine zu den Zielgenen.

### 1.3.6 EZH2 und Krebs

Den PcG-Proteinen wird eine Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Krebs zugesprochen. Insbesondere die Überexpression von EZH2 konnte bei Tumoren der Haut (Bachmann et al., 2006; McHugh et al., 2007), der Prostata (Varambally et al., 2002; Bachmann et al., 2006; Saramaki et al., 2006; Hoffmann et al., 2007), der Mamma (Kleer et al., 2003; Bachmann et al., 2006; Collett et al., 2006; Pietersen et al., 2008), des Darms (Mimori et al., 2005), der Leber (Sudo et al., 2005) sowie beim Lymphom (Raaphorst et al., 2000; van Kemenade et al., 2001; Visser et al., 2001) nachgewiesen werden.

Die hohen Expressionswerte von EZH2 korrelieren mit einer schlechten Prognose bei Prostatapatienten (Varambally et al., 2002). Weiterhin wird EZH2 als Marker für fortgeschrittene Stadien bei Prostata- (Varambally et al., 2002) und Brustkrebs (Kleer et al., 2003) beschrieben. Die EZH2-Expression steigt mit zunehmenden Tumorstadium beim Darmkrebs (Wang et al., 2010), Lungenkrebs (Lv et al., 2012) und Gehirntumor (Crea et al., 2010) an. Die Überexpression von EZH2 fördert zudem die neoplastische Transformation der epithelialen Prostata- und Mammazellen (Kleer et al., 2003; Karanikolas et al., 2010). Diese Beobachtungen sprechen für eine wichtige Rolle des EZH2 bei der Entstehung und Progression humaner Tumoren.

In Brustepithelzellen korreliert die Überexpression von EZH2 *in vitro* mit einem verankerungsunabhängigem Wachstum sowie der Zunahme der Zellinvasion (Kleer et al., 2003). EZH2 vermittelt die transkriptionelle Repression des Tumorsuppressorgens E-Cadherin, welches an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist (Cao et al., 2008). Der Verlust von E-Cadherin steht in engem Zusammenhang mit der Invasion und Metastasierung verschiedener Tumoren (Schipper et al., 1991; Oka et al., 1993; Umbas et al., 1994; Wu et al., 2005).

Die EZH2-Expression ist in metastasierten Prostatatumoren im Vergleich zu gutartigen und nichtmetastasierten Tumoren stark erhöht. Die durch RNA-Interferenz vermittelte Blockade der EZH2-Expression in Prostatazelllinien bewirkt *in vitro* zudem eine Hemmung der Proliferation (Varambally et al., 2002). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass nach Repression der EZH2-Expression, die Invasion und Migration verschiedener Prostatazelllinien inhibiert wurde. Die Überexpression von EZH2 in diversen Prostatazelllinien resultiert in einem verstärkt aggressiven Verhalten der Zellen (Karanikolas et al., 2010). Weiterhin ist EZH2 in der Lage, die Expression von DAB2IP, was für ein Ras-GTPase-aktivierendes Protein kodiert, zu inhibieren. Im metastasiertem Prostatakrebs ist die Expression von DAB2IP gehäuft stillgelegt, so dass der Ras- und NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert werden (Min et al.). Diese Daten lassen vermuten, dass EZH2 an der Migration und Invasion von Tumorzellen und damit an der Metastasierung von Prostatatumoren beteiligt ist.

Es wurden bisher nur wenige Untersuchungen bezüglich der Expression von EZH2 im malignen Melanom durchgeführt. Hierfür wurden Gewebeproben unterschiedlicher Melanomstadien immunhistochemisch untersucht. Dazu wurden Gewebeproben vom Nävus, dysplastischen Nävus, *in situ* Melanom, invasiven, aber nicht metastasierten Melanom sowie vom metastasierten Melanom bei der Untersuchung eingesetzt. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte, dass die EZH2-Expression stufenweise mit dem Melanomstadium zunimmt. Während bei Nävi und dysplastischen Nävi keine EZH2-Expression nachweisbar war, konnte bereits im *in situ* Melanom eine geringe EZH2-Expression nachgewiesen werden. Eine signifikante Steigerung der EZH2-Expression wurde im invasiven Melanom beobachtet. Gewebeproben vom metastasierten Melanom wiesen die höchste EZH2-Expression auf (McHugh et al., 2007).

Verschiedene Studien zeigen, dass EZH2 in verschiedenen Tumorentitäten auf verschiedenen Ebenen reguliert werden kann.

Die Expression und Funktion von EZH2 kann durch die microRNAs (miRNA) miR-101 oder miR-26a inhibiert werden. Die Analyse humaner Prostatatumoren ergab, dass die Expression von miR-101 während der Tumorentwicklung abnimmt, während gleichzeitig die EZH2-Expression zunimmt. Die miRNA bindet dabei an den 3' untranslatierten Bereich der

EZH2-mRNA und vermittelt deren Abbau. Der Verlust von miR-101 oder miR-26a ist ein Mechanismus, der zu erhöhten EZH2-Werten und einer verstärkten PRC2-Aktivität in Tumoren führt (Varambally et al., 2008; Friedman et al., 2009; Wang et al., 2010; Lu et al., 2011). In der Haut sind die beiden miRNA miR-101 und miR-26a noch geringfügig exprimiert (Yi et al., 2009), so dass hier möglicherweise andere miRNA die EZH2-Expressionswerte regulieren.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie an den EZH2-Promoter binden und dessen Expression aktivieren. Die EZH2-Expression ist wiederum für die E2F-vermittelte Zellproliferation notwendig (Bracken et al., 2003).

EZH2 kann zudem durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden. Die Kinase Akt phosphoryliert EZH2 an der Aminosäure Serin in Position 21. Die Phosphorylierung resultiert in einer verminderten Histonmethyltransferaseaktivität, in dem es die Bindung von EZH2 an Histon H3 verhindert (Cha et al., 2005).

Ein weiterer möglicher Regulator der EZH2-Expression könnte das mutierte BRAF<sup>V600E</sup> darstellen. Es wurde gezeigt, dass die Expression von EZH2 nach Blockade von BRAF<sup>V600E</sup> stark reduziert ist (Hou et al., 2012). Allerdings wurde es versäumt zu zeigen, dass eine Blockade des WT-BRAF keinen Einfluss auf die EZH2-Expression hat.

## 1.4 Zielstellung

EZH2 ist in verschiedenen Tumorentitäten, z.B. Prostata- und Brustkrebs, überexprimiert und steht im Zusammenhang mit der Metastasierung dieser Tumore sowie einer schlechten Prognose für den Patienten. Im malignen Melanom wurde die Expression von EZH2 bisher nur auf immunhistochemischer Ebene untersucht.

Das maligne Melanom weist ein hohes Metastasierungspotential und eine hohe Mortalität auf. Zudem existiert für diese Tumorentität im fortgeschrittenen Stadium nach wie vor keine wirksame, kurative Therapie, sondern lediglich Therapien, die die Lebenszeit verlängern und die Beschwerden lindern. Neue Angriffspunkte, die das maligne Melanom gezielt bekämpfen, sind notwendig. Dazu ist ein besseres Verständnis dieses Tumors vonnöten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression von EZH2 auf RNA- und Proteinebene in Melanomzelllinien im Vergleich zu Melanozyten zu untersuchen. Durch siRNA-vermittelte Hemmung der EZH2-Expression bzw. Überexpression von EZH2 soll dessen Einfluss auf die Proliferation, Migration und Invasion von Melanomzellen untersucht werden. Durch die Analyse der Transkriptomdaten dreier Melanomzelllinien, die verschiedene EZH2-Expressionslevel aufweisen, sollen mögliche Zielgene identifiziert werden, die an der Proliferation, Migration, Invasion, Metastasierung und Angiogenese beteiligt sind. Mittels quantitativer real-time PCR sollen Zielgene, die unter der Regulation von EZH2 stehen, validiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

**Tabelle 3: Kommerzielle Reagenziensets**

Produkt	Firma
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Bonn
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo Scientific, Bonn
Nucleo Spin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo Spin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo Spin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo Spin Tissue	Macherey-Nagel, Düren
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

**Tabelle 4: Geräte**

Gerät	Modell	Firma
Blotting-Apparatur	iBlot	Invitrogen, Karlsruhe
Brutschrank	Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Chemilumineszenzkamera	LAS 1000	Fuji Film, Tokio, Japan
Elektrophoresekammer	Mini Protean	Biorad, München
FACS-Calibur	Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	MC5	Sartorius, Göttingen
Feinwaage	LC6215	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2 Imaging	Zeiss, Oberkochen
Inkubationsschüttler	Innova 4000	New Brunswick, Nürtingen
Magnetrührer	Ikamag Reo	IKA Labortechnik, Staufen
Massenspektrometer	ESI-MicrOTOF-Q I	Bruker Daltonics, Bremen
Mikroplattenphotometer	MR 700	Dynatech Laboratories, USA
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Nano-HPLC	Ultimate 3000	Dionex, Darmstadt
pH-Meter	pH 537	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Spannungsgerät	EPS 600	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Spektralphotometer	Lambda 2	Perkin Elmer, Waltham, USA
Sterile Werkbank	Hera Safe	Heraeus, Hanau

Thermocycler	PTC-200	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf 5417	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD200	Bandelin, Berlin
Vakuumzentrifuge	Speed Vac Plus SC210A	Thermo Savant, Sant Jose, USA
Vortex	Genie2	Scientific Industries, NY, USA
Wasserbad		Memmert, Schwabach
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld, Königshofen
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge	GS 6 KR	Beckman Coulter, Krefeld

## 2.2 Zellbiologische Materialien und Methoden

### 2.2.1 Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Melanozyten wurden von der Fa. Cambrex Bio Science (Walkersville, USA) bezogen und stammten aus der Haut eines neugeborenen Jungen kaukasischen Ursprungs.

Die in der Tabelle 5 aufgeführten Melanomzelllinien stammen aus Metastasen von Melanompatienten.

**Tabelle 5: Übersicht verwendeter Melanomzelllinien mit Patientendaten.**

Bezeichnung	Subtyp	Stadium	Überleben	Geschlecht	Alter [Jahre]	Quelle
ChaMel-014	LMM	IV	-	m	51	Charité
ChaMel-019	NM	IV	+	m	33	Charité
ChaMel-041	SSM	IV	-	w	43	Charité
ChaMel-047	SSM	III	+	m	61	Charité
ChaMel-074	NM	III	+	w	65	Charité
ChaMel-084	NM	III	-	m	70	Charité
ChaMel-091	SSM	III	-	m	39	Charité
ChaMel-100	SSM	nd	+	m	61	Charité
ChaMel-105	NM	III	-	m	nd	Charité
Sk-Mel-13	nd	nd	nd	m	56	AG Eberle
Sk-Mel-19	nd	nd	nd	m	50	AG Eberle
Sk-Mel-28	nd	nd	nd	m	51	ATCC HTB-72
Mel-2a	nd	nd	nd	nd	nd	AG Eberle
Bro	nd	nd	nd	nd	nd	AG Eberle

**Subtyp:** LMM = Lentigo-Maligna Melanom; NM = Noduläres Melanom; SSM = Superfiziell spreitendes Melanom; nd = nicht definiert / nicht bekannt; **Überleben:** (+) überlebt, (-) verstorben

## 2.2.2 Antikörper

**Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen**

Bezeichnung	Konjugat	Verdünnung	Firma
Maus anti $\alpha$ -Tubulin	-	1:100	Santa Cruz, Heidelberg
Maus anti Clathrin	-	1:2000	Abcam, Cambridge, GB
Maus anti EZH2	-	1:100	Cell Signaling, Cambridge, GB
Ziege anti Maus IgG	Alexa Fluor 594	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.2.3 siRNA

**Tabelle 7: Übersicht verwendeter siRNA**

Bezeichnung	Zielsequenz	Firma
Hs_EZH2_7	AACCATGTTTACAACACTATCAA	Qiagen, Hilden
Allstars Negative Control	n.a.	Qiagen, Hilden

## 2.2.4 Zellkultur

Alle Melanomzelllinien wurden in RPMI Medium 1640 + Glutamax (Life Technologies, Darmstadt) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS; Biochrom, Berlin) und 5 % Penicillin-Streptomycin (Life Technologies, Darmstadt) bei 37 °C und 8 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent. Das Kulturmedium wurde etwa jeden dritten Tag erneuert. Zur Passage der Zellen wurden diese mit PBS (Life Technologies, Darmstadt) gewaschen und anschließend mit 0,05 % Trypsin-EDTA (Life Technologies, Darmstadt) inkubiert. Nachdem die Zellen vom Flaschenboden gelöst waren, wurde das Trypsin durch Zugabe von FKS-haltigem Medium inhibiert. Die Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 15 ml Kulturmedium resuspendiert.

## 2.2.5 DNA-Transfektion

Die transiente Transfektion adhärent wachsender Melanomzellen erfolgte mit X-treme Gene HP DNA Transfection Reagent (Roche, Mannheim). Hierfür wurden 24 h vor der Transfektion  $2 \times 10^5$  Zellen/Well in einer 6-Wellplatte ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Kulturmedium gegen 1,8 ml frisches Medium ausgetauscht. In insgesamt 200  $\mu$ l serumfreiem Opti-MEM Medium (Life Technologies, Darmstadt) wurden 2  $\mu$ g Vektor-DNA verdünnt. Danach erfolgte die Zugabe von 6  $\mu$ l X-treme Gene HP DNA Transfection

Reagent. Der Transfektionsansatz wurde 15 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen analysiert.

### **2.2.6 siRNA-Transfektion**

Die spezifische und validierte siRNA (small interfering RNA), die die Expression des Gens EZH2 inhibiert bzw. hemmt, wurde mit Hilfe des X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche, Mannheim) in die Melanomzellen eingeschleust. Als Negativkontrolle diente die AllStars Negative Control siRNA (Qiagen, Hilden). Es wurden 24 h vor der Transfektion  $2 \times 10^5$  Zellen/Well in einer 6-Wellplatte ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Kulturmedium gegen 2 ml frisches Medium ausgetauscht. Es wurden 5  $\mu\text{g}$  siRNA in insgesamt 100  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium verdünnt. Parallel dazu wurden 30  $\mu\text{l}$  X-tremeGene siRNA Transfection Reagent mit 70  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium verdünnt. Anschließend wurden beide Ansätze miteinander vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 48 h Inkubation.

### **2.2.7 MTT-Proliferationsassay**

Zur Untersuchung der Proliferation und Zellviabilität wurden 3.000 Zellen in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Kulturmedium in Mikrotiterplatten ausgesät. Es wurden Wachstumskurven an fünf aufeinander folgenden Tagen aufgenommen. Dazu wurde in jedes Well 25  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung (2 mg/ml in PBS) pipettiert und 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Dimethylsulfoxid (Roth, Karlsruhe), mehrfaches Auf- und Abpipettieren sowie Inkubation für 5 min bei 37 °C. Das gelöste Formazanprodukt wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 570 nm im Mikroplattenphotometer nachgewiesen.

### **2.2.8 Migrationsassay**

Um den Einfluss der EZH2-Expression auf das Migrationsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Transfektion (Abschnitt 2.2.5 und 2.2.6) bis zur Konfluenz kultiviert. Mit einer Pipettenspitze wurde ein „Kratzer“ im Zellrasen erzeugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und das Kulturmedium erneuert. Zur Dokumentation des Migrationsverhaltens wurden die Zellen nach 0 und 24 h fotografiert.

### 2.2.9 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen wurden durchgeführt, um den Anteil YFP-positiver Melanomzellen zu bestimmen. Dazu wurden die adhären wachsenden Melanomzellen mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit einem FACS-Calibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest Pro (Becton Dickinson, Heidelberg).

### 2.2.10 Probenpräparation und Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden  $2 \times 10^5$  Zellen auf sterilen Deckgläschen in einer 6-Wellplatte ausgesät und 24 h in Kulturmedium inkubiert. Vor der Färbung wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und für 30 min bei RT mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd (Merck, Darmstadt) fixiert. Die Zellen wurden erneut zwei Mal mit PBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde entsprechend Tabelle 6 in 1 ml Permeabilisierungspuffer (BD Biosciences, San Jose, USA) verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT im Dunkeln. Die Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem in 1 ml Permeabilisierungspuffer verdünnten Sekundärantikörper (Tabelle 6) für 30 min bei RT im Dunkeln. Die Zellen wurden erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Im zweiten Waschschrift wurden die Zellkerne mit 5 µg/ml DAPI (Roche, Mannheim) für 3 min gefärbt. Die Deckgläschen wurden mit 20 µl Fluoromount G (Southern Biotechnology, Birmingham, USA) luftblasenfrei auf einem Superfrost Plus Objektträger (Thermo Scientific, Bonn) eingeschlossen. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Zeiss, Jena) und der Software Axio Vision (Zeiss, Jena) analysiert.

**Tabelle 8: Übersicht verwendeter Filtersets für Fluoreszenzmikroskopie**

Zeiss-Filterset	Anregung	Frequenzteiler	Emission	Fluoreszenzfarbstoff
00	BP 530-585	FT 600	LP 615	Alexa 594
10	BP 450-490	FT 510	BP 515-565	YFP
49	G 365	FT 395	BP 445/450	DAPI

## 2.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden

### 2.3.1 Puffer und Lösungen

10 x TBE-Puffer	0,5 M Tris (Sigma, Steinheim) 0,5 M Borsäure (Roth, Karlsruhe) 0,01 M EDTA (Merck, Darmstadt)
5 x DNA-Ladepuffer	0,01 M Tris-HCl (Applichem, Darmstadt) 0,1 % (w/v) Orange G (Merck, Darmstadt) 20 % (v/v) Ficoll Plus (Biochrom, Berlin)
LB-Medium	10 g/l Tryptone (Sigma, Steinheim) 5 g/l Hefeextrakt (Sigma, Steinheim) 10 g/l NaCl (Sigma, Steinheim)

### 2.3.2 Enzyme

Tabelle 9: Enzyme

Produkt	Firma
BamHI Restriktionsenzym	Fermentas, Vilnius, Litauen
HindIII Restriktionsenzym	Fermentas, Vilnius, Litauen
NheI Restriktionsenzym	Fermentas, Vilnius, Litauen
NotI Restriktionsenzym	Fermentas, Vilnius, Litauen
Sall Restriktionsenzym	Fermentas, Vilnius, Litauen
ScaI Restriktionsenzym	Fermentas, Vilnius, Litauen
XbaI Restriktionsenzym	Fermentas, Vilnius, Litauen
XhoI Restriktionsenzym	Fermentas, Vilnius, Litauen
rDNAse	Macherey & Nagel, Düren
GoTaq DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
Platinum Taq High Fidelity	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA

### 2.3.3 Oligonukleotidprimer

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Invitrogen (Karlsruhe) sowie BioTeZ Berlin Buch GmbH (Berlin) bezogen. Die Sequenzen wurden entweder der Literatur oder der Datenbank <http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/> entnommen.

**Tabelle 10: Übersicht verwendeter Oligonukleotidprimer**

Gen	Sequenz (5´- 3´)	Verwendung	T <sub>Hyb</sub> [°C]	Größe [bp]
EZH2_for	AGTGTGACCCTGACCTCTGT	PCR	60	122
EZH2_rev	AGATGGTGCCAGCAATAGAT	PCR		
EZH2_for	CCCTGACCTCTGTCTTACTTGTGGA	qPCR	60	120
EZH2_rev	ACGTCAGATGGTGCCAGCAATA	qPCR		
GAPDH_for	TGCACCACCAACTGCTTAGC	qPCR	60	87
GAPDH_rev	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	qPCR		
HPRT_for	GTTGTAGGATATGCCCTTGAC	PCR	55	313
HPRT_rev	GCCCAAAGGGAACTGATAGT	PCR		
TIMP3_for	AACTTGGGTGAAGGCTGAGTGT	PCR, qPCR	55	96
TIMP3_rev	CCTCACCAAGGCCTAACAGATG	PCR, qPCR		
VASH1_for	TTCAGGCTGTTCTCATCTCA	PCR, qPCR	55	103
VASH1_rev	GGAGCTGGGGAGACTTTATT	PCR, qPCR		

**Tabelle 11: Übersicht verwendeter Oligonukleotidprimer für die Klonierung**

Die farbig markierten Bereiche sind zusätzlich eingefügte Nukleotide. Rot: Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XhoI bzw. BamHI. Grün: Stopcodon. Blau: V5-Epitop.

Gen	Sequenz (5´- 3´)
EZH2_for	ACTCGAGCTATGGGCCAGACTGGGAAGAAATCTG
EZH2_rev	TGGATVVTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGG

### 2.3.4 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus Zellen erfolgte mit Hilfe des Nucleospin RNA II Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben. Die mit Trypsin abgelösten und anschließend gewaschenen Zellen wurden durch Inkubation mit einer chaotropen Lösung lysiert. Dieser Lysepuffer inaktiviert sofort alle RNasen und schafft gleichzeitig ein geeignetes Reaktionsmilieu, damit die RNA an die Silikamembran der Säulen binden kann. Zur

Reduktion der Viskosität wurde das Lysat zunächst über ein Nucleo Spin Filter zentrifugiert. Nach Zugabe von Ethanol (Merck, Darmstadt) wurde das Lysat auf eine Nucleo Spin RNA II Säule geladen. Die Silikamembran der Säulen bindet neben der RNA auch DNA. Diese DNA-Kontaminationen wurden durch den Verdau mit rDNase abgebaut. Dazu wurde rDNase-Lösung direkt auf das Säulenmaterial pipettiert. Durch die nachfolgenden Waschschriffe mit zwei verschiedenen Puffern wurden Salze, Metabolite und makromolekulare Zellbestandteile entfernt. Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 2.3.5 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer. Dazu wurden 2 µl der RNA in 100 µl RNase-freiem Wasser in Quarzglasküvetten verdünnt. Als Referenz diente RNase-freies Wasser.

Formeln zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.3.6 Reverse Transkription

Zur weiteren Analyse der RNA wurden 1 µg RNA mit Hilfe der Maxima Reverse Transkriptase (Thermo Scientific, Bonn) in copyDNA (cDNA) umgeschrieben.

**Tabelle 12: Reaktionsansatz für reverse Transkription – Teil 1**

Komponente	Mengenangabe
RNA	1 µg
Oligo(dT)-Primer (20 pmol/µl)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
RNase-freies Wasser	auf 14,5 µl auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Es wurden 5,5 µl des nachfolgenden Master-Mix zugesetzt.

**Tabelle 13: Reaktionsansatz für reverse Transkription – Teil 2**

Komponente	Mengenangabe
5x RT-Puffer	4 $\mu$ l
RNase-Out	0,5 $\mu$ l
Maxima Reverse Transkriptase	1 $\mu$ l
$\Sigma$	20 $\mu$ l

Die reverse Transkription erfolgte 30 min bei 50 °C. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 5 min bei 85 °C beendet. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente zu amplifizieren und die Expression eines Gens semiquantitativ zu überprüfen. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler in der Gegenwart der GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, USA) und spezifischen Oligonukleotidprimern (Tabelle 10) durchgeführt. Für eine Standard-PCR wurde folgender Reaktionsansatz angefertigt:

**Tabelle 14: Reaktionsansatz für Standard-PCR**

Komponente	Mengenangabe
5x GoTaq-Puffer	3 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	0,3 $\mu$ l
Forward-Primer (25 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ l
Reverse-Primer (25 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ l
RNase-freies Wasser	9,425 $\mu$ l
GoTaq	0,075 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l
$\Sigma$	15 $\mu$ l

Die PCR-Reaktion wurde unter nachfolgenden Standardbedingungen durchgeführt:

**Tabelle 15: Temperaturprogramm für Standard-PCR**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	1
Denaturierung	30 sek	95 °C	30
Primerhybridisierung	30 sek	X °C	
Elongation	40 sek	72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	1
	∞	4 °C	

Die Temperatur der Primerhybridisierung ( $T_{Hyb}$ ) wurde entsprechend Tabelle 10 angepasst. Es wurden 10  $\mu$ l des PCR-Produktes auf ein Agarosegel (Abschnitt 2.3.14) aufgetragen.

Für nachfolgende Klonierungen wurde die Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt, da diese lange DNA-Fragmente mit einer hohen Genauigkeit amplifiziert.

**Tabelle 16: Reaktionsansatz für Zwei-Schritt-PCR**

Komponente	Mengenangabe
High Fidelity Puffer	2,5 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	0,5 $\mu$ l
Forward-Primer (50 $\mu$ M)	1,0 $\mu$ l
Reverse-Primer (50 $\mu$ M)	1,0 $\mu$ l
RNase-freies Wasser	17,9 $\mu$ l
Platinum Taq HF	0,1 $\mu$ l
DANN	1 $\mu$ l
$\Sigma$	25 $\mu$ l

Anstatt der Standard-PCR wurde hier die Zwei-Schritt-PCR eingesetzt, bei der die Primerhybridisierung und die Elongation bei der gleichen Temperatur durchgeführt werden können und somit ein Schritt entfällt.

**Tabelle 17: Temperaturprogramm für Zwei-Schritt-PCR**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	2 min	92 °C	1
Denaturierung	30 sek	92 °C	30
Primerhybridisierung / Elongation	2,5 min	68 °C	
Finale Elongation	7 min	68 °C	1
	∞	4 °C	

### 2.3.8 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR ist eine sensitive Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Sie beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR. Hierbei wird die Chemikalie SYBR Green verwendet, die in doppelsträngige DNA interkaliert und dann bei Anregung fluoresziert. Durch Messung des Fluoreszenzsignals während eines PCR-Zyklus in Echtzeit ist die Quantifizierung der amplifizierten Nukleinsäure möglich. Die Zunahme der amplifizierten DNA korreliert dabei mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Die quantitative real-time PCR Reaktion wurde in Thermo Fast Skirted 96-Well PCR Platten (Thermo Scientific, Bonn) durchgeführt. Für jeden Reaktionsansatz wurde ein Mastermix vorgelegt und die cDNA (Abschnitt 2.3.6) nachfolgend zugegeben.

**Tabelle 18: Reaktionsansatz für real-time PCR**

Komponente	Mengenangabe
2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	10 µl
Forward-Primer (3 µM)	1 µl
Reverse-Primer (3 µM)	1 µl
cDNA (1:5 verdünnt)	8 µl
Σ	20 µl

Die quantitative real-time PCR wurde im Thermocycler CFX-96 (Biorad, München) durchgeführt, wobei nachfolgendes Temperaturprogramm angewendet wurde:

**Tabelle 19: Temperaturprogramm für real-time PCR**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
UDG-Verdau	2 min	50 °C	1
Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	1
Denaturierung	15 sek	95 °C	40
Annealing / Elongation	60 sek	60 °C	
Dissoziation	10 sek	95 °C	1
Schmelzkurve	0,5 °C / 5 sek	65 – 95 °C	1

Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes eines zu untersuchenden Gens erfolgte mit einer relativen Quantifizierungsmethode, der delta-delta Ct-Methode (Livak und Schmittgen, 2001), bei der das PCR-Signal einer Probe mit dem einer Referenzprobe, normalisiert zum Referenzgen, verglichen wurde. Im ersten Schritt wurde für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert. Zur Normierung wurde hier das Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Im zweiten Schritt wurde vom delta Ct-Wert der zu untersuchenden Probe der delta Ct-Wert einer Referenzprobe abgezogen. Als Ergebnis erhielt man den delta-delta Ct-Wert. Der relative Expressionsunterschied zwischen einer Probe und der Referenzprobe berechnete sich aus der Formel  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### 2.3.9 Genomweite Genexpressionsanalyse

Die mRNA-Expressionsdaten von den Melanomzelllinien ChaMel-047, ChaMel-084 und ChaMel-105 sowie den Fibroblasten wurden durch Frau Dr. Yvonne Welte zur Verfügung gestellt. Die genomweite Genexpressionsanalyse war unter Verwendung des Human WG-6 v3.0 Expression BeadChip-Array (Illumina) durchgeführt worden. Die Illumina BeadStudio Software diente der Normalisierung und Auswertung der Expressionsdaten.

### 2.3.10 TOPO TA-Klonierung und Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Für eine effiziente Klonierung von PCR-Produkten wurde das TOPO TA Cloning Kit (In gen, Karlsruhe) und kompetente TOP10F' *E. coli* Bakterien verwendet. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben: Es wurden 4 µl DNA (PCR-Produkt), 1 µl Salzlösung und 1 µl TOPO-Vektor miteinander gemischt und 5 min bei RT inkubiert.

Der Ligationsansatz wurde mit kompetenten *E. coli* Bakterien gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C. Der Transformationsansatz wurde weitere 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) wurden die Zellen 1 h bei 37 °C geschüttelt. Es wurden 50 µl der Zellsuspension auf LB-Platten mit Selektionsmarker ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.11 Kolonie-PCR

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurden ausgewählte Klone mit einem sterilen Zahnstocher von der LB-Platte in mit 50 µl bidest. Wasser befüllte PCR-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden 2 min bei 94 °C lysiert. Anschließend wurde eine Kolonie-PCR, deren Reaktionsansatz und Temperaturprogramm nachfolgend aufgeführt ist, durchgeführt.

**Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR**

Komponente	Mengenangabe
10x PCR-Puffer	1,5 µl
dNTPs (10mM)	1,2 µl
Forward-Primer (25 µM)	0,6 µl
Reverse-Primer (25 µM)	0,6 µl
RNase-freies Wasser	10,025 µl
Dream Taq	0,075 µl
DANN	1 µl
Σ	15 µl

**Tabelle 21: Temperaturprogramm für die Kolonie-PCR**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	1
Denaturierung	20 sek	95 °C	30
Primerhybridisierung	30 sek	54 °C	
Elongation	30 sek	72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	1
	∞	4 °C	

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.14) aufgetrennt. Positive Klone wurden für weitere Analysen und Subklonierungen expandiert.

### **2.3.12 Plasmidisolierung**

Für die Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurden ausgewählte Klone mittels eines sterilen Zahnstochers gepickt und in 3 ml LB-Medium + Selektionsmarker ü.N. bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin Plasmid Kits (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben.

Für die Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden 250 ml LB-Medium + Selektionsmarker mit 50 µl einer Minikultur angeimpft und ü.N. bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte mittels des HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

### **2.3.13 DNA-Restriktionsverdau**

Plasmid-DNA und durch PCR gewonnene DNA wurden mit Restriktionsendonukleasen (Tabelle 9) nach Herstellerangaben geschnitten. Der Restriktionsverdau erfolgte in 20 µl Gesamtvolumen für 10 min bei 37 °C. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.14).

### **2.3.14 Auftrennung, Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten**

Zum Nachweis eines PCR-Produktes (Abschnitt 2.3.7) sowie zur Auftrennung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau (Abschnitt 2.3.13) wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Entsprechend der zu erwartenden Fragmentgrößen wurde Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in einer Konzentration von 1,0 % bis 1,5 % in TBE-Puffer mit 0,006 % Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) eingesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 120 Volt. Als Größenstandard wurden der Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Bonn) sowie Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Bonn) eingesetzt. Durch den Einsatz von Ethidiumbromid, welches mit Nukleinsäuren interkaliert, konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente durch UV-Anregung detektiert werden. Die Dokumentation der Banden erfolgte mittels eines Geldokumentationsgerätes (Cybertech, Berlin).

Für die nachfolgende Ligation (Abschnitt 2.3.15) wurden ausgewählte DNA-Banden aus dem Agarosegel herausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Nucleo Spin Extract II Kits (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend der Herstellerangaben extrahiert.

### 2.3.15 Ligation

Die Insertion aufgereinigter DNA-Fragmente in Vektoren wurde unter Verwendung der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA) durchgeführt. Vektor- und Insert-DNA wurden im molaren Verhältnis 1 zu 2 eingesetzt.

**Tabelle 22: Reaktionsansatz für die Ligation**

Komponente	Mengenangabe	
Insert-DNA	x	ng
Vektor-DNA	y	ng
10x T4 DNA-Ligasepuffer	2	µl
T4 DNA-Ligase (0,4 U/µl)	1	µl
RNase-freies Wasser	auf 20 µl auffüllen	

Der Ligationsansatz wurde 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien (Abschnitt 2.3.10).

### 2.3.16 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Vektoren wurde durch die Fa. SMB Services in Molecular Biology, Berlin durchgeführt. Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz wurde die Didesoxymethode nach Sanger verwendet. Das Prinzip beruht auf einer enzymatischen Reaktion und Didesoxynukleosidtriphosphaten, die auf Grund der fehlenden 3' Hydroxylgruppe einen Kettenabbruch zur Folge haben. Das zu sequenzierende, doppelsträngige DNA-Molekül wird zunächst denaturiert. Nach der Primerhybridisierung synthetisiert die DNA-Polymerase den komplementären DNA-Strang. Nach Einbau eines der vier Didesoxynukleosidtriphosphate, welche anteilig im Reaktionsansatz vorhanden sind, bricht die Reaktion ab und unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen. Mittels Kapillarelektrophorese werden die entstandenen Kettenabbruchprodukte entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Durch die Kopplung der vier Didesoxynukleosidtriphosphate mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können die Enden der DNA-Fragmente von einem

Fluoreszenzdetektor bestimmt werden. Aus der Abfolge der verschiedenen Fluoreszenzsignale lässt sich die Basensequenz ermitteln.

Die detektierte DNA-Sequenz wurde mit Hilfe der Software Lasergene MegAlign (DNASTAR, Madison, USA) mit der Datenbanksequenz verglichen.

### **2.3.17 Klonierungsstrategie**

Es wurden Oligonukleotidprimer (Tabelle 11) entworfen und synthetisiert, die die Amplifikation der vollständigen EZH2-Sequenz und die Generierung eines V5-Epitops sowie neuer Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XhoI und BamHI ermöglichen. Diese Oligonukleotidprimer wurden in einer Zwei-Schritt-PCR eingesetzt, um die vollständige EZH2-Sequenz zu amplifizieren (Abschnitt 2.3.7). Das PCR-Produkt wurde anschließend in einer Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.3.14). Die Bande, die die spezifische Größe der EZH2-Sequenz hatte, wurde ausgeschnitten und einer DNA-Extraktion unterzogen (Abschnitt 2.3.14). Mittels TOPO TA-Klonierung wurde diese DNA-Sequenz in den TOPO-Vektor kloniert (Abschnitt 2.3.10). Zur Überprüfung der erfolgreichen TOPO TA-Klonierung wurde eine Kolonie-PCR (Abschnitt 2.3.11) durchgeführt. Die Plasmid-DNA einzelner positiver Klone wurde im analytischen Maßstab mittels des Nucleo Spin Plasmid Kits (Macherey & Nagel, Düren) isoliert (Abschnitt 2.3.12). Um zu überprüfen, ob die EZH2-Sequenz vollständig in den TOPO-Vektor kloniert wurde und in welcher Orientierung sie vorliegt, wurde ein DNA-Restriktionsverdau durchgeführt (Abschnitt 2.3.13). Die Plasmid-DNA der Klone, die beim DNA-Restriktionsverdau das erwartete Bandenmuster aufwiesen, wurde sequenziert und mit der DNA-Sequenz der Datenbank verglichen (Abschnitt 2.3.16). Bei Übereinstimmung der vollständigen Sequenz wurden sowohl der TOPO-Vektor als auch der Zielvektor pEYFP-C1 mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und BamHI verdaut (Abschnitt 2.3.13) und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.14) aufgetrennt. Nach Aufreinigung der Verdauprodukte (Abschnitt 2.3.14) folgten die Ligation (Abschnitt 2.3.15) und Transformation der kompetenten Zellen (Abschnitt 2.3.10). Es folgten erneut Kolonie-PCR, Plasmidisolierung im analytischen Maßstab, DNA-Restriktionsverdau zur Kontrolle, Sequenzierung, Plasmidisolierung im präparativen Maßstab sowie Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Plasmid-DNA. Der Vektor pYFP-EZH2 wurde für weitere Experimente bei -20 °C gelagert.

## 2.4 Proteinbiochemische Materialien und Methoden

### 2.4.1 Puffer und Lösungen

Lysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) (Roth, Karlsruhe) 150 mM NaCl (Applichem, Darmstadt) 1 mM EGTA (Fluka, Buchs, Schweiz) 1 % (v/v) Triton X-100 (Thermo Scientific, Bonn) 1 µg/ml Leupeptin (Sigma, Steinheim) 100 mM PMSF (Thermo Scientific, Bonn) Complete Protease Inhibitor (Roche, Mannheim) Complete Phosphatase Inhibitor (Roche, Mannheim)
5x Probenpuffer	225 mM Tris (pH 6,9) (Sigma, Steinheim) 50 % (v/v) Glycerin (Sigma, Steinheim) 5 % (w/v) SDS (Sigma, Steinheim) 0,05 % (w/v) Bromphenolblau (Merck, Darmstadt) 250 mM Dithiothreitol (Sigma, Steinheim)
Sammelgelpuffer	250 mM Tris (pH 6,8) (Sigma, Steinheim) 0,4 % (w/v) SDS (Sigma, Steinheim)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris (pH 8,8) (Sigma, Steinheim) 0,8 % (w/v) SDS (Sigma, Steinheim)
Laufpuffer	25 mM Tris (pH 8,3) (Sigma, Steinheim) 192 mM Glycin (Roth, Karlsruhe)
Coomassie-Färbelösung	0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau (Sigma, Steinheim) 50 % (v/v) Methanol (Sigma, Steinheim) 10 % (v/v) Essigsäure (Merck, Darmstadt)
Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol (Sigma, Steinheim) 10 % (v/v) Essigsäure (Merck, Darmstadt) 50 % Aqua bidest.

10x TBS	100 mM Tris (pH 7,5) (Sigma, Steinheim) 1,5 M NaCl (Applichem, Darmstadt)
TBST	1x TBS 0,5 % (v/v) Tween 20 (Serva, Heidelberg)
MP-Blockpuffer	TBST 4 % (w/v) Blotting Grade Non-fat Dry Milk (Bio-Rad, München)
ECL-Lösungen	
Lösung A	200 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) (Roth, Karlsruhe) 50 mg Luminol (Sigma, Steinheim)
Lösung B	10 ml DMSO (Roth, Karlsruhe) 11 mg p-Hydroxycoumarinsäure (Sigma, Steinheim)
Lösung C	35 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Merck, Darmstadt)

## 2.4.2 Antikörper

**Tabelle 23: Primäre und sekundäre Antikörper für Western Blot**

Bezeichnung	Konjugat	Verdünnung	Firma
Maus anti $\alpha$ -Tubulin	-	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Maus anti $\beta$ -Aktin	-	1:5000	Abcam, Cambridge, GB
Maus anti $\beta$ -Tubulin	-	1:500	Chemicon, Darmstadt
Maus anti EZH2	-	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, GB
Kaninchen anti Histon H3	-	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, GB
Kaninchen anti TIMP3	-	1:2000	Millipore, Darmstadt
Esel anti Ziege IgG	HRP	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege anti Kaninchen IgG	HRP	1:4000	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege anti Maus IgG	HRP	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg

### 2.4.3 Zellyse

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden standardmäßig  $2 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Das Zellpellet wurde in kaltem Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Zusätzlich wurde das Lysat 5 sek mit einem Ultraschallstabhomogenisator behandelt. Der Proteinextrakt wurde anschließend bei 10.000 rpm und  $4^\circ \text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Bis zur Konzentrationsbestimmung wurde das Proteinlysate auf Eis oder bei  $-20^\circ \text{C}$  gelagert.

### 2.4.4 BCA-Proteinassay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific, Bonn) nach Herstellerangaben. Das Prinzip dieses Nachweises beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen durch Proteine im alkalischen Milieu. Anschließend bildet die Bicinchoninsäure (BCA) mit den reduzierten Kupferionen einen violett gefärbten Komplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch nachweisbar ist. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte in Doppelbestimmung in einer 96-Wellplatte. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  der Proteinprobe oder des Proteinstandards in ein Well pipettiert und mit 200  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung, die aus 50 Teilen Lösung A (BCA) und einem Teil Lösung B ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ) bestand, gemischt und für 30 min bei  $37^\circ \text{C}$  inkubiert. Die Extinktion wurde mit einem Mikroplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Anhand einer Eichreihe bekannter Konzentrationen (200 – 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) des Proteins Bovines Serumalbumin (BSA) wurde die Proteinkonzentration einer Probe bestimmt.

### 2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes auf. Hierfür wurde eine Acrylamidkonzentration von 4 % im Sammelgel (Vernetzungsgrad 3,3 %) und 5-15 % im Trenngel (Vernetzungsgrad 3,3 %) eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit 5x Proteinprobenpuffer vermischt, bei  $95^\circ \text{C}$  für 5 min denaturiert und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine und zur Überwachung der Transfereffizienz wurde der Proteingrößenstandard Prestained SDS-PAGE Protein Standard Broad Range (Bio-Rad, München) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 Volt.

**Tabelle 24: Zusammensetzung des Sammelgels (5ml)**

Komponente	Volumen
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	0,65 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqua bidest	1,85 ml
10 % Ammoniumopersulfat (APS)	30 µl
TEMED	5 µl

**Tabelle 25: Zusammensetzung des Trenngels (10ml)**

Komponente	Volumen			
	5 %	7,5 %	10 %	15 %
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (Biorad, München)	1,7 ml	2,5 ml	3,3 ml	5,0 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Aqua bidest	5,8 ml	5,0 ml	4,2 ml	2,5 ml
10 % APS (Sigma, Steinheim)	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED (Biorad, München)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

#### 2.4.6 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel mit der Coomassie-Färbelösung gefärbt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau (Sigma, Steinheim) lagert sich dabei an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an. Gleichzeitig werden die Proteine in Gegenwart der Essigsäure fixiert. Hierfür wurde das Gel 30 min in der Coomassie-Färbelösung und anschließend in der Entfärbelösung bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden inkubiert.

#### 2.4.7 Western Blot

Der spezifische Nachweis eines Proteins erfolgte mittels Western Blot. Dabei wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine von der Gelmatrix auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mittels spezifischer Antikörper identifiziert. Der Transfer erfolgte mit Hilfe der Blotting-Apparatur iBlot (Invitrogen, Karlsruhe) und iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose (Life Technologies, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Die Proteine binden dabei über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken an die Nitrocellulose. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT in Blockpuffer inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen der

Membran abzusättigen. Darauf folgte die Inkubation der Membran mit einem in Blockpuffer verdünntem Primärantikörper (Tabelle 23) bei 4 °C über Nacht. Die Membran wurde drei Mal 5 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit einem in Blockpuffer verdünntem Sekundärantikörper (Tabelle 23) erfolgte bei RT für 1 h. Die Membran wurde erneut drei Mal 5 min mit TBST gewaschen. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol und löst eine Chemilumineszenz aus. Dazu wurde die gewaschene Membran 2 min mit der frisch gemischten ECL-Lösung (2 ml Lösung A + 200 µl Lösung B + 0,6 µl Lösung C) inkubiert. Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera in der Intelligent Dark Box LAS-1000 (Fuji Film, Tokio, Japan). Die erzeugten Bilder wurden mit der Software Image Reader (Fuji Film, Tokio, Japan) aufgenommen.

Zur relativen Quantifizierung der Banden im Western Blot wurden diese mit Hilfe der frei zugänglichen Software „ImageJ“ densitometrisch ausgewertet. Die gewonnenen Werte für das untersuchte Protein wurden gegen die Werte der Ladekontrolle normalisiert.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Bei der Auswertung der Messwerte wurden, sofern nicht anders angegeben, Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests bestimmt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p-Wert < 0,05 eingestuft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 EZH2-Expression in Melanomzellen

Die EZH2-Expression ist in verschiedenen Tumorentitäten erhöht. Im malignen Melanom wurde bisher nur die EZH2-Expression von Gewebeproben mittels Immunhistochemie untersucht. Dabei korreliert die EZH2-Expression mit dem Melanomstadium. Die EZH2-Expression steigt mit dem Stadium des Melanoms an.

In dieser Arbeit sollte die EZH2-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene untersucht und quantifiziert werden. Dazu wurden zehn Melanomzelllinien, die aus Melanommetastasen isoliert wurden, Melanozyten sowie Fibroblasten mittels quantitativer real-time PCR und Western Blot analysiert. Die Melanozyten, die aus der Vorhaut eines Neugeborenen isoliert wurden, dienten hierbei als gesunde Referenzprobe.

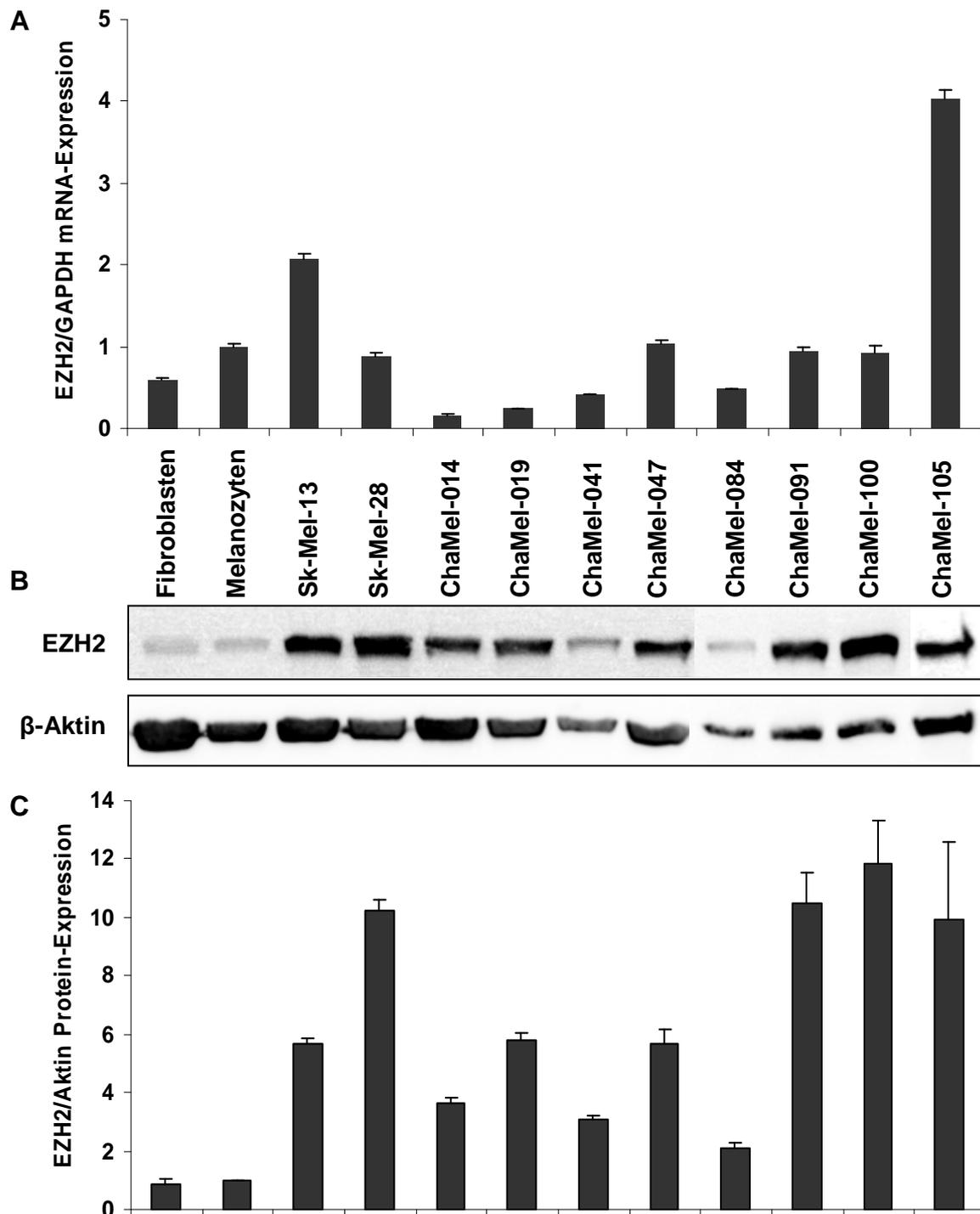
Die Auswertung der real-time PCR-Daten erfolgte mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode, wobei die EZH2-Werte gegen die Werte des Referenzgens GAPDH normalisiert wurden. Die relative EZH2 mRNA-Expression ist in Abbildung 8 A abgebildet, wobei der Melanozytenwert gleich „1“ gesetzt wurde.

Die Melanomzelllinien ChaMel-014, ChaMel-019, ChaMel-041 und ChaMel-084 weisen im Vergleich zu den Melanozyten eine geringere EZH2-Expression auf. Sk-Mel-28, ChaMel-047, ChaMel-091 sowie ChaMel-100 exprimieren EZH2 in etwa auf dem gleichen Niveau wie die Melanozyten, während Sk-Mel-13 und ChaMel-105 eine zweifach bzw. vierfach höhere EZH2 mRNA-Expression im Vergleich zu den Melanozyten besitzen. Die EZH2-Expression der zehn Melanomzelllinien ist auf der mRNA-Ebene sehr heterogen.

Die EZH2-Expression der verschiedenen Melanomzelllinien wurde auch auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht (Abbildung 8 B). Dazu wurde das Proteingesamtlisat in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines spezifisch gegen EZH2 gerichteten Antikörpers. Als Ladekontrolle diente der spezifische Nachweis von  $\beta$ -Aktin. Der Western Blot wurde densitometrisch analysiert, die gewonnenen Werte normalisiert und relativ zu den Melanozyten dargestellt (Abbildung 8 C).

In Fibroblasten und Melanozyten ist EZH2 auf der Proteinebene nur sehr schwach exprimiert. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen der quantitativen real-time PCR-Analyse, wonach eine moderate EZH2-Proteinexpression auch in Melanozyten und Fibroblasten erwartet wurde. Für die Melanomzelllinien zeigt sich auch auf Proteinebene eine heterogene EZH2-Expression, wobei nach densitometrischer Auswertung alle Melanomzelllinien eine mindestens zweifach höhere EZH2-Expression als Melanozyten

aufweisen. ChaMel-084 zeigt unter allen analysierten Melanomzelllinien die geringste EZH2-Proteinexpression. Eine im Vergleich zu den Melanozyten etwa dreifach höhere EZH2-Proteinexpression weisen die Melanomzelllinien ChaMel-014 und ChaMel-041 auf. Sk-Mel-13, ChaMel-019 sowie ChaMel-047 befinden sich mit einer etwa sechsfach höheren EZH2-Proteinkonzentration im mittleren Bereich. Sk-Mel-28, ChaMel-091, ChaMel-100 und ChaMel-105 exprimieren im Vergleich zu den Melanozyten auf Proteinebene mehr als das Zehnfache an EZH2.



**Abbildung 8: EZH2-Expression von Melanomzelllinien auf mRNA- und Proteinebene**

(A) Die Bestimmung der EZH2 mRNA-Expression verschiedener Melanomzelllinien erfolgte mittels quantitativer real-time PCR-Analyse. Die Normalisierung der EZH2-Werte wurde gegen die Werte des Referenzgens GAPDH durchgeführt. Der Expressionswert der Melanozyten wurde gleich „1“ gesetzt. Dargestellt wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Dreifachbestimmung. (B) Der spezifische Nachweis von EZH2 erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von  $\beta$ -Aktin. (C) Die Bestimmung der relativen EZH2-Proteinexpression erfolgte mittels densitometrischer Auswertung des Western Blots. Die Normalisierung der EZH2-Werte wurde gegen die Werte des Referenzgens Aktin durchgeführt. Der Expressionswert der Melanozyten wurde gleich „1“ gesetzt. Dargestellt wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

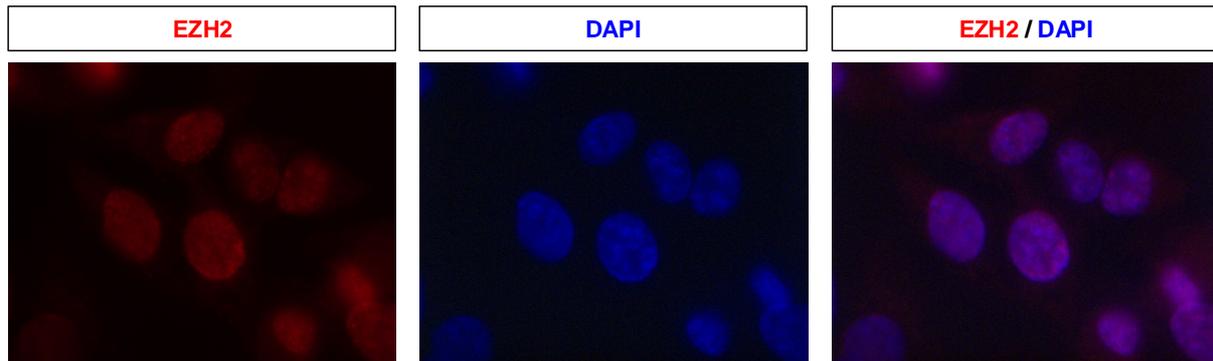
Alle untersuchten Melanomzelllinien weisen eine höhere EZH2-Proteinexpression als Melanozyten auf, so dass die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen bestätigt werden können.

Trotz einer mittleren mRNA-Expression von EZH2 in Fibroblasten und Melanozyten, ist die Expression von EZH2 auf Proteinebene verhältnismäßig gering. Die EZH2-Expression auf RNA-Ebene korreliert nicht in allen untersuchten Proben mit der Proteinexpression. Diese Beobachtungen zur Expression von EZH2 auf der mRNA- und Proteinebene unterstützen die Vermutung, dass die Expression von EZH2 auf der posttranskriptionalen Ebene durch microRNA reguliert werden.

### **3.2 Zelluläre Lokalisation von EZH2**

EZH2 wird als nukleäres Protein beschrieben, was mit der Funktion einer Histonmethyltransferase übereinstimmt. Jedoch gibt es Untersuchungen, wonach EZH2 auch im Cytoplasma lokalisiert ist und dort beispielsweise bei der Polymerisierung von Aktin in Prostatatumorzellen eine Rolle spielt (Bryant et al., 2008).

Um zu überprüfen, wo EZH2 im malignen Melanom subzellulär lokalisiert ist, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht. Dazu wurden die Melanomzellen mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch gegen EZH2 gerichtet ist, markiert. Gleichzeitig wurden die Melanomzellen mit DAPI gegengefärbt. In Abbildung 9 sind beispielhaft die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von ChaMel-105 dargestellt, die eine der höchsten EZH2-Proteinexpressionen aufweist (Abbildung 9). Die mit dem anti-EZH2 Antikörper markierten Bereiche stimmen mit dem mit DAPI gefärbten Nukleus überein. Somit ist EZH2 in den Melanomzellen im Nukleus lokalisiert. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch in anderen Melanomzelllinien (Daten nicht gezeigt).



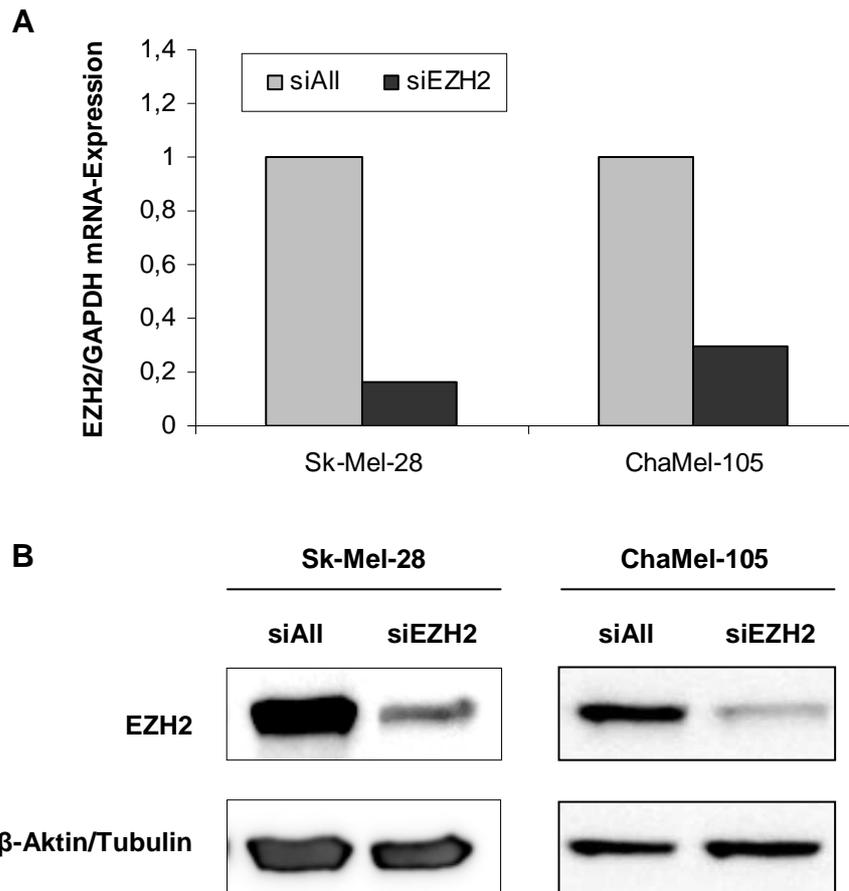
### Abbildung 9: Subzelluläre Lokalisation von EZH2 in Melanomzellen

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von der Melanomzelllinie ChaMel-105 unter Verwendung eines EZH2-spezifischen Antikörpers (rot). Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI (blau) gefärbt. In den Melanomzellen überlagern die mit anti-EZH2 Antikörper markierten Bereiche mit dem mit DAPI gefärbten Nukleus.

### 3.3 siRNA-vermittelter Knockdown von EZH2

Für weitere Untersuchungen, die den Einfluss der Expression von EZH2 auf die Proliferation und Migration im malignen Melanom aufklären, wurde die Expression von EZH2 herunterreguliert. Dazu wurden die Melanomzelllinien Sk-Mel-28 und ChaMel-105, die hohe Level an EZH2 auf Proteinebene exprimieren (Abbildung 8C), mit einer gegen EZH2 gerichteten, spezifischen siRNA transfiziert. Als Negativkontrolle diente die siRNA Allstars, die keine Homologie zu einem bekannten Säugetiergen aufweist. Der Knockdown von EZH2 wurde mittels quantitativer real-time PCR und Western Blot nachgewiesen (Abbildung 10). Bei der quantitativen real-time PCR-Analyse wurden die EZH2-Werte gegen die Werte des Referenzgens GAPDH normalisiert und der Wert der jeweiligen Negativkontrolle (siAll) gleich „1“ gesetzt (Abbildung 10A).

Die mRNA-Expression von EZH2 konnte in den Melanomzelllinien Sk-Mel-28 und ChaMel-105 um 84 % bzw. 70 % reduziert werden (Abbildung 10A). Die EZH2-Bande im Western Blot nach Transfektion mit der EZH2-spezifischen siRNA ist bei beiden Melanomzelllinien deutlich reduziert gegenüber der Kontrolle (Abbildung 10B). Die densitometrische Auswertung der Western Blots ergab eine Reduktion der EZH2 Proteinexpression um 72 % bzw. 80 % in Sk-Mel-28 bzw. ChaMel-105 und bestätigt damit die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR.



#### Abbildung 10: siRNA-vermittelter Knockdown von EZH2

Die Melanomzelllinien Sk-Mel-28 und ChaMel-105, die hohe EZH2-Level exprimieren, wurden mit einer EZH2-spezifischen siRNA (siEZH2) transfiziert. Als Negativkontrolle wurde die siRNA Allstars (siAll) eingesetzt. (A) Mittels quantitativer real-time PCR wurde der Knockdown von EZH2 nachgewiesen. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode. Die Normalisierung der EZH2-Werte wurde gegen die Werte des Referenzgens GAPDH durchgeführt. Der Expressionswert der jeweiligen Negativkontrolle (siAll) wurde gleich „1“ gesetzt. Die Expression von EZH2 wurde um 84 % bzw. 70 % in den Melanomzelllinien Sk-Mel-28 bzw. ChaMel-105 reduziert. (B) Der Western Blot unter Verwendung eines spezifischen EZH2-Antikörpers bestätigte die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von  $\beta$ -Aktin bei Sk-Mel-28 bzw. von Tubulin bei ChaMel-105.

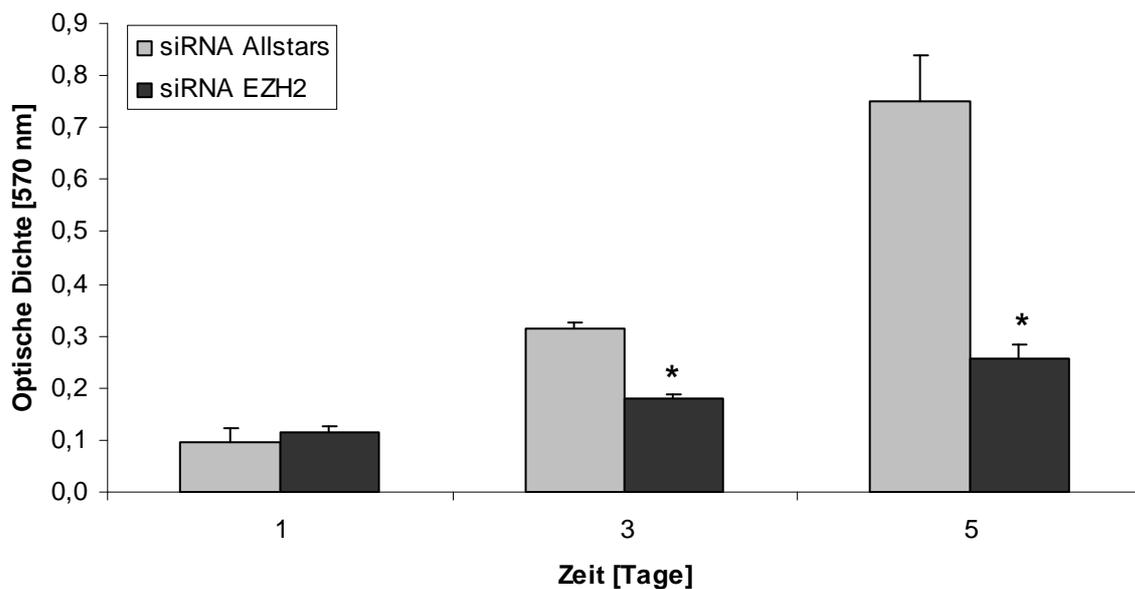
Die EZH2-Expression konnte in den mit siEZH2 behandelten Melanomzelllinien Sk-Mel-28 und ChaMel-105 um mindestens 70 % gegenüber der Kontrolle reduziert werden. Die Transfektionseffizienz erscheint ausreichend, um weitere Experimente basierend auf dem Knockdown von EZH2 durchzuführen.

### 3.4 EZH2-Knockdown hemmt die Proliferation und Migration

Um den Einfluss der EZH2-Expression auf die Proliferation von Melanomzellen zu untersuchen, wurde nach dem Knockdown von EZH2 ein MTT-Proliferationsassay über

einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt. In Abbildung 11 ist das Proliferationsverhalten von Sk-Mel-28 nach einem, drei und fünf Tagen dargestellt.

Die Melanomzellen, die mit EZH2-spezifischer siRNA behandelt wurden, zeigten eine statistisch signifikante Reduktion der Zellproliferation. Nach drei Tagen hat sich diese Zellpopulation nur um das Anderthalbfache vermehrt, während die Kontrollpopulation um das Dreifache gewachsen ist. Nach fünf Tagen haben sich die mit EZH2-spezifischer siRNA transfizierten Melanomzellen verdoppelt. In dem gleichen Zeitraum wuchs die Kontrollpopulation auf das Achtfache der Ausgangspopulation an.



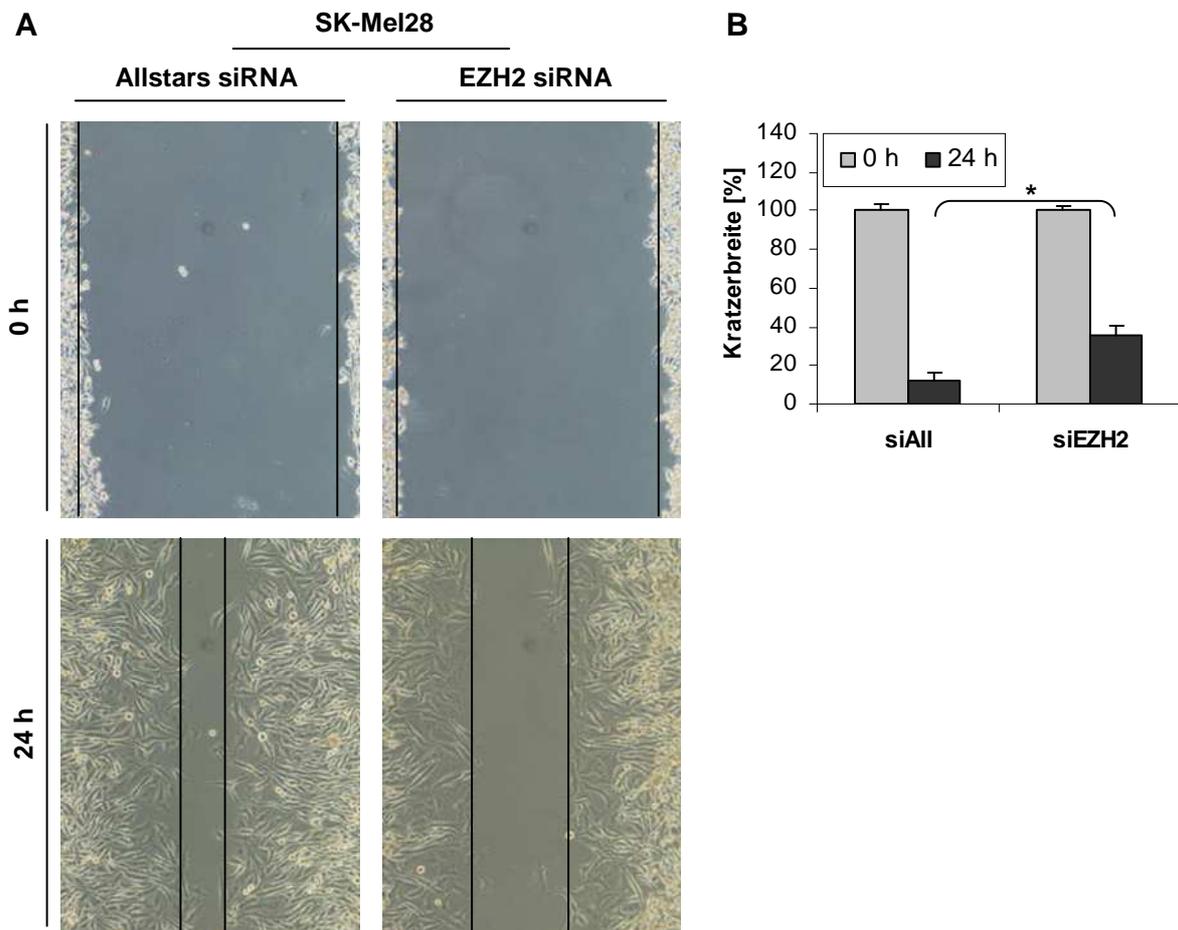
**Abbildung 11: Einfluss des EZH2-Knockdowns auf die Zellproliferation von Sk-Mel-28**

Nach Transfektion von Sk-Mel-28 mit EZH2-spezifischer siRNA und Kontroll-siRNA (Allstars) wurde mit Hilfe des MTT-Assays die Zellproliferation zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs individuellen Werten aus zwei Experimenten, die jeweils aus Dreifachwerten bestanden, sind gezeigt. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) ist durch einen Stern gekennzeichnet.

Die mit EZH2-spezifischer siRNA transfizierten Melanomzellen weisen eine Hemmung der Zellproliferation auf.

Weiterhin wurde der Einfluss des Knockdowns von EZH2 auf das Migrationsverhalten der Melanomzellen untersucht. Hierfür wurde ein *in vitro* Migrationsassay nach Knockdown von EZH2 bei Sk-Mel-28 durchgeführt, bei dem im Zellrasen ein Kratzer verursacht wird (Abbildung 12). Der Verschluß des Kratzers durch migrierende Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels mikroskopischer Aufnahmen festgehalten und ausgewertet.

Im Zellrasen der Melanomzellen, die zum einen mit siAll, zum anderen mit siEZH2 transfiziert wurden, wurde ein gleich breiter Kratzer verursacht. Nach 24 Stunden war bei den mit siAll transfizierten Melanomzellen dieser Kratzer durch migrierende Zellen nahezu geschlossen. Der Kratzer wurde bis auf 12 % der Ausgangsbreite durch migrierende Zellen besiedelt. Dagegen hatte der Spalt der Melanomzellen, die mit EZH2-spezifischer siRNA transfiziert wurden, mit 35 % der Ausgangsbreite fast die dreifache Breite der Kontrollmelanomzellen.



**Abbildung 12: Einfluss des EZH2-Knockdowns auf die Migration von Sk-Mel-28**

(A) Das Migrationsverhalten wurde nach 0 und 24 Stunden mikroskopisch dokumentiert. Die vertikale Linie verdeutlicht das Fortschreiten der Migration. (B) Das Fortschreiten der Migration wurde als Prozent der Ausgangskratzerbreite dargestellt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von fünf vermessenen Bereichen. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) ist durch einen Stern gekennzeichnet.

Melanomzellen, die mit EZH2-spezifischer siRNA behandelt wurden, weisen eine verminderte, migratorische Aktivität auf im Vergleich zu denen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

### 3.5 Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems

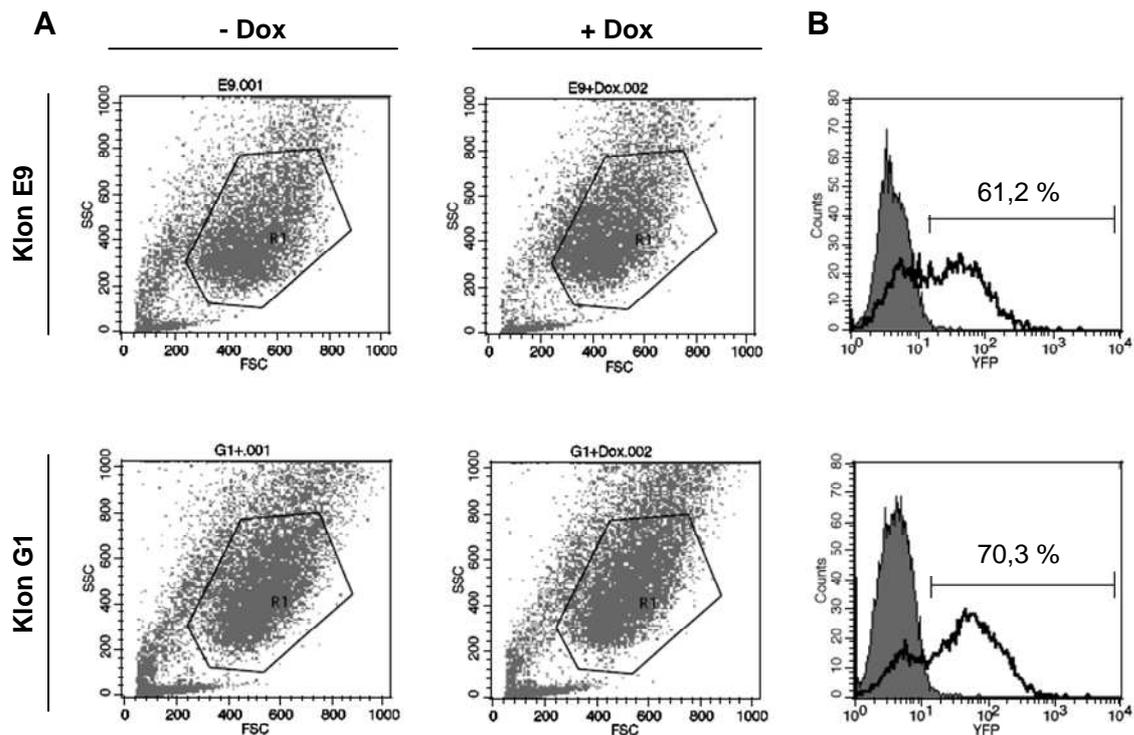
Das Tet-System wurde im Jahr 1992 von Gossen und Bujard entwickelt und basiert auf der Regulation der Genexpression durch das Antibiotikum Tetrazyklin. Mittlerweile gibt es verschiedene Varianten des Systems. Die Grundlage des Systems bilden zwei Plasmide. Das Regulatorplasmid kodiert das Transaktivatorgen, während das Responseplasmid den durch den Transaktivator regulierbaren Promoter und das nachgestellte Zielgen kodiert. Im Tet-off-System wird der Transaktivator durch die Zugabe von Tetrazyklin inaktiviert. Dagegen führt die Zugabe von Tetrazyklin bzw. dessen Derivat Doxyzyklin im Tet-on-System zur Aktivierung des Transaktivators.

Es wurde versucht, sowohl das Tet-on-System in den Melanomzelllinien Sk-Mel-13 und Bro, als auch das Tet-off-System in den Melanomzelllinien Sk-Mel-19 sowie Mel-2a zu etablieren, um die Expression von YFP-EZH2 induzieren zu können. Alle vier Melanomzelllinien waren bereits vor Beginn der Doktorarbeit mit dem Regulatorplasmid stabil transfiziert. Nach Klonierung der YFP-EZH2-Sequenz in das Responseplasmid pTRE2, wurden alle vier Melanomzelllinien mit dem Responseplasmid pTRE2-YFP-EZH2 transfiziert und unter Selektionsdruck kultiviert. Die transfizierten Melanomzellen wurden so stark vereinzelt und auf 96-well-Platten verteilt, dass sich statistisch pro Well nur ein Klon vermehren konnte. Nach Zugabe von Doxyzyklin im Fall des Tet-on-Systems bzw. nach Entzug des Tetrazyklins im Fall des Tet-off-Systems wurden alle Klone hinsichtlich der YFP-Expression unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Aus der Melanomzelllinie Sk-Mel-13 konnten mittels des Tet-on-Systems die zwei Klone E9 und G1 generiert werden, bei denen nach Doxyzyklinzugabe ein Signal im Fluoreszenzmikroskop detektierbar war (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestätigung der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse und zur Bestimmung des Anteils YFP-positiver Zellen wurden die beiden Klone E9 und G1 mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 13). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse wurden in einem Streudiagramm und Histogramm dargestellt.

Im Streudiagramm (Abbildung 13A) wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) dargestellt. Zum Ausschluß toter Zellen wurde eine Region R1 festgelegt, die zur Bestimmung der YFP-positiven Zellen weiter analysiert und im Histogramm (Abbildung 13B) dargestellt wurde. Der Anteil YFP-positiver Zellen betrug nach Doxyzyklinzugabe beim Klon E9 61,2 % und beim Klon G1 70,3 %.

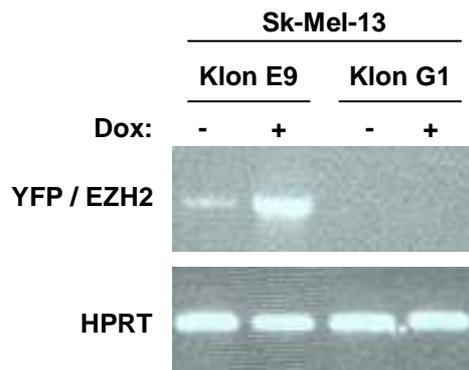


**Abbildung 13: Anteil YFP-positiver Zellen ohne und mit Doxyzyklin**

Durchflusszytometrische Analyse der Sk-Mel-13 Klone E9 und G1 ohne und mit Doxyzyklinzugabe zur Bestimmung des Anteils YFP-positiver Zellen. (A) Darstellung der Zellpopulation im Streudiagramm (Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC)) ohne und mit Doxyzyklinzugabe. Für die Bestimmung der YFP-positiven Zellen wurden nur die mit R1 eingegrenzten Zellen weiter analysiert und im Histogramm dargestellt. (B) Darstellung der Sk-Mel-13 Klone E9 und G1 ohne (grau) und mit (schwarz) Doxyzyklinzugabe im Histogramm. Der Anteil YFP-positiver Zellen nach Doxyzyklinbehandlung ist im Histogramm in % angegeben.

Zur weiteren Charakterisierung wurde mRNA aus den beiden Klonen isoliert und DNA mittels DNase verdaut. Die mRNA wurde in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR-Analyse wurde überprüft, ob die beiden Klone E9 und G1 die vollständige YFP-EZH2-Sequenz exprimieren (Abbildung 14). Dazu wurden zwei Oligonukleotidprimer eingesetzt, bei denen der Forwardprimer an das 5'-Ende der YFP-Sequenz und der Reverseprimer an das 3'-Ende der EZH2-Sequenz bindet.

Nach der PCR, bei der durch den Einsatz der YFP/EZH2-spezifischen Oligonukleotidprimer ein YFP-EZH2-Fragment amplifiziert werden sollte, konnte für den Sk-Mel-13 Klon G1 keine Bande im Agarosegel detektiert werden. Beim Klon E9 konnte sowohl ohne als auch mit Doxyzyklinzugabe ein PCR-Produkt im Agarosegel nachgewiesen werden. Die beiden PCR-Banden des Klons E9 unterscheiden sich stark in der Intensität. Die PCR-Bande ohne Doxyzyklinzugabe ist im Verhältnis zum Haushaltsgen HPRT sehr schwach, was auf eine geringe, unkontrollierte Expression von YFP-EZH2 hindeutet. Nach Doxyzyklinzugabe ist die PCR-Bande um ein Vielfaches intensiver. Dies spricht für die Induktion der Expression von YFP-EZH2.



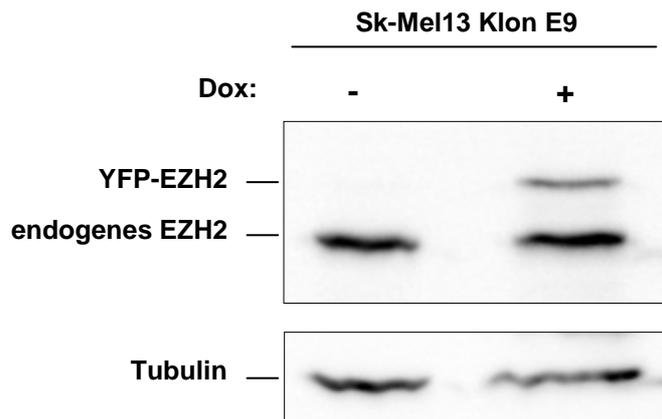
**Abbildung 14: Agarosegel nach PCR mit YFP/EZH2-Oligonukleotidprimern**

Nach Isolierung der mRNA aus den Sk-Mel-13 Klonen E9 und G1, Umschreiben der mRNA in cDNA und DNase-Verdau wurde eine PCR mit Oligonukleotidprimern durchgeführt, die eine Amplifikation des vollständigen YFP-EZH2-Fragmentes ermöglichen. Der Klon G1 weist keine YFP-EZH2-Expression auf. YFP-EZH2 wird beim Klon E9 sowohl ohne, als auch mit Doxyzyklinzugabe exprimiert, wobei die Expression von YFP-EZH2 ohne Doxyzyklinzugabe sehr gering ist.

Der Klon E9 exprimiert die vollständige YFP-EZH2-Sequenz. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse (Abbildung 13) und der PCR-Analyse (Abbildung 14) deuten darauf hin, dass der Klon G1 nur YFP bzw. eine verkürzte Version von YFP-EZH2 exprimiert.

Die Expression des Fusionsproteins YFP-EZH2 wurde beim Sk-Mel-13 Klon E9 mittels Western Blot unter Verwendung eines EZH2-spezifischen Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 15).

Im Western Blot, bei dem ein spezifischer EZH2-Antikörper eingesetzt wurde, konnte ohne Doxyzyklinzugabe beim Klon E9 nur eine Bande in Höhe von 98 kDa detektiert werden (Abbildung 15 - links). Diese entspricht dem endogenen EZH2-Protein. Nach Zugabe von Doxyzyklin wurde zusätzlich zur endogenen EZH2-Bande eine weitere Bande in Höhe von 125 kDa nachgewiesen, die dem Fusionsprotein YFP-EZH2 entspricht (Abbildung 15 – rechts).



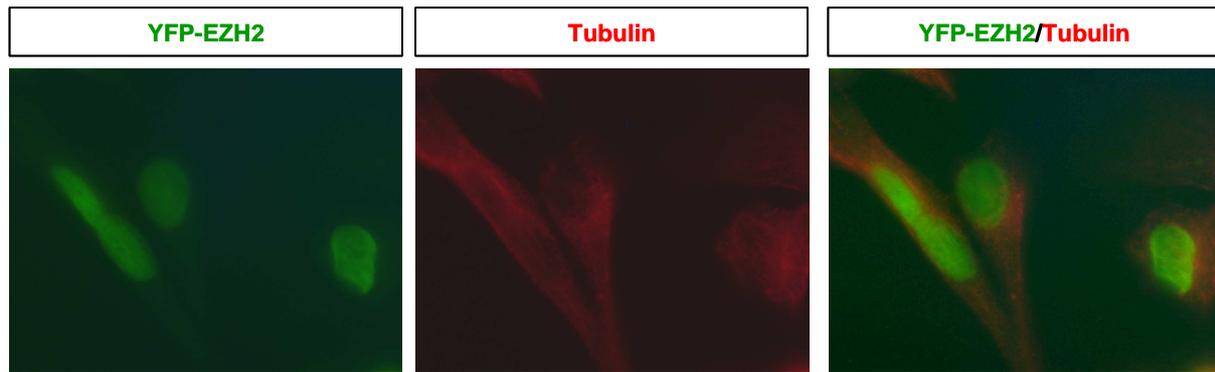
**Abbildung 15: Induzierbare Expression des Fusionsproteins YFP-EZH2 nach Doxyzyklinzugabe**

Nach Transfektion von Sk-Mel-13 mit dem Responseplasmid pTRE2-YFP-EZH2 konnte der Klon E9 isoliert werden, der nach Doxyzyklinzugabe das Fusionsprotein YFP-EZH2 exprimiert. Der Nachweis des Fusionsproteins YFP-EZH2 erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen EZH2-Antikörpers. Zusätzlich zur endogenen EZH2-Bande (98 kDa) ist nach Doxyzyklinzugabe eine weitere Bande (125 kDa) detektierbar, die auf die Expression des Fusionsproteins YFP-EZH2 zurückzuführen ist. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von Tubulin.

Trotz einer geringen Expression von YFP-EZH2 auf mRNA-Ebene, erfolgt ohne Doxyzyklinzugabe keine Expression von YFP-EZH2 auf Proteinebene bzw. ist diese unterhalb der Nachweisgrenze. Erst nach Zugabe von Doxyzyklin ist das Fusionsprotein im Western Blot nachweisbar.

Weiterhin wurde die induzierbare Expression des Fusionsproteins YFP-EZH2 hinsichtlich der subzellulären Lokalisation im Klon E9 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie charakterisiert (Abbildung 16). Das Fusionsprotein YFP-EZH2 besitzt eine Eigenfluoreszenz und ist im Fluoreszenzmikroskop bei Einsatz eines geeigneten Filters im grünen Spektrum sichtbar. Zusätzlich wurde das Cytoskelettprotein Tubulin im roten Spektralbereich visualisiert.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung des endogenen Proteins EZH2 ist das Fusionsprotein YFP-EZH2 im Nukleus der Melanomzellen lokalisiert.

**Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisation von YFP-EZH2 nach Doxyzyklinzugabe**

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Doxyzyklinzugabe unter Verwendung eines Tubulin-spezifischen Antikörpers (rot). Das Fusionsprotein YFP-EZH2 weist eine Eigenfluoreszenz auf (grün). Das Fusionsprotein YFP-EZH2 ist, vergleichbar mit dem endogenen Protein EZH2, ausschließlich im Nukleus lokalisiert.

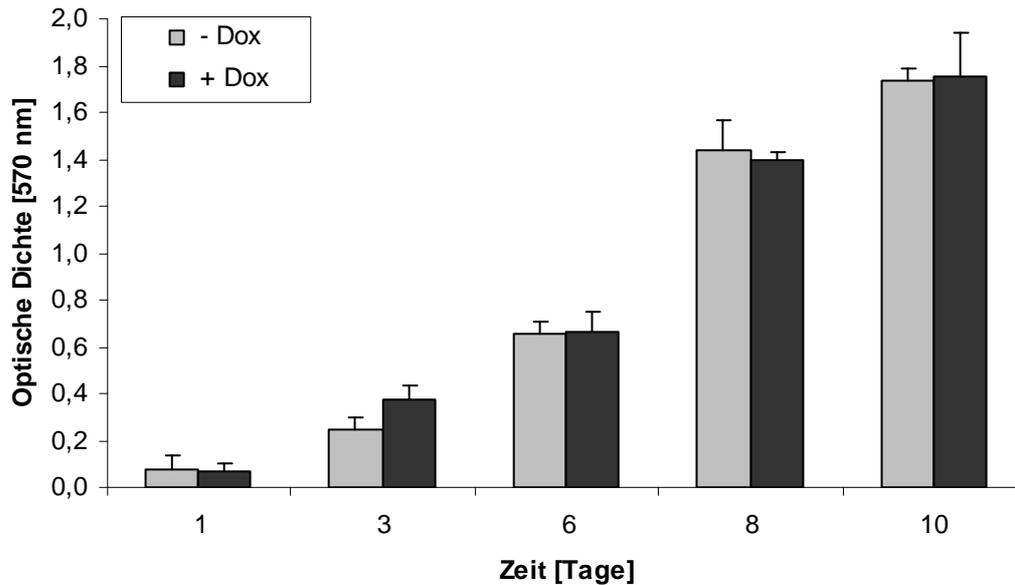
Es konnte ein Klon der Melanomzelllinie Sk-Mel-13 generiert werden, der nach Zugabe von Doxyzyklin das Fusionsprotein YFP-EZH2 exprimiert. Auf diese Weise konnte der EZH2-Level in der Melanomzelle gesteigert werden und die Zellen für weitere Experimente genutzt werden.

**3.6 Induzierte YFP-EZH2-Expression hat keinen Einfluss auf die Proliferation**

Das induzierbare Expressionssystem (Absatz 3.5), bei dem der Sk-Mel-13 Klon E9 nach Doxyzyklinzugabe das Fusionsprotein YFP-EZH2 exprimiert, wurde für weitere Analysen verwendet.

Zunächst wurde der Einfluss der gesteigerten EZH2-Expression auf die Zellproliferation des Sk-Mel-13 Klons E9 untersucht. Hierfür wurde ein MTT-Proliferationsassay über 10 Tage durchgeführt.

Nach Induktion der Expression von YFP-EZH2 durch die Zugabe von Doxyzyklin proliferierten die Melanomzellen über einen Zeitraum von zehn Tagen annähernd genauso schnell wie die Kontrollzellen, bei denen keine Expression des Fusionsproteins induziert wurde (Abbildung 17).



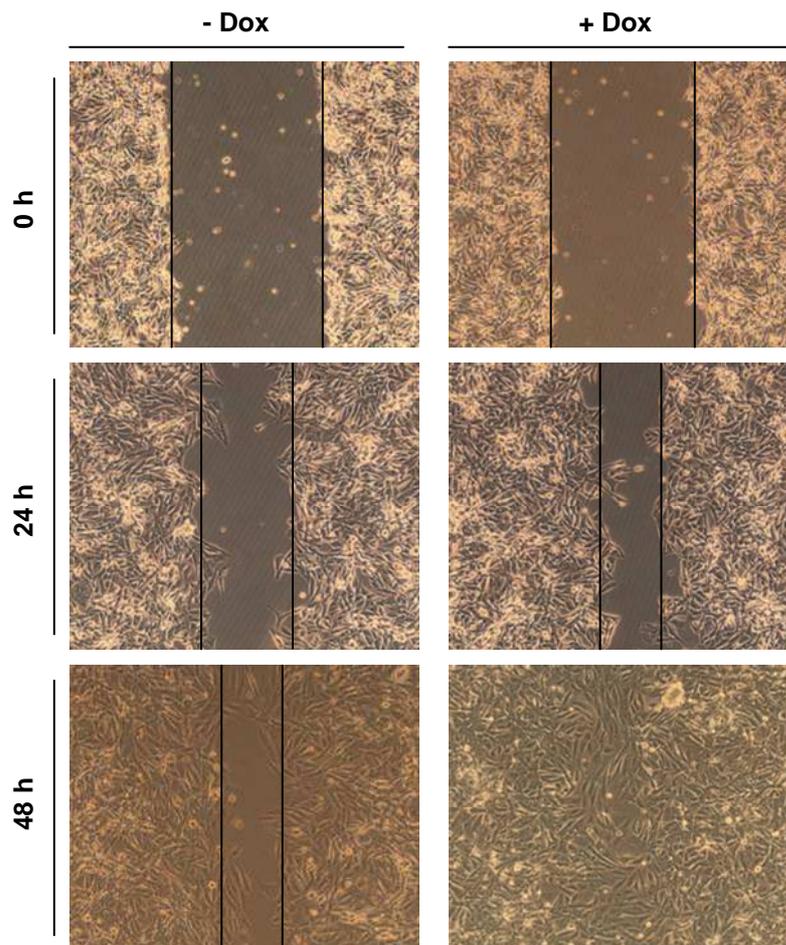
**Abbildung 17: Einfluss der gesteigerten EZH2-Expression auf die Zellproliferation von Klon E9**  
Die Zellproliferation des Sk-Mel-13 Klon E9 (ohne und mit Doxyzyklinzugabe) wurde mittels eines MTT-Assays über 10 Tage bestimmt. Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs individuellen Werten aus zwei Experimenten, die jeweils aus Dreifachwerten bestanden, gezeigt.

Im Gegensatz zur verminderten EZH2-Expression hat die erhöhte EZH2-Expression keinen Einfluss auf die Proliferation der Melanomzellen.

### 3.7 Induzierte YFP-EZH2-Expression steigert die Migration

Zur Untersuchung des Einflusses der erhöhten EZH2-Expression auf die migratorische Aktivität des Klons E9 wurde ein *in vitro* Migrationsassay durchgeführt. Nachdem die Melanomzellen in Ab- und Anwesenheit von Doxyzyklin die vollständige Konfluenz erreicht hatten, wurde im Zellrasen mit einer Pipettenspitze ein Kratzer verursacht (Abbildung 18). Der Verschluss des Kratzers durch migrierende Zellen wurde über 24 und 48 Stunden beobachtet und mittels mikroskopischer Aufnahmen dokumentiert.

Im Vergleich zur Ausgangssituation (0 h) haben die mit Doxyzyklin behandelten Melanomzellen den Spalt bereits nach 24 Stunden über die Hälfte verschlossen. Nach weiteren 24 Stunden war der Spalt vollständig verschlossen. Die Kontrollzellen, bei denen kein Doxyzyklin zugesetzt wurde, haben auch nach 48 Stunden den Spalt noch nicht vollständig schließen können. Das Ergebnis der Kontrollzellen nach 48 Stunden entspricht in etwa dem Ergebnis der mit Doxyzyklin behandelten Zellen nach 24 Stunden. Die Migration der Melanomzellen ist nach Doxyzyklinbehandlung im Vergleich zu den Zellen ohne Doxyzyklinbehandlung um einen Tag beschleunigt.



**Abbildung 18: Einfluss der gesteigerten EZH2-Expression auf die Migration von Klon E9**

Mit Hilfe des *in vitro* Migrationsassays wurde das Migrationsverhalten des Sk-Mel-13 Klons E9 in Ab- und Anwesenheit von Doxyzyklin untersucht. Hierzu wurde ein Kratzer im Zellrasen verursacht. Migrierende Melanomzellen, die den Kratzer wieder verschließen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch dokumentiert. Die vertikale Linie verdeutlicht das Fortschreiten der Migration.

Melanomzellen mit einer gesteigerten EZH2-Expression migrieren schneller als die entsprechenden Zellen, die eine endogene EZH2-Expression aufweisen.

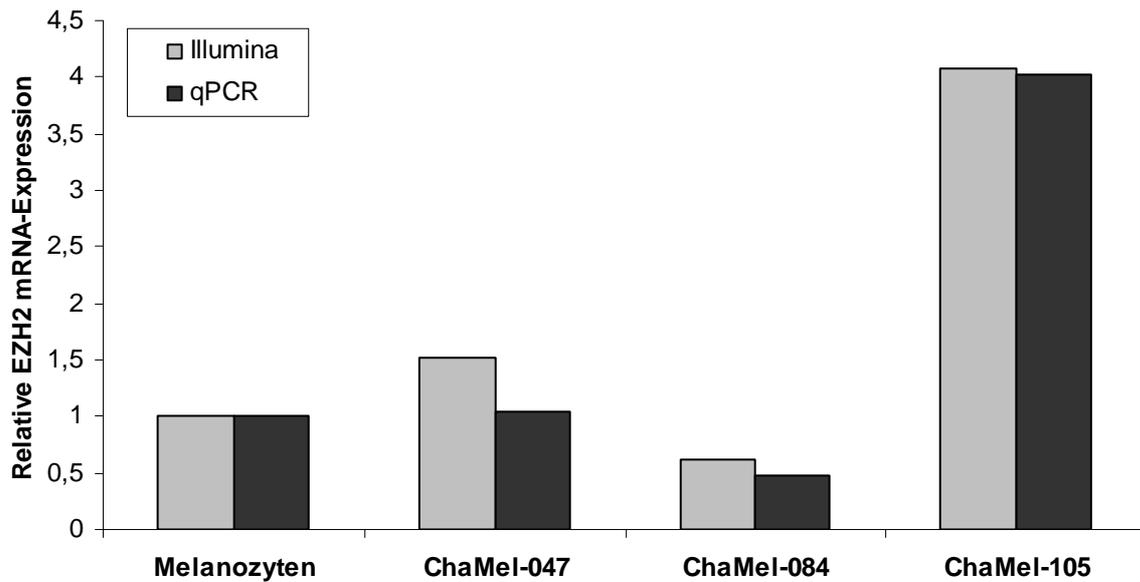
Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit steigender EZH2-Expression die Migration der Melanomzellen zunimmt.

### 3.8 Transkriptomanalyse

Für die Transkriptomanalyse wurden die Illumina WG-6 Chip Arraydaten einer genomweiten mRNA-Expressionsanalyse von Melanozyten sowie von drei Melanomzelllinien verwendet. Es wurden die Melanomzelllinien ChaMel-047, ChaMel-084 und ChaMel-105 verwendet, die sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene unterschiedliche EZH2-Level exprimieren. Während die Melanomzelllinie ChaMel-084 niedrige EZH2-Level aufweist, exprimieren ChaMel-047 und ChaMel-105 EZH2 auf mittlerem bzw. hohem Niveau. Daher sind diese drei Melanomzelllinien für weitere Analysen, die eine Korrelation der EZH2-Expression und der Expression verschiedener EZH2-Zielgene nachweisen, geeignet. Bei den Melanozyten handelte es sich um dieselben, die u.a. auch bei der quantitativen real-time PCR-Analyse zur Bestimmung der EZH2-Expression in Melanozyten und Melanomzellen (Abschnitt 3.1) eingesetzt wurden.

Zunächst wurden die EZH2 mRNA-Expressionwerte des Illumina Arrays mit denen der quantitativen real-time PCR verglichen, um zu überprüfen, ob diese miteinander vergleichbar sind. Dazu wurden die Werte beider Versuche normalisiert und die Werte der Melanozyten gleich „1“ gesetzt.

ChaMel-105 besitzt relativ zu den Melanozyten eine vierfach höhere und damit die höchste EZH2-Expression unter den drei mittels Illumina Array analysierten Melanomzelllinien. Die Melanomzelllinie ChaMel-047 weist mit den Melanozyten vergleichbare Expressionswerte auf, während ChaMel-084 EZH2 auf einem niedrigeren Niveau exprimiert (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Vergleichsanalyse der EZH2 mRNA-Expressionsdaten des Illumina Arrays mit der quantitativen real-time PCR**

Die mRNA-Expressionswerte des Illumina Arrays und der quantitativen real-time PCR wurden normalisiert und die der Melanozyten wurden gleich „1“ gesetzt. Die relativen EZH2 mRNA-Expressionswerte der quantitativen real-time PCR sind mit denen des Illumina Arrays vergleichbar.

Die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR sind mit denen des Illumina Arrays vergleichbar und werden durch diese bestätigt. Die mRNA-Expressionswerte des Illumina Arrays können für die nachfolgende Korrelationsanalyse verwendet werden.

### 3.9 Korrelationsanalyse zur Identifizierung von EZH2-Zielgenen

Es existieren bereits einige Studien, die die Rolle des EZH2 in der Entstehung und Progression anderer Tumorentitäten, insbesondere beim Prostatakrebs, untersucht haben. Dabei wurde eine Vielzahl an EZH2-Zielgenen, deren Expression unter der Regulation von EZH2 stehen, identifiziert. Die bisherigen Untersuchungen in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Expression von EZH2 einen Einfluss auf die Proliferation und die Migration von Melanomzellen besitzt. Weiterhin ist die Proteinexpression von EZH2 in den Melanomzelllinien, die allesamt aus Metastasen von Melanopatienten isoliert wurden, im Vergleich zu den Melanozyten erhöht, so dass ein Zusammenhang zwischen der erhöhten EZH2-Expression und der Metastasierung von Melanomen bestehen könnte. Bei der nachfolgenden Korrelationsanalyse wurden daher bekannte EZH2-Zielgene ausgewählt, die im Zusammenhang mit der Proliferation, Migration, Invasion, Angiogenese sowie Metastasierung von Tumorzellen stehen. Dazu wurden die relativen mRNA-Expressionswerte des Illumina Arrays (Abschnitt 3.8) verwendet und einer

Korrelationsanalyse unterzogen. Die drei verwendeten Melanomzelllinien exprimieren sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene EZH2 auf niedrigem, mittlerem und hohem Niveau. Die relativen EZH2 mRNA-Expressionswerte, die im Illumina Array gewonnen wurden, wurden in Korrelation zu den Expressionswerten ausgewählter EZH2-Zielgene gesetzt.

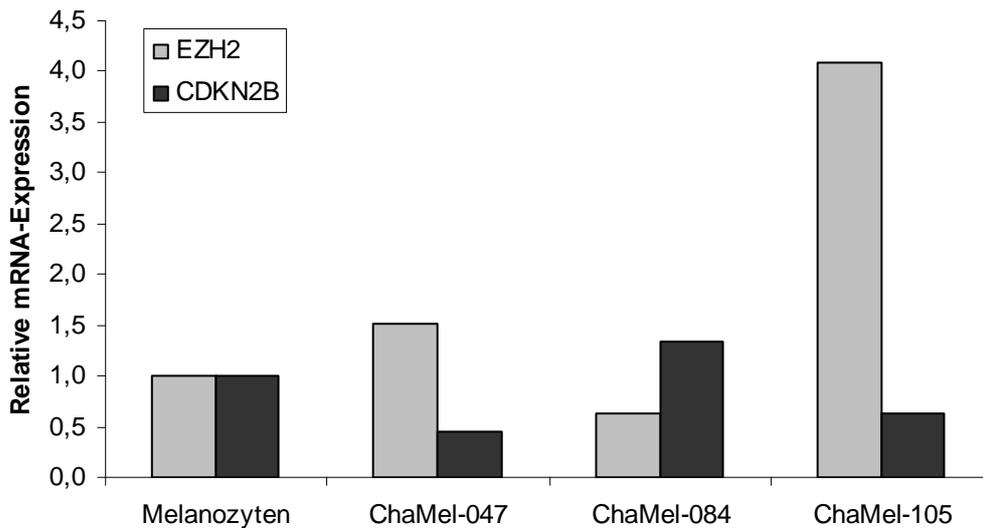
Es handelt sich bei EZH2 um einen negativen Regulator, der durch die Trimethylierung des Histons H3 die Repression der Expression dieser EZH2-Zielgene bewirkt. Daher wird erwartet, dass hohe EZH2-Expressionswerte mit einer geringen Expression der Zielgene und umgekehrt niedrige EZH2-Expressionswerte mit einer hohen Expression der Zielgene einhergehen.

### **3.9.1 Proliferation**

Der cyclinabhängige Kinaseinhibitor CDKN2B, der auch als Multipler Tumorsuppressor (MTS-2) und p15INK4B bekannt ist, verhindert den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus und kontrolliert so die zelluläre Proliferation. Dazu formt CDKN2B einen Komplex mit den cyclinabhängigen Kinasen CDK4 und CDK6. Diese wiederum können dann nicht durch Cyclin D aktiviert werden.

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der EZH2-Expression und der CDKN2B-Expression besteht, wurden die CDKN2B-Expressionswerte des Illumina-Arrays in Relation zu den EZH2-Expressionswerten gesetzt.

Die Melanomzelllinien ChaMel-105 und ChaMel-047 mit einer hohen bzw. mittleren EZH2-Expression weisen eine um die Hälfte geringere CDKN2B-Expression auf als die Melanozyten. Dagegen besitzt die Melanomzelllinie ChaMel-084 mit einer niedrigen EZH2-Expression eine um 1,5-fach höhere EZH2-Expression als die Melanozyten (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Relative mRNA-Expression von EZH2 und CDKN2B**

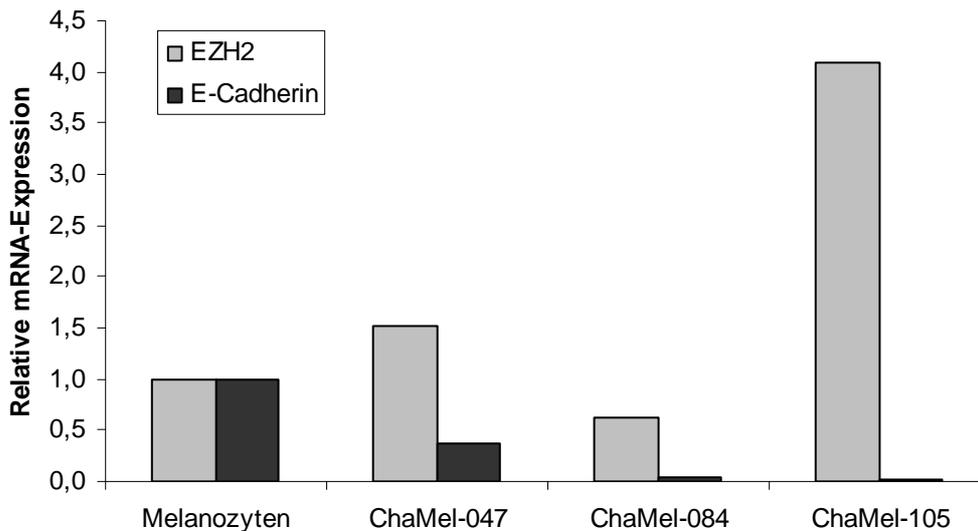
Es wurden die mRNA-Expressionswerte eines Illumina Arrays von Melanozyten und drei Melanomzelllinien, die unterschiedliche EZH2-Level exprimieren, verwendet. Hierfür wurden die mRNA-Expressionswerte des Illumina Arrays normalisiert und die der Melanozyten wurden gleich „1“ gesetzt.

Die CDKN2B-Expressionswerte korrelieren invers mit den EZH2-Expressionswerten. CDKN2B ist ein potentiell Zielgen, das durch EZH2 negativ reguliert werden könnte.

### 3.9.2 Migration und Invasion

Die Ergebnisse des Knockdowns sowie der induzierten Expression von EZH2 deuten daraufhin, dass EZH2 eine Rolle bei der Migration der Melanomzellen spielt. E-Cadherin, eines der wichtigsten Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, ist ein bekanntes EZH2-Zielgen. In Prostata- und Brustkrebs ist E-Cadherin durch die Methyltransferaseaktivität von EZH2 epigenetisch stillgelegt (Cao et al., 2008). Der Verlust von E-Cadherin steht in einem engem Zusammenhang mit der Migration und Invasion von Tumorzellen, u.a. auch beim malignen Melanom (Danen et al., 1996). Daher ist zu prüfen, ob die Expression von E-Cadherin mit der von EZH2 korreliert. Hierfür wurden die mRNA-Expressionswerte des Illumina Arrays (Abschnitt 3.8) verwendet.

Die drei Melanomzelllinien weisen unterschiedlich hohe EZH2-Expressionslevel auf. Während ChaMel-084 und ChaMel-105 kein E-Cadherin exprimieren, weist ChaMel-047 eine im Verhältnis zu den Melanozyten stark reduzierte Expression von E-Cadherin auf (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Relative mRNA-Expression von EZH2 und E-Cadherin**

Es wurden die mRNA-Expressionswerte eines Illumina Arrays von Melanozyten und drei Melanomzelllinien, die unterschiedliche EZH2-Level exprimieren, verwendet. Hierfür wurden die mRNA-Expressionswerte des Illumina Arrays normalisiert und die der Melanozyten wurden gleich „1“ gesetzt.

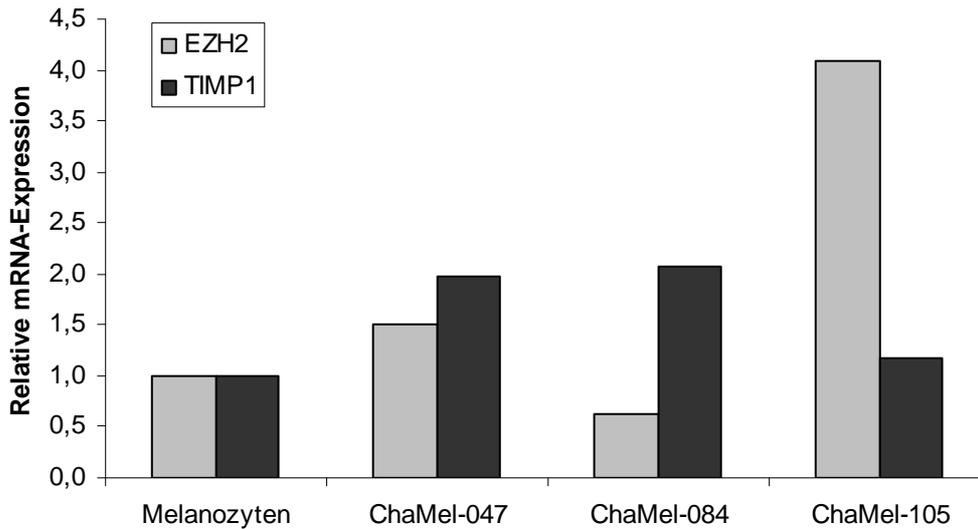
Unabhängig von der EZH2-Expression ist die Expression von E-Cadherin bei allen drei Melanomzelllinien stark reduziert bzw. nicht vorhanden. Die Expression von E-Cadherin scheint in Melanomzellen nicht unter der Regulation von EZH2 zu stehen.

### 3.9.3 Metastasierung

Die Degradierung der extrazellulären Matrix (EZM) ist ein kritischer Schritt in der Metastasierung des Tumors und wird durch das Verhältnis zwischen Matrixmetalloproteinasen sowie deren Inhibitoren, den Mitgliedern der TIMP-Familie (TIMP1-4) bestimmt. Innerhalb des Tumors ist dieses Verhältnis oftmals in Richtung der Matrixmetalloproteinasen verschoben. Die Expression einzelner Mitglieder der TIMP-Familie ist u.a. im Prostatakrebs reprimiert. Es wurde gezeigt, dass EZH2 dabei eine aktive Rolle spielt (Shin und Kim, 2012).

Hier wurden die mRNA-Expressionswerte von EZH2 und TIMP1 der drei verschiedenen Melanomzelllinien in einem Balkendiagramm miteinander verglichen.

Die Melanomzelllinie ChaMel-105 besitzt die höchste EZH2-Expression und gleichzeitig die geringste TIMP1 Expression. Dagegen exprimiert ChaMel-084 den geringsten EZH2-Level und den höchsten TIMP1-Level. Allerdings ist der TIMP1-Level von ChaMel-084 mit dem von ChaMel-047, die eine mittlere EZH2-Expression aufweist, vergleichbar (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Relative mRNA-Expression von EZH2 und TIMP1**

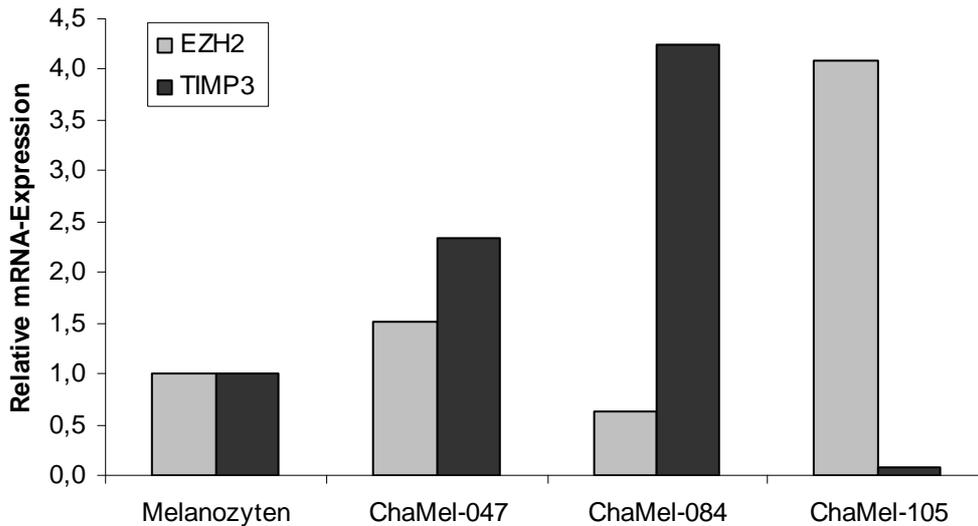
Es wurden die mRNA-Expressionswerte eines Illumina Arrays von Melanozyten und drei Melanomzelllinien, die unterschiedliche EZH2-Level exprimieren, verwendet. Hierfür wurden die mRNA-Expressionswerte des Illumina Arrays normalisiert und die der Melanozyten wurden gleich „1“ gesetzt.

Eine Korrelation der Expression von EZH2 und TIMP1 ist nicht für alle drei Melanomzelllinien zu beobachten.

Auch für TIMP2 und TIMP4, wie für TIMP1 beispielhaft gezeigt, konnte keine Korrelation zur EZH2-Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Vertreter der TIMP-Familie ist TIMP3. Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionswerte von EZH2 und TIMP3 ist in Abbildung 23 dargestellt.

Die Melanomzelllinie ChaMel-084 mit der geringsten EZH2-Expression weist eine relativ zu den Melanozyten vierfach höhere TIMP3-Expression auf. Dagegen exprimiert ChaMel-105 mit der höchsten EZH2-Expression nahezu kein TIMP3. Die Melanomzelllinie mit einer mittleren EZH2-Expression, ChaMel-047, weist im Vergleich zu den anderen Melanomzelllinien eine mittlere TIMP3-Expression auf.



**Abbildung 23: Relative mRNA-Expression von EZH2 und TIMP3**

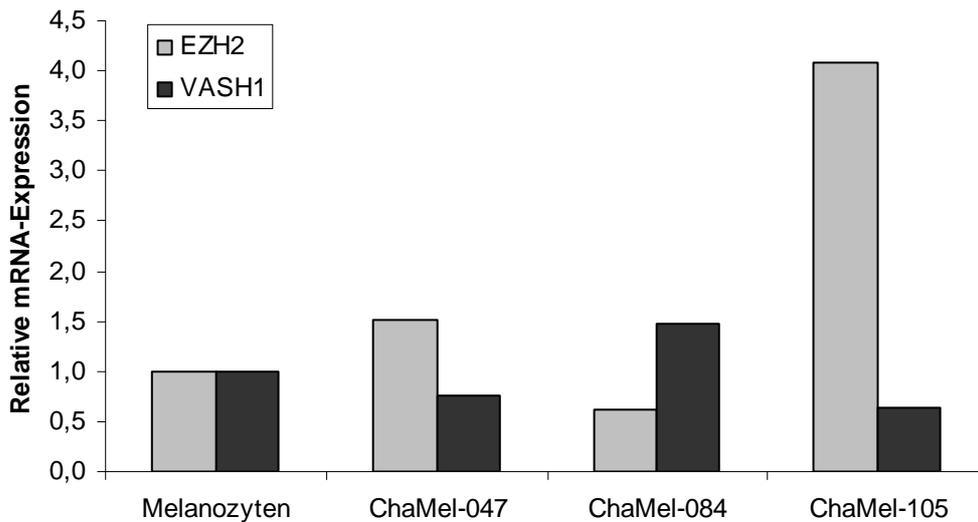
Es wurden die mRNA-Expressionswerte eines Illumina Arrays von Melanozyten und drei Melanomzelllinien, die unterschiedliche EZH2-Level exprimieren, verwendet. Hierfür wurden die mRNA-Expressionswerte des Illumina Arrays normalisiert und die der Melanozyten wurden gleich „1“ gesetzt.

Die Ergebnisse des Illumina Arrays deuten darauf hin, dass die TIMP3-Expression unter der epigenetischen Kontrolle von EZH2 steht.

### 3.9.4 Angiogenese

Der Prozess der Angiogenese ist für die Progression und Metastasierung einer Vielzahl solider Tumore, das maligne Melanom mit eingeschlossen, entscheidend. Vasohibin 1 (VASH1) ist ein löslicher Inhibitor der Tumorangio-genese und dessen Expression wird durch EZH2 im Ovarialkarzinom epigenetisch reprimiert (Lu et al., 2010).

Die Melanomzelllinie ChaMel-084 mit der geringsten EZH2-Expression weist die höchste VASH1-Expression auf. Die VASH1-Expression ist um 50 % relativ zu den Melanozyten erhöht. Dagegen exprimieren die Melanomzelllinien ChaMel-047 und ChaMel-105 geringere VASH1-Level relativ zu den Melanozyten. ChaMel-047 weist mit einer mittleren EZH2-Expression eine 20 % geringere VASH1-Expression im Verhältnis zu den Melanozyten auf. Bei ChaMel-105, die den höchsten EZH2-Level besitzt, ist die VASH1-Expression um 40 % gegenüber den Melanozyten und um knapp 60 % gegenüber ChaMel-087 reduziert (Abbildung 24).



#### Abbildung 24: Relative mRNA-Expression von EZH2 und VASH1

Es wurden die mRNA-Expressionswerte eines Illumina Arrays von Melanozyten und drei Melanomzelllinien, die unterschiedliche EZH2-Level exprimieren, verwendet. Hierfür wurden die mRNA-Expressionswerte des Illumina Arrays normalisiert und die der Melanozyten wurden gleich „1“ gesetzt.

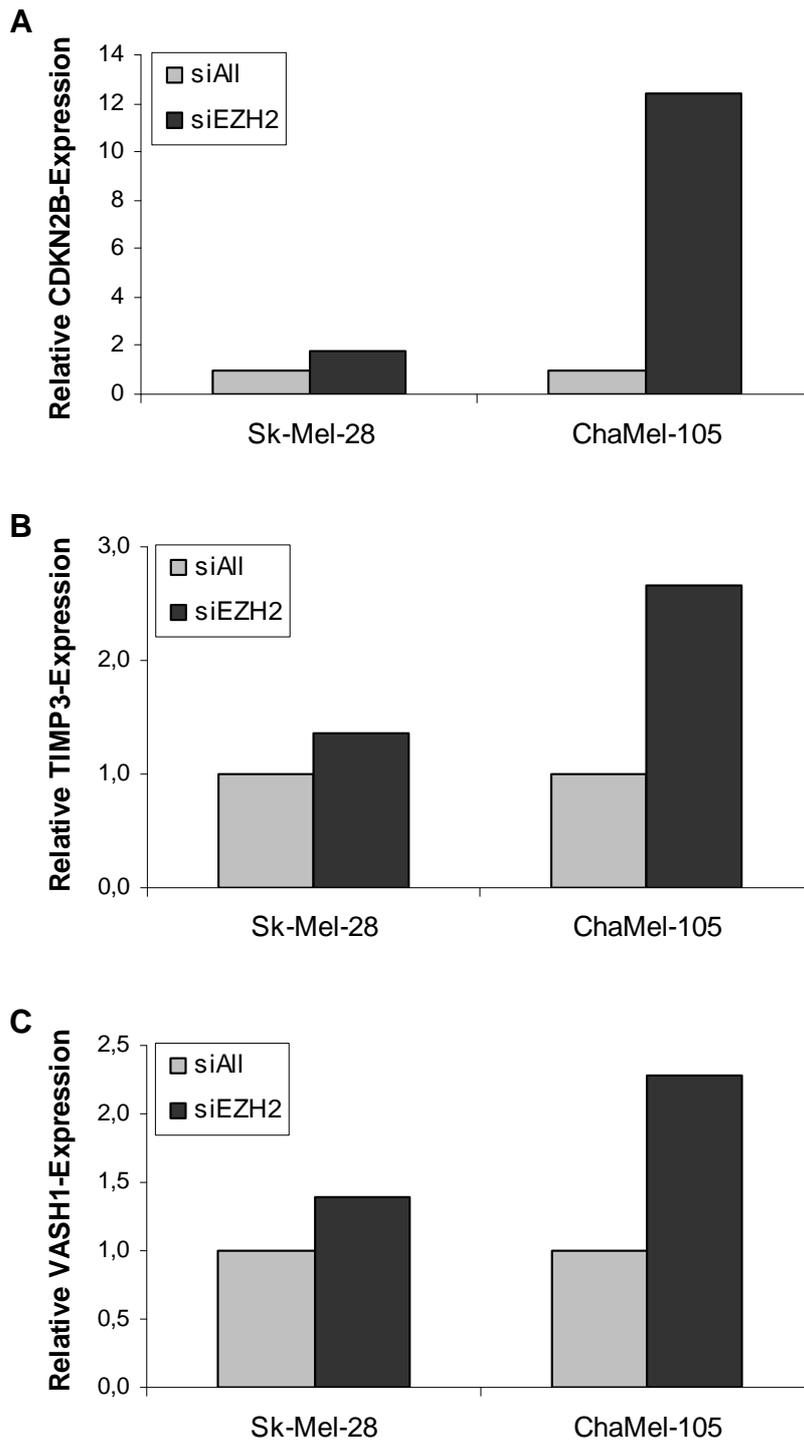
Die VASH1-Expression korreliert invers mit der EZH2-Expression.

Die Expression von CDKN2B, TIMP3 und VASH1 korreliert invers mit der EZH2-Expression. Die Gene dieser drei Kandidaten könnten demnach unter der epigenetischen Regulation von EZH2 stehen und damit potentielle EZH2-Zielgene im malignen Melanom darstellen. Diese drei Kandidaten müssen nunmehr durch Knockdownexperimente validiert werden.

### 3.10 Validierung der EZH2-Zielgene

Um zu überprüfen, ob die drei Kandidatengene CDKN2B, TIMP3 und VASH1 im malignen Melanom unter der epigenetischen Regulation von EZH2 stehen, wurde deren mRNA-Expression in zwei Melanomzelllinien mit und ohne Knockdown von EZH2 quantitativ bestimmt. Dazu wurden erneut die Melanomzelllinien Sk-Mel-28 und ChaMel-105 mit siRNA transfiziert, so dass die EZH2-Expression um mindestens 70 % gegenüber der Kontrolle vermindert wurde (Abschnitt 3.3). Anschließend wurde die relative mRNA-Expression von CDKN2B, TIMP3 und VASH1 mittels quantitativer real-time PCR bestimmt.

Die Expression von CDKN2B ist bei ChaMel-105 um das Zwölfwache gegenüber der Kontrolle erhöht, während Sk-Mel-28 nur eine 1,7-fache Steigerung der Expression aufweist (Abbildung 25A). TIMP3 ist in der Melanomzelllinie Sk-Mel-28 um den Faktor 1,4 und in ChaMel-105 um den Faktor 2,7 erhöht (Abbildung 25B). Bei Sk-Mel-28 ist die Expression von VASH1 ebenfalls um das 1,4-fache erhöht, während sie bei ChaMel-105 um das 2,3-fache erhöht ist (Abbildung 25C).



**Abbildung 25: Relative mRNA-Expression von CDKN2B, TIMP3 und VASH1 nach siRNA vermitteltem Knockdown von EZH2**

Nach Transfektion der Melanomzelllinien Sk-Mel-28 und ChaMel-105 mit einer EZH2-spezifischen siRNA (siEZH2) wurden die Expressionswerte verschiedener Kandidatengene bestimmt. Als Negativkontrolle wurden die Melanomzelllinien mit der siRNA Allstars (siAll) behandelt. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode. Die Normalisierung der jeweiligen Expressionswerte erfolgte gegen die Werte des Referenzgenes GAPDH. Der Expressionswert der jeweiligen Negativkontrolle (siAll) wurde gleich „1“ gesetzt. Es wurden die relativen mRNA-Expressionswerte von CDKN2B (A), TIMP3 (B) und VASH1 (C) dargestellt.

Die Melanomzelllinie ChaMel-105 weist nach Knockdown von EZH2 bei allen drei Zielgenen eine zum Teil stark gesteigerte Expression auf, während Sk-Mel-28 nur eine minimal erhöhte Expression zeigt. Besonders auffällig ist die gesteigerte Expression von CDKN2B nach EZH2-Knockdown in der Melanomzelllinie ChaMel-105.

## 4 Diskussion

### 4.1 EZH2-Expression

EZH2 ist die katalytische Untereinheit des Polycomb Repressive Komplexes 2. Dieser Komplex ist für die Trimethylierung des Histon H3 am Lysinrest 27 (H3K27me3) verantwortlich. Die Histonmodifikation führt zu einer Chromatinkondensation und damit zu einer Genrepression (De Haan und Gerrits, 2007; Burdach et al., 2009). Microarraystudien wiesen erstmalig auf eine Verbindung zwischen der Überexpression von EZH2 und Prostatakrebs (Varambally et al., 2002) sowie Brustkrebs (Kleer et al., 2003) hin. Die Überexpression von EZH2 beim Prostatakrebs ist mit einer aggressiven und metastasierenden Krankheit assoziiert. Bei Brustkrebs wurden erhöhte EZH2-Level im invasiven Tumor und in Metastasen nachgewiesen. Weiterhin ist das EZH2-Gen in zahlreichen Tumoren, u.a. bei Darm-, Lungen-, Blasen- und Pankreaskrebs sowie beim Lymphom amplifiziert, mutiert oder überexprimiert. Die Überexpression von EZH2 korreliert auch hier oftmals mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium sowie einer schlechten Prognose für den Patienten (Sauvageau und Sauvageau, 2010).

In dieser Arbeit wurde die Expression von EZH2 in einer Auswahl von Melanomzelllinien mittels quantitativer real-time PCR und Western Blot analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass auf Proteinebene alle untersuchten Melanomzelllinien eine im Vergleich zu den Melanozyten erhöhte EZH2-Expression aufweisen.

Bisher wurde die Expression von EZH2 im malignen Melanom nur immunhistochemisch untersucht (McHugh et al., 2007). Durch diese Analysen konnte in Gewebeproben bereits für das maligne Melanom gezeigt werden, dass mit Zunahme des Melanomstadiums sich die EZH2-Proteinexpression erhöht (McHugh et al., 2007). In gutartigen Nävi konnte keine EZH2-Expression in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Ein statistisch signifikanter Anstieg der EZH2-Expression konnte dagegen im invasiven Melanom beobachtet werden. Die höchste EZH2-Expression wiesen Gewebeproben des metastasierten Melanoms auf (McHugh et al., 2007). Die Ergebnisse der EZH2-Expression mittels Western Blot Analyse in der hier vorliegenden Arbeit bestätigen diese immunhistochemischen Untersuchungen. Das Protein EZH2 ist in gesunden Zellen, wie den Melanozyten, nur schwach exprimiert, während es in metastasierten Melanomzellen verhältnismäßig stark exprimiert ist (Abbildung 8B). Damit sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen, die am Tumorgewebe stattfanden, auch auf das Zellkultursystem übertragbar.

## 4.2 Regulation der EZH2-Expression

Während die mRNA-Werte mit der Proteinexpression in den Melanomzelllinien korrelieren, fehlt diese Korrelation bei den Melanozyten und Fibroblasten (Abbildung 8). Eine mögliche Erklärung für die hohen mRNA-Werte und die dazu im Kontrast stehende niedrige Proteinexpression in den Melanozyten und Fibroblasten könnten miRNA sein. Die miRNA sind endogene, etwa 21 bis 25 Nukleotide lange, einzelsträngige, nichtkodierende RNA. Diese können die Proteinexpression regulieren, indem sie entweder durch Bindung an den 3' untranslatierten Bereich der mRNA die Translation inhibieren oder die Degradation der mRNA induzieren (Wu et al., 2006; Selbach et al., 2008). Humane miRNA sind an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. Es wird geschätzt, dass etwa 30 % aller kodierenden Gene durch miRNA reguliert werden (Lewis et al., 2005). Bei der Analyse der miRNA-Profile verschiedener humaner Tumoren wurde festgestellt, dass im Allgemeinen die miRNA in den Tumoren verglichen mit Normalgewebe herunterreguliert sind (Lu et al., 2005). Dies trifft auch auf die miR-101 zu, deren Expression während der Tumorprogression abnimmt. Im Prostatakrebs führt der Verlust der miR-101 zu einer Überexpression von EZH2 (Varambally et al., 2008). Im malignen Melanom scheint die miRNA-101 keine Rolle bei der Regulation der EZH2-Expression zu spielen (Yi et al., 2009). Vielmehr konnte in einer neueren Studie gezeigt werden, dass eine im Vergleich zu den Melanozyten verminderte Expression der miR-31 im malignen Melanom bzw. in Melanomzelllinien gehäuft auftritt. In manchen Melanomen konnte gar keine miR-31 nachgewiesen werden. Dies konnte zum Teil auf den Verlust der Chromosomenregion 9p21 im malignen Melanom, die u.a. die miR-31 umfasst, zurückgeführt werden. Letztendlich wurde in derselben Studie festgestellt, dass die miR-31 die Expression von EZH2 negativ reguliert (Asangani et al., 2012). Für die miR-137 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese als eine Art Tumorsuppressor in verschiedenen Tumorarten, das maligne Melanom eingeschlossen, fungiert. Es wurde nachgewiesen, dass eine geringe Expression der miR-137 mit einer schlechten Prognose der Melanompatienten im Stadium IV einhergeht. Weiterhin konnte in der Studie EZH2 als bekanntes Zielgen der miR-137 bestätigt werden (Luo et al., 2012). Diese Studien zeigen, dass die EZH2-Expression negativ durch miRNA reguliert wird. Zudem bieten die Studien eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den mRNA- und Proteinexpressionswerten der Melanozyten bzw. Fibroblasten. In gesundem Gewebe, wie den Melanozyten, bewirken normal hohe Level der microRNA-31 die Blockade der Translation. Somit wird EZH2 trotz hoher mRNA-Werte auf Proteinebene nur geringfügig exprimiert. Dagegen kann in Melanomzellen auf Grund fehlender bzw. reduzierter miRNA die EZH2-mRNA in ein Protein translatiert werden.

### 4.3 EZH2 als Onkogen

Im Verlauf der Tumorprogression durchdringen Tumorzellen die Basalmembran und wandern in die extrazelluläre Matrix ein. Dieser Vorgang, der als Invasion bezeichnet wird, ist Voraussetzung für das Ablösen einzelner Tumorzellen aus dem Zellverband und deren Migration sowie Intravasation in andere Regionen des Körpers, wo sie als Metastasen weiterwachsen können. Das maligne Melanom ist ein Tumor, der früh dazu neigt zu metastasieren. Etwa 20 % aller malignen Melanome sind bei der Diagnose bereits metastasiert. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate des Patienten mit einem malignen Melanom im Stadium IV beträgt nur noch etwa 10 % (Garbe et al., 2011).

Für EZH2 bestehen experimentelle Nachweise, dass es als Onkogen direkt zur Karzinogenese beiträgt. Speziell für verschiedene Tumorentitäten wurde gezeigt, dass EZH2 die Zellproliferation stimuliert, die Apoptose blockiert, die Zellinvasion und Metastasierung unterstützt, die Tumorangiogenese aktiviert und Tumore im Mausmodell induziert (Lu et al.; Rao et al.; Varambally et al., 2002; Bracken et al., 2003; Kleer et al., 2003; Tan et al., 2007; Ougolkov et al., 2008; Wagener et al., 2008). Allerdings wurden derartige Untersuchungen noch nicht für das maligne Melanom durchgeführt.

#### 4.3.1 Proliferation

In einer Studie mit ca. 700 Patienten (Melanom, Prostatakrebs, Brustkrebs und Endometriumkarzinom) wurde gezeigt, dass EZH2 und die Tumorzellproliferation miteinander korrelieren. Dazu wurden die EZH2-Expression sowie die Ki-67-Expression im Gewebe verschiedener Tumorentitäten bestimmt. Im Vergleich zu Tumoren mit einer geringen EZH2-Expression wiesen solche mit hoher EZH2-Expression eine gesteigerte Tumorzellproliferation auf (Bachmann et al., 2006). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der EZH2-Expression auf die Proliferation im malignen Melanom untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von EZH2 mit einer verringerten Proliferation der Melanomzelllinie Sk-Mel-28 assoziiert ist (Abbildung 11). Dagegen hat eine gesteigerte EZH2-Expression keinen weiteren Einfluss mehr auf die Proliferation der Melanomzelllinie (Abbildung 17). Die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit denen der Studie von Bachmann et. al. deuten darauf hin, dass EZH2 die Proliferation in Melanomzellen stimuliert.

In vergleichbaren Untersuchungen, in denen Zellen verschiedener Tumorentitäten mit EZH2-spezifischer siRNA transfiziert wurden, wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet. In U2OS-Zellen resultierte die verringerte EZH2-Expression in einer starken Inhibition der Zellproliferation. Ähnliche Reduktionen der Zellproliferation wurden in anderen

transformierten Zellen wie HeLa, SAOS2 sowie in den diploiden Fibroblasten TIG3, WI38 und HEL299 beobachtet. Wiederum konnte Bracken et. al. zeigen, dass die ektopische Expression von EZH2 in primären Zellen einen proliferativen Vorteil verschafft (Bracken et al., 2003). Fussbroich et. al. konnten in drei unabhängigen Experimenten nachweisen, dass die Repression der EZH2-Expression einen antiproliferativen Effekt in Darmkrebszellen zur Folge hat. Es wurde geschlußfolgert, dass EZH2 die Proliferation im Darmkrebs stimuliert (Fussbroich et al., 2011).

Die molekularen Mechanismen, durch die EZH2 die Zellproliferation stimuliert, sind insbesondere für das maligne Melanom noch unbekannt. Als ausschlaggebende Komponente des PRC2 führt die Expression von EZH2 vermutlich zur Repression antiproliferativer Gene.

Mittels der Transkriptomanalyse konnte in dieser Arbeit eine inverse Korrelation der EZH2-Expression mit der Expression des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors CDKN2B nachgewiesen werden (Abbildung 20). Weiterhin wurde untersucht, ob EZH2 die Expression des CDKN2B-Genes unterdrückt. Dazu wurde die Expression von EZH2 mittels siRNA herunterreguliert. Nach Knockdown von EZH2 wiesen die beiden untersuchten Melanomzelllinien eine gesteigerte CDKN2B-Expression im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 25A). Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass EZH2 die Transkription von CDKN2B reguliert und darüber die Zellproliferation im malignen Melanom stimuliert. Allerdings ist der Grad der Reexpression sehr unterschiedlich ausgeprägt. Während die Expression von CDKN2B bei der Melanomzelllinie ChaMel-105 um das Zwölfwache gegenüber der Kontrolle erhöht ist, weist Sk-Mel-28 nur eine um 1,7-fach gesteigerte Expression auf (Abbildung 25A).

Im Pankreaskarzinom hat die Depletion von EZH2 eine verminderte Zellproliferation sowie die Reexpression des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p27 zur Folge (Ougolkov et al., 2008). Dies deutet darauf hin, dass EZH2 durch die Repression des p27-Genes die Zellproliferation im Pankreaskarzinom fördert. Beim Darmkrebs hat EZH2 ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation. Immunhistochemische Analysen zeigten, dass Darmkrebszellen zudem eine signifikant verminderte nukleare p27-Expression aufweisen. Allerdings konnte keine inverse Korrelation der EZH2-Expression mit der p27-Expression nachgewiesen werden. Auch hatte die siRNA-vermittelte Depletion von EZH2 im Gegensatz zum Pankreaskarzinom nicht die Reexpression von p27 in den untersuchten Darmkrebszelllinien HCT116, LoVo und DLD zur Folge (Fussbroich et al., 2011). Es scheint, als ob es keine allgemein gültigen molekularen Mechanismen zur Stimulation der Zellproliferation durch EZH2 gibt. Dies lässt sich auch damit erklären, dass EZH2 auf eine

Vielzahl von Genen reprimierend wirkt. Selbst innerhalb einer Tumorentität gibt es keine vergleichbaren Ergebnisse. Dies zeigte sich auch in den Ergebnissen der Transkriptomanalyse von Darmkrebszellen nach Knockdown von EZH2. Während in der Darmkrebszelllinie DLD1 2235 Gene signifikante Veränderungen in ihrer Expression aufwiesen, waren in LoVo lediglich 379 Gene signifikant verändert. Zudem bestand nur eine Überlappung bei 139 Genen, die in beiden Darmkrebszelllinien durch den EZH2-Knockdown beeinflusst wurden. Von diesen 139 Genen wurden fünf krebsassoziierte Gene (Dag1, MageD1, SDC2, Timp2 und Tob1) mittels quantitativer real-time PCR weiter validiert und die Ergebnisse der Transkriptomanalyse für diese fünf Gene bestätigt. Alle fünf validierten Gene besitzen antiproliferatives und/oder antiinvasives Potential, so dass deren verminderte Expression mit einem möglichen onkogenen Effekt von EZH2 im Darmkrebs einhergeht (Fussbroich et al., 2011).

#### **4.3.2 Migration und Invasion**

Weitere experimentelle Untersuchungen unterstützen die Vermutung, dass EZH2 ein onkogenes Potential aufweist. Kleer et. al. untersuchten den Einfluss der Überexpression von EZH2 auf das ankerunabhängige Wachstum der immortalisierten Brustepithelzelllinie H16N2. Hierfür wurden die Zellen mit einem EZH2-exprimierendem Virus infiziert und anschließend die Koloniebildung im Softagar untersucht. Nur die mit EZH2 infizierten Zellen bildeten Kolonien im Softagar (Kleer et al., 2003). Cao et. al. untersuchten den Einfluss der Überexpression von EZH2 auf die Invasionsfähigkeit verschiedener, nichtinvasiver Prostata- und Brustepithelzellen. Dazu wurde ein modifizierter Boydenkammerversuch nach ektopischer Überexpression von EZH2 in den entsprechenden Zellen durchgeführt. Die Epithelzellen zeigten ausschließlich nach ektopischer Überexpression von EZH2 einen invasiven Phänotyp. Dagegen konnte die Überexpression einer verkürzten Version des EZH2, bei der die C-terminale SET-Domäne und damit die Methyltransferaseaktivität fehlten, keine Invasion induzieren. Weiterhin wurde die Expression von EZH2 in der stark invasiven Prostatazelllinie DU145 mittels siRNA transient bzw. mittels shRNA stabil reduziert. Das invasive Potential der Prostatazelllinie DU145 wurde nach Knockdown von EZH2 stark abgeschwächt (Cao et al., 2008).

Diese Ergebnisse wurden durch vergleichbare Experimente von Shin et. al. bestätigt. Sie zeigten, dass hohe EZH2-Expressionslevel mit einem invasiven Phänotyp der Prostatakrebszellen einhergehen. Dazu untersuchten sie zunächst mittels Western Blot die EZH2-Expressionslevel verschiedener humaner Prostatazelllinien. Sie wiesen nach, dass die EZH2-Expressionslevel in den Prostatakrebszelllinien LNCaP, PC3 und DU145 signifikant erhöht sind im Vergleich zur gutartigen humanen Prostataepithelzelllinie RWPE-1.

Anschließend wurde die invasive Aktivität der Prostatakrebszelllinien, die unterschiedliche EZH2-Level exprimierten, im Boydenkammerversuch bestimmt. Dabei korreliert die invasive Aktivität der untersuchten Zellen mit der EZH2-Expression. Dieses Ergebnis wurde durch Knockdown-Experimente bestätigt. Der Knockdown von EZH2 reduziert signifikant die Invasivität der Prostatakrebszelllinien. Umgekehrt führt die Überexpression von EZH2 in der gutartigen Prostataepithelzelllinie RWPE-1 zu einem invasivem Phänotyp. Weiterhin wurde das Migrationsverhalten der Prostatakrebszelllinien untersucht. Dazu wurde ein Migrationsassay nach Infektion der Zellen mit EZH2-spezifischer shRNA und Kontroll-shRNA durchgeführt. Der Knockdown der EZH2-Expression hat eine verringerte migratorische Aktivität der Zellen zur Folge. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass hohe EZH2-Expressionslevel die Invasion und Migration der Prostatakrebszellen fördern (Shin und Kim, 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte für das maligne Melanom ebenfalls gezeigt werden, dass die EZH2-Expression einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Melanomzellen hat. Durch die Transfektion der Melanomzelllinie Sk-Mel-28 mit EZH2-spezifischer siRNA wurde zunächst die EZH2-Expression vermindert. Im anschließenden Migrationsassay wurde gezeigt, dass nach Knockdown von EZH2 die migratorische Aktivität signifikant verringert ist (Abbildung 12). Umgekehrt weisen Melanomzellen mit höheren EZH2-Expressionsleveln eine gesteigerte migratorische Aktivität auf (Abbildung 18). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EZH2 auch im malignen Melanom ein onkogenes Potential aufweist sowie eine Rolle bei der Metastasierung spielen könnte.

Die initialen Schritte der Tumordinvasion sind durch den Verlust der Zell-Zell-Kontakte gekennzeichnet. Wiederum ist der invasive Phänotyp einer Tumorzelle oftmals durch eine verminderte Expression von E-Cadherin charakterisiert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die fehlende oder reduzierte Expression von E-Cadherin mit der Entwicklung von Metastasen, u.a. im Brustkrebs (Onder et al., 2008) und Magenkarzinom (Wu et al., 2005), einhergeht. E-Cadherin kann durch verschiedenste Mechanismen während der Tumorprogression herunterreguliert werden. Dazu zählen die Promotermethylierung (Takeno et al., 2004), die Mutation (Saito et al., 2004), die Ubiquitynylierung und die sich anschließende Degradierung (Fujita et al., 2002) von E-Cadherin.

Ein weiterer Mechanismus, durch den die Expression von E-Cadherin herunterreguliert werden kann, ist die transkriptionelle Regulation durch EZH2. Es konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin ein EZH2-Zielgen in verschiedenen Tumoren ist (Cao et al., 2008; Tong et al., 2012). In einer Studie von Fujii et. al. wurde gezeigt, dass in Magenkarzinomzellen die

Expression von EZH2 mit der von E-Cadherin invers korreliert. Der Knockdown von EZH2 mittels siRNA führte bei den Magenkarzinomzellen zu einer Reexpression von E-Cadherin.

Der Verlust der Expression von E-Cadherin wurde auch für das maligne Melanom beschrieben. Während E-Cadherin in kultivierten Melanozyten und Nävuszellen exprimiert ist, konnte nur noch eine geringe Expression in nichtinvasiven, nichtmetastasierenden Melanomzelllinien sowie keine Expression in invasiven, metastasierenden Melanomzellen nachgewiesen werden (Danan et al., 1996). Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen des Illumina Arrays dieser Arbeit wieder. Die Melanomzelllinien exprimieren kein E-Cadherin bzw. weisen eine im Verhältnis zu den Melanozyten stark reduzierte Expression von E-Cadherin auf (Abbildung 21). Dabei scheint jedoch die Expression von E-Cadherin nicht unter der transkriptionellen Regulation von EZH2 zu stehen, da die Expression von E-Cadherin unabhängig von der EZH2-Expression in allen untersuchten Melanomzelllinien stark reduziert ist und somit keine inverse Korrelation zwischen EZH2 und E-Cadherin besteht. Anders als beim Magenkarzinom scheint die Expression von E-Cadherin im malignen Melanom nicht durch EZH2 reguliert zu werden.

### 4.3.3 Metastasierung

Während der Tumorprogression durchdringen die Tumorzellen die extrazelluläre Matrix, die eine physikalische Barriere gegenüber der Invasion von Zellen bildet. Tumorzellen sind in der Lage diese Barriere mittels Enzymen abzubauen. Die prominentesten unter diesen Enzymen sind die Matrixmetalloproteinasen (Deryugina und Quigley, 2006). Die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen wird durch Mitglieder der TIMP-Familie TIMP1, 2, 3 und 4 gehemmt, indem die TIMP-Proteine an die katalytische Domäne der Matrixmetalloproteinasen binden (Bode et al., 1999). Das Verhältnis von Matrixmetalloproteinasen zu den TIMP-Proteinen ist daher ein kritischer Parameter für den Um- und Abbau der extrazellulären Matrix. Die Expression der TIMP-Proteine ist in einer Vielzahl von Tumoren, herunterreguliert, so dass hierdurch der Abbau der extrazellulären Matrix durch Matrixmetalloproteinasen begünstigt wird. Die Überexpression von TIMP2 bewirkt in der hochinvasiven Melanomzelllinie B16F10 eine Reduktion der Invasion und Angiogenese. Dazu wurde die Melanomzelllinie mit einem TIMP2 exprimierenden Vektor transfiziert. Die Zellklone wurden hinsichtlich der TIMP2-Überexpression und des Einflusses auf den Tumorzellphänotyp analysiert. Die Menge des rekombinanten TIMP2 korrelierte dabei mit der Reduktion der Invasion. Weiterhin zeigten die TIMP2-transfizierten Klone eine verminderte Ausbildung von Blutgefäßen. Nach subkutaner Injektion in Mäuse hatte die Überexpression von TIMP2 zur Folge, dass das Tumorwachstum und die Neoangiogenese *in vivo* begrenzt waren (Valente et al., 1998).

In Prostatakrebszellen spielt EZH2 eine aktive Rolle in der Regulation der Expression von TIMP3 sowie der Aktivität der Matrixmetalloproteinasen. Shin et. al. analysierten Genexpressionsprofile invasiver Prostatakrebszellen nach Knockdown von EZH2, um metastasierungsassoziierte Gene, deren Expression durch EZH2 reguliert werden, zu analysieren. Dabei identifizierten sie TIMP3 als das Gen, dass die höchste Steigerung der Expression nach Knockdown von EZH2 erfuhr. In weiteren Experimenten wurde bestätigt, dass die TIMP3 mRNA-Expressionslevel um das 10- bis 13-fache nach Transfektion mit EZH2-spezifischer shRNA stiegen im Vergleich zur Kontroll-shRNA. Auch auf Proteinebene erhöhten sich die TIMP3 Proteinlevel signifikant nach Knockdown von EZH2. Umgekehrt hatte die Überexpression von EZH2 in der benignen Prostatazelllinie RWPE-1 wiederum die Reduktion der TIMP3 mRNA- und Proteinlevel zur Folge. Die Repression der TIMP3-Expression durch EZH2 resultiert in einer erhöhten invasiven Aktivität der Prostatakrebszellen, denn die Prostatazelllinie RWPE-1 zeigte nach Überexpression von EZH2 einen invasiven Phänotyp im Vergleich zur Kontrolle. Bei gleichzeitiger Überexpression von EZH2 and TIMP3 in der Prostatazelllinie RWPE-1 wurde dieser invasive Phänotyp signifikant unterdrückt. Weiterhin hatte der Knockdown von EZH2 die Reduktion der proteolytischen Aktivität der Matrixmetalloproteinase MMP9 zur Folge, wodurch die Invasivität der Prostatakrebszellen verringert wird.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass auch im malignen Melanom die TIMP3-Expression invers mit der EZH2-Expression korreliert (Abbildung 23) und EZH2 die Expression von TIMP3 reguliert. Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchung der TIMP3-Expression nach Knockdown der EZH2-Expression bestätigt. Beide untersuchten Melanomzelllinien weisen nach Knockdown der EZH2-Expression eine erhöhte TIMP3-Expression auf (Abbildung 25B). Wie zuvor schon für CDKN2B diskutiert, ist der Grad der Repression von TIMP3 durch EZH2 in beiden Melanomzelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt, wenn auch nicht so auffällig wie bei CDKN2B.

Für Prostatakrebs wurde bereits eine heterogene, epigenetische Regulation von TIMP3 von Shinojima et. al. beschrieben. Es wurden diverse Inhibitoren in verschiedenen Prostatakrebszelllinien eingesetzt, um den epigenetischen Mechanismus, der zur Repression von TIMP3 führt, zu identifizieren. Dabei wurde festgestellt, dass die epigenetische Regulation der Genaktivität von TIMP3 von der Zelllinie abhängig ist. Während bereits die Behandlung mit dem DNA-Methyltransferaseinhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin bei der Prostatakrebszelllinie DU145 die Genaktivität von TIMP3 reaktivierte, bewirkte nur die Kombination des Histondeacetylaseinhibitors Trichostatin A (TSA) und des Histonmethyltransferaseinhibitors 3-Deazaneplanocin A (DZNep) bei den Prostatakrebszelllinien LNCaP und PC3 eine Reaktivierung der TIMP3-Expression (Shinojima et al., 2012). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass abhängig von der

Tumorzelle spezifische Gene durch alternative epigenetische Mechanismen reguliert werden können. Entweder die Promoter-DNA-Methylierung oder die Histonmethylierung und -acetylierung, aber auch die Kombination beider Mechanismen kommen bei der epigenetischen Regulation der Genexpression von TIMP3 zum Tragen. Dies könnte auch die unterschiedlich ausgeprägten Reexpressionsraten von CDKN2B und TIMP3 in der vorliegenden Arbeit für das maligne Melanom erklären.

#### 4.3.4 Angiogenese

Ein weiterer für die Tumorprogression des malignen Melanoms entscheidender Vorgang ist die Angiogenese. Hierbei werden Blutgefäße ausgebildet, die den schnell wachsenden Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen können. Auch die Metastasierung des Tumors steht in Wechselwirkung mit der Tumorangiogenese (Folkman, 2006). Erstmals wurde im Jahr 1966 das Wachstum von Blutgefäßen für das maligne Melanom beschrieben (Warren und Shubik, 1966). Die Ergebnisse dieser Studie wurden zehn Jahre später von Hubler und Wolf bestätigt (Hubler und Wolf, 1976).

Die Angiogenese wird durch pro- und antiangiogene Faktoren reguliert. VASH1 ist ein antiangiogener Faktor, der dafür bekannt ist, die tumorassoziierte Angiogenese zu inhibieren. Im Mausmodell mit VASH1-überexprimierenden Melanomzellen ist die Bildung großer Blutgefäße und vaskulärer Flächen gehemmt (Kern et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine inverse Korrelation von VASH1 und EZH2 in den hier untersuchten Melanomzelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 24). Zudem steigen die VASH1-Expressionslevel in Folge des EZH2-Knockdowns in den Melanomzelllinien Sk-Mel-28 und ChaMel-105 an (Abbildung 25C). Dies deutet daraufhin, dass VASH1 unter der transkriptionellen Regulation von EZH2 steht und möglicherweise darüber die Angiogenese im malignen Melanom gesteuert wird.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen im Ovariakarzinom. Hierbei wurde EZH2 als Schlüsselregulator der Tumorangiogenese identifiziert. Signifikant erhöhte EZH2-Expressionslevel wurden in zwei Drittel aller 180 untersuchten Ovariakarzinomgewebe nachgewiesen. Die siRNA-vermittelte Repression der EZH2-Expression resultierte in einer verminderten Angiogenese der Tumorendothelzellen *in vitro* und in einem reduzierten Tumorwachstum *in vivo*. Gleichzeitig gingen der Repression der EZH2-Expression und die damit verbundene verminderte Angiogenese mit einer Reaktivierung der VASH1-Expression einher. Mittels Chromatin-Immunpräzipitationsexperimenten konnte die direkte Bindung von EZH2 an den VASH1-Promoter nachgewiesen werden. Die Promoteraktivität stieg nach Repression der EZH2-

Expression zudem signifikant an. EZH2 inaktiviert den antiangiogenen Faktor VASH1 mittels Methylierung (Lu et al., 2010).

All dies deutet daraufhin, dass der anti-angiogene Faktor VASH1 ein Zielgen von EZH2 ist und die hohe EZH2-Expression zur Tumorangiogenese beiträgt. Weitere Experimente sind vonnöten, um EZH2 als Regulator der VASH1-Expression und der Tumorangiogenese im malignen Melanom zu validieren.

#### **4.4 EZH2 als therapeutisches Ziel**

Die Überexpression von EZH2 wurde sowohl für das maligne Melanom, als auch für eine Vielzahl weiterer Tumoren bestätigt. Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten zeigen, dass EZH2 an der Karzinogenese und Tumorprogression beteiligt ist, indem es als Onkogen fungiert. EZH2 stimuliert die Zellproliferation, blockiert die Apoptose, fördert die Zellinvasion und Metastasierung, aktiviert die Tumorangiogenese und induziert Tumore im Mausmodell (Lu et al.; Rao et al.; Varambally et al., 2002; Bracken et al., 2003; Kleer et al., 2003; Tan et al., 2007; Ougolkov et al., 2008; Wagener et al., 2008). EZH2 fungiert mittels seiner Methyltransferaseaktivität im Polycomb Repressive Complex 2 als transkriptioneller Repressor. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass die Inhibition von EZH2 eine Strategie für die Krebstherapie darstellen könnte.

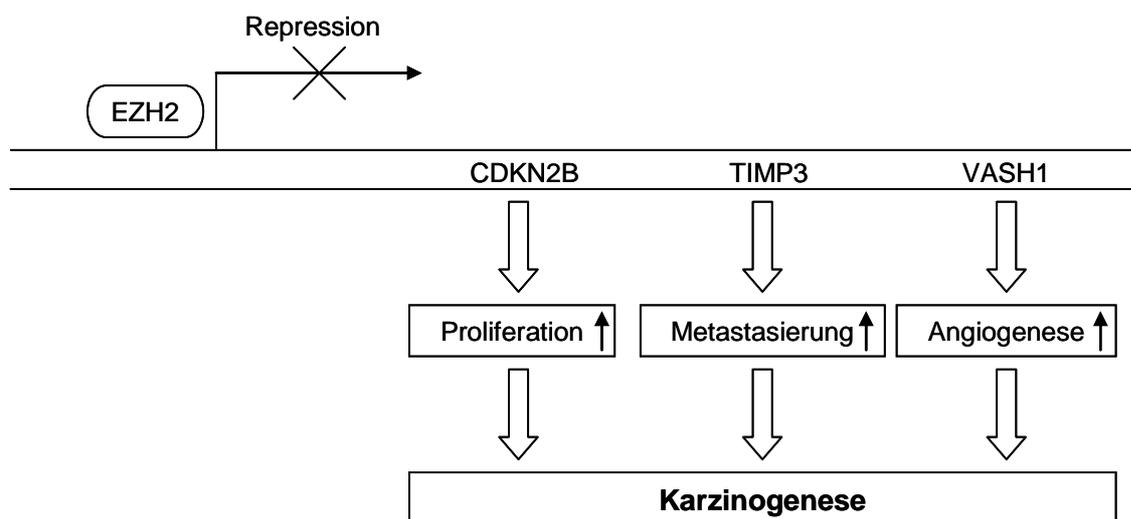
Das kleine Molekül 3-Deazaneplanocin A (DZNep), ein S-Adenosylhomocysteinhydrolaseinhibitor, inhibiert die Methylierung und induziert den Abbau von EZH2. Für das Glioblastom, Prostata- und Gebärmutterkrebs konnte gezeigt werden, dass DZNep die Bildung und das Wachstum von Tumoren reduziert (Chang et al., 2012). Allerdings ist DZNep kein EZH2-spezifischer Inhibitor, so dass es auch andere Methylierungsreaktionen beeinflusst. Der klinische Einsatz von DZNep ist mit Risiken verbunden, da der Einfluss auf eine Vielzahl physiologischer Prozesse, an denen Methylierungsreaktionen beteiligt sind, nicht vorhersehbar ist.

Erst kürzlich wurden selektive EZH2-Inhibitoren identifiziert (Helin et al., 2013). Dabei erscheinen GSK126 und EPZ-6438 als die potentesten S-Adenosyl-Methionin (SAM)-kompetitiven Inhibitoren der EZH2-Methyltransferaseaktivität. Das kleine Molekül GSK126 inhibiert die Proliferation von Zelllinien des diffusen, großzelligen B-Zell-Lymphoms mit einer EZH2-Mutation und das Wachstum der entsprechenden xenotransplantierten Zellen in Mäusen (McCabe et al., 2012). Dagegen hat sich EPZ-6438 beim Einsatz des Non-Hodgkin-Lymphoms bewährt. EPZ-6438 hat einen antiproliferativen Effekt auf Non-Hodgkin-Lymphomzelllinien, die ebenfalls eine onkogene Punktmutation im EZH2-Gen tragen. Die Genexpressionsprofilstudien bestätigen zudem eine Reexpression der bekannten PRC2-

Zielgene nach Behandlung mit EPZ-6438 (Knutson et. al., 2014). Im Juni 2013 hat die Firma Epizyme und deren Partner Eisai eine klinische Studie (Phase 1 / 2) für EPZ-6438 bei B-Zell-Lymphompatienten initiiert.

Diese Ergebnisse lassen durchaus den Schluß zu, dass die pharmakologische Inhibition der EZH2-Aktivität eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit darstellt, allerdings nur bei Auftreten entsprechender Punktmutationen des EZH2-Genes. Derartige EZH2-Mutationen wurden für das maligne Melanom bisher noch nicht identifiziert. Dies bedarf weiterer Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit konnte für das maligne Melanom eine Überexpression von EZH2 im Vergleich zu Melanozyten mittels Western Blot bestätigt werden. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Hemmung der EZH2-Expression zu einer verringerten Proliferation und Migration im malignen Melanom führt. Eine gesteigerte EZH2-Expression erhöht zudem die migratorische Aktivität der Melanomzellen. Weiterhin deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass CDKN2B, TIMP3 sowie VASH1 unter der transkriptionellen Regulation von EZH2 im malignen Melanom stehen. In Abbildung 26 ist modellhaft dieser Einfluss von EZH2 als potentielles Onkogen auf die Proliferation, Metastasierung und Angiogenese dargestellt (Abbildung 26). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bilden die Grundlage weiterer Analysen, um EZH2 als Onkogen zu bestätigen.



**Abbildung 26: Modellhafte Darstellung von EZH2 als potentielles Onkogen**

Die Repression von CDKN2B, TIMP3 und VASH1 treibt Prozesse wie die Proliferation, Metastasierung und Angiogenese und damit die Karzinogenese voran.

## Literaturverzeichnis

- Asangani, I. A., Harms, P. W., Dodson, L., Pandhi, M., Kunju, L. P., Maher, C. A., et al. (2012). Genetic and epigenetic loss of microRNA-31 leads to feed-forward expression of EZH2 in melanoma. *Oncotarget* **3**(9): 1011-25.
- Autier, P. and Dore, J. F. (1998). Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Int J Cancer* **77**(4): 533-7.
- Bachmann, I. M., Halvorsen, O. J., Collett, K., Stefansson, I. M., Straume, O., Haukaas, S. A., et al. (2006). EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *Journal of Clinical Oncology* **24**(2): 268-273.
- Balch, C. M., Buzaid, A. C., Soong, S. J., Atkins, M. B., Cascinelli, N., Coit, D. G., et al. (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **19**(16): 3635-48.
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., et al. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* **27**(36): 6199-206.
- Barnhill, R. L. and Mihm, M. C., Jr. (1993). The histopathology of cutaneous malignant melanoma. *Semin Diagn Pathol* **10**(1): 47-75.
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Grams, F., Gomis-Ruth, F. X., Nagase, H., Tschesche, H., et al. (1999). Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci* **878**: 73-91.
- Bohm, M., Moellmann, G., Cheng, E., Alvarezfranco, M., Wagner, S., Sassonecorsi, P., et al. (1995). Identification of P90(Rsk) as the Probable Creb-Ser(133) Kinase in Human Melanocytes. *Cell Growth & Differentiation* **6**(3): 291-302.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J. Z., Ibrahim, P. N., Cho, H. N., et al. (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* **467**(7315): 596-599.
- Boyer, L. A., Latek, R. R. and Peterson, C. L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**(2): 158-163.
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., et al. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**(7091): 349-353.
- Bracken, A. P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K. H. and Helin, K. (2006). Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* **20**(9): 1123-36.
- Bracken, A. P. and Helin, K. (2009). Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* **9**(11): 773-84.

- Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E. and Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J* **22**(20): 5323-35.
- Breslow, A. (1975). Tumor Thickness, Level of Invasion and Node Dissection in Stage-1 Cutaneous Melanoma. *Ann Surg* **182**(5): 572-575.
- Bryant, R. J., Winder, S. J., Cross, S. S., Hamdy, F. C. and Cunliffe, V. T. (2008). The polycomb group protein EZH2 regulates actin polymerization in human prostate cancer cells. *Prostate* **68**(3): 255-263.
- Burdach, S., Plehm, S., Unland, R., Dirksen, U., Borkhardt, A., Staeger, M. S., et al. (2009). Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle* **8**(13): 1991-6.
- Cao, Q., Yu, J., Dhanasekaran, S. M., Kim, J. H., Mani, R. S., Tomlins, S. A., et al. (2008). Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene* **27**(58): 7274-84.
- Cao, R., Wang, L. J., Wang, H. B., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et al. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science* **298**(5595): 1039-1043.
- Cao, R. and Zhang, Y. (2004). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* **15**(1): 57-67.
- Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G. E. and Sartorelli, V. (2005). The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation (vol 18, pg 2627, 2004). *Genes & Development* **19**(6): 768-768.
- Cha, T. L., Zhou, B. P., Xia, W., Wu, Y., Yang, C. C., Chen, C. T., et al. (2005). Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science* **310**(5746): 306-10.
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., et al. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* **364**(26): 2507-16.
- Cho, Y. R. and Chiang, M. P. (2010). Epidemiology, Staging (New System), and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Clinics in Plastic Surgery* **37**(1): 47-+.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., et al. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**(5942): 834-40.
- Choy, M. K., Movassagh, M., Goh, H. G., Bennett, M. R., Down, T. A. and Foo, R. S. Y. (2010). Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated. *BMC Genomics* **11**.
- Clark, W. H., Elder, D. E. and Vanhorn, M. (1986). The Biologic Forms of Malignant-Melanoma. *Hum Pathol* **17**(5): 443-450.

- Clark, W. H., Jr., From, L., Bernardino, E. A. and Mihm, M. C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* **29**(3): 705-27.
- Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J. H., Shoji, M., Sexton, D. G., Cotsonis, G., et al. (2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* **8**(12): 3728-33.
- Collett, K., Eide, G. E., Arnes, J., Stefansson, I. M., Eide, J., Braaten, A., et al. (2006). Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clinical Cancer Research* **12**(4): 1168-1174.
- Crea, F., Hurt, E. M. and Farrar, W. L. (2010). Clinical significance of Polycomb gene expression in brain tumors. *Mol Cancer* **9**.
- Danen, E. H., de Vries, T. J., Morandini, R., Ghanem, G. G., Ruiter, D. J. and van Muijen, G. N. (1996). E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Research* **6**(2): 127-31.
- Danen, E. H. J., deVries, T. J., Morandini, R., Ghanem, G. G., Ruiter, D. J. and vanMuijen, G. N. P. (1996). E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Research* **6**(2): 127-131.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**(6892): 949-54.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**(6892): 949-954.
- De Haan, G. and Gerrits, A. (2007). Epigenetic control of hematopoietic stem cell aging the case of Ezh2. *Ann N Y Acad Sci* **1106**: 233-9.
- Deryugina, E. I. and Quigley, J. P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **25**(1): 9-34.
- Dhomen, N. and Marais, R. (2007). New insight into BRAF mutations in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* **17**(1): 31-39.
- Di Croce, L. and Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**(10): 1147-1155.
- Dupin, E. and Le Douarin, N. M. (2003). Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene* **22**(20): 3016-23.
- Esteller, M. (2005). Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 629-56.
- Feinberg, A. P. and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**(2): 143-53.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**(5895): 89-92.

- Flaherty, K. T., Puzanov, I., Kim, K. B., Ribas, A., McArthur, G. A., Sosman, J. A., et al. (2010). Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* **363**(9): 809-819.
- Friedman, J. M., Liang, G. N., Liu, C. C., Wolff, E. M., Tsai, Y. C., Ye, W., et al. (2009). The Putative Tumor Suppressor microRNA-101 Modulates the Cancer Epigenome by Repressing the Polycomb Group Protein EZH2. *Cancer Res* **69**(6): 2623-2629.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., et al. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* **4**(3): 222-31.
- Fussbroich, B., Wagener, N., Macher-Goeppinger, S., Benner, A., Falth, M., Sultmann, H., et al. (2011). EZH2 depletion blocks the proliferation of colon cancer cells. *PLoS One* **6**(7): e21651.
- Garbe, C., Eigentler, T. K., Keilholz, U., Hauschild, A. and Kirkwood, J. M. (2011). Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist* **16**(1): 5-24.
- Garbe, C., Hauschild, A., Volkenandt, M., Schadendorf, D., Stolz, W., Kortmann, RD., et al. (2006). Brief guidelines: malignant melanoma of the skin. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* **4**(4): 344-9.
- Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., et al. (2010). Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *European Journal of Cancer* **46**(2): 270-283.
- Garibyan, L. and Fisher, D. E. (2010). How Sunlight Causes Melanoma. *Current Oncology Reports* **12**(5): 319-326.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**(7130): 851-7.
- Grunstein, M., Hecht, A., Fisher-Adams, G., Wan, J., Mann, R. K., Strahl-Bolsinger, S., et al. (1995). The regulation of euchromatin and heterochromatin by histones in yeast. *J Cell Sci Suppl* **19**: 29-36.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hoffmann, M. J., Engers, R., Florl, A. R., Otte, A. P., Muller, M. and Schulz, W. A. (2007). Expression changes in EZH2, but not in BMI-1, SIRT1, DNMT1 or DNMT3B, are associated with DNA methylation changes in prostate cancer. *Cancer Biol Ther* **6**(9): 1403-1412.
- Hou, P., Liu, D., Dong, J. and Xing, M. (2012). The BRAF(V600E) causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. *Cell Cycle* **11**(2): 286-95.
- Hubler, W. R., Jr. and Wolf, J. E., Jr. (1976). Melanoma. Tumor angiogenesis and human neoplasia. *Cancer* **38**(1): 187-92.

- Isasi, A. G., Zapirain, B. G. and Zorrilla, A. M. (2011). Melanomas non-invasive diagnosis application based on the ABCD rule and pattern recognition image processing algorithms. *Computers in Biology and Medicine* **41**(9): 742-755.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R. and Reuter, G. (1998). SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**(1): 80-93.
- Ji, H. B., Wang, Z. X., Perera, S. A., Li, D. A., Liang, M. C., Zaghlul, S., et al. (2007). Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models. *Cancer Res* **67**(10): 4933-4939.
- Johannessen, C. M., Boehm, J. S., Kim, S. Y., Thomas, S. R., Wardwell, L., Johnson, L. A., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* **468**(7326): 968-U370.
- Jones, P. A. and Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* **128**(4): 683-92.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., et al. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* **19**(2): 187-191.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., N., Baras and B., Barnes (2012). Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2007/2008, *Robert-Koch-Institut*.
- Karanikolas, B. D., Figueiredo, M. L. and Wu, L. (2010). Comprehensive evaluation of the role of EZH2 in the growth, invasion, and aggression of a panel of prostate cancer cell lines. *Prostate* **70**(6): 675-88.
- Kern, J., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E. and Untergasser, G. (2009). Vasohibin inhibits angiogenic sprouting in vitro and supports vascular maturation processes in vivo. *BMC Cancer* **9**: 284.
- Ketel, C. S., Andersen, E. F., Vargas, M. L., Su, J., Strome, S. and Simon, J. A. (2005). Subunit contributions to histone methyltransferase, activities of fly and worm Polycomb group complexes. *Molecular and Cellular Biology* **25**(16): 6857-6868.
- Kim, H., Kang, K. and Kim, J. (2009). AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Res* **37**(9): 2940-2950.
- Kirmizis, A., Bartley, S. M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., et al. (2004). Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev* **18**(13): 1592-605.
- Kleer, C. G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S. A., et al. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11606-11.
- Kooistra, S. M. and Helin, K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(5): 297-311.

- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* **16**(22): 2893-905.
- Landeira, D., Sauer, S., Poot, R., Dvorkina, M., Mazzarella, L., Jorgensen, H. F., et al. (2010). Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators. *Nature Cell Biology* **12**(6): 618-U214.
- Lazovich, D., Vogel, R. I., Berwick, M., Weinstock, M. A., Anderson, K. E. and Warshaw, E. M. (2010). Indoor tanning and risk of melanoma: a case-control study in a highly exposed population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(6): 1557-68.
- LeBoit P.E., Burg G., Weedon D, Sarasain A. (Eds.): (2006). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon.
- Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., et al. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**(2): 301-13.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. and 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.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* **276**(5688): 565-70.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lu, C. H., Han, H. D., Mangala, L. S., Ali-Fehmi, R., Newton, C. S., Ozbun, L., et al. (2010). Regulation of Tumor Angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell* **18**(2): 185-197.
- Lu, C., Han, H. D., Mangala, L. S., Ali-Fehmi, R., Newton, C. S., Ozbun, L., et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell* **18**(2): 185-97.
- Lu, J. A., He, M. L., Wang, L., Chen, Y., Liu, X. O., Dong, Q., et al. (2011). MiR-26a Inhibits Cell Growth and Tumorigenesis of Nasopharyngeal Carcinoma through Repression of EZH2. *Cancer Res* **71**(1): 225-233.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**(7043): 834-838.
- Luo, C., Tetteh, P. W., Merz, P. R., Dickes, E., Abukiwan, A., Hotz-Wagenblatt, A., et al. (2012). miR-137 Inhibits the Invasion of Melanoma Cells through Downregulation of Multiple Oncogenic Target Genes. *J Invest Dermatol*.
- Lv, Y. J., Yuan, C. Z., Xiao, X. Y., Wang, X. P., Ji, X. M., Yu, H. Y., et al. (2012). The expression and significance of the enhancer of zeste homolog 2 in lung adenocarcinoma. *Oncology Reports* **28**(1): 147-154.
- Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M. L., Son, J., Drury, W. J., 3rd, et al. (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* **461**(7265): 762-7.

- McHugh, J. B., Fullen, D. R., Ma, L., Kleer, C. G. and Su, L. D. (2007). Expression of polycomb group protein EZH2 in nevi and melanoma. *J Cutan Pathol* **34**(8): 597-600.
- Merkel, S., Meyer, T., Papadopoulos, T., Schuler, G., Gohl, J., Hohenberger, W., et al. (2002). Testing a new staging system for cutaneous melanoma proposed by the American Joint Committee on Cancer. *Eur J Cancer* **38**(4): 517-26.
- Middleton, M. R., Grob, J. J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., et al. (2000). Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* **18**(1): 158-66.
- Mimori, K., Ogawa, K., Okamoto, M., Sudo, T., Inoue, H. and Mori, M. (2005). Clinical significance of enhancer of zeste homolog 2 expression in colorectal cancer cases. *Ejso* **31**(4): 376-380.
- Min, J., Zaslavsky, A., Fedele, G., McLaughlin, S. K., Reczek, E. E., De Raedt, T., et al. An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB. *Nat Med* **16**(3): 286-94.
- Morey, L. and Helin, K. (2010). Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends in Biochemical Sciences* **35**(6): 323-332.
- Nan, X. S., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., et al. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**(6683): 386-389.
- Nazarian, R., Shi, H. B., Wang, Q., Kong, X. J., Koya, R. C., Lee, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* **468**(7326): 973-U377.
- Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Kocher, T., et al. (2007). Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *Embo Journal* **26**(18): 4078-4088.
- O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S. C., Surani, M. A. and Jenuwein, T. (2001). The Polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Molecular and Cellular Biology* **21**(13): 4330-4336.
- Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T., et al. (1993). Expression of E-Cadherin Cell-Adhesion Molecules in Human Breast-Cancer Tissues and Its Relationship to Metastasis. *Cancer Res* **53**(7): 1696-1701.
- Omholt, K., Krockel, D., Ringborg, U. and Hansson, J. (2006). Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Research* **16**(2): 197-200.
- Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S. and Weinberg, R. A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* **68**(10): 3645-54.

- Ougolkov, A. V., Bilim, V. N. and Billadeau, D. D. (2008). Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res* **14**(21): 6790-6.
- Pasini, D., Bracken, A. P., Jensen, M. R., Denchi, E. L. and Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *Embo Journal* **23**(20): 4061-4071.
- Pasini, D., Cloos, P. A., Walfridsson, J., Olsson, L., Bukowski, J. P., Johansen, J. V., et al. JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* **464**(7286): 306-10.
- Passarge, E. (1979). Heitz, Emil and the Concept of Heterochromatin - Longitudinal Chromosome Differentiation Was Recognized 50 Years Ago. *American Journal of Human Genetics* **31**(2): 106-115.
- Patel, P. M., Suci, S., Mortier, L., Kruit, W. H., Robert, C., Schadendorf, D., et al. (2011). Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). *Eur J Cancer* **47**(10): 1476-83.
- Payer, B. and Lee, J. T. (2008). X Chromosome Dosage Compensation: How Mammals Keep the Balance. *Annual Review of Genetics* **42**: 733-772.
- Peng, J. C., Valouev, A., Swigut, T., Zhang, J. M., Zhao, Y. M., Sidow, A., et al. (2009). Jarid2/Jumonji Coordinates Control of PRC2 Enzymatic Activity and Target Gene Occupancy in Pluripotent Cells. *Cell* **139**(7): 1290-1302.
- Peyssonnaud, C. and Eychene, A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* **93**(1-2): 53-62.
- Pflugfelder, A., Kochs, C., Blum, A., Capellaro, M., Czeschik, C., Dettenborn, T., et al. (2013). Malignant Melanoma S3-Guideline "Diagnosis, Therapy and Follow-up of Melanoma". *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **11**: 1-116.
- Pietersen, A. M., Horlings, H. M., Hauptmann, M., Langerod, A., Ajouaou, A., Cornelissen-Steijger, P., et al. (2008). EZH2 and BMI1 inversely correlate with prognosis and TP53 mutation in breast cancer. *Breast Cancer Res* **10**(6): R109.
- Pietersen, A. M. and van Lohuizen, M. (2008). Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. *Curr Opin Cell Biol* **20**(2): 201-7.
- Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., et al. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**(1): 19-20.
- Poulikakos, P. I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X. J., Ng, C., Moriceau, G., et al. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* **480**(7377): 387-U144.

- Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M. and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* **464**(7287): 427-U126.
- Poynter, J. N., Elder, J. T., Fullen, D. R., Nair, R. P., Soengas, M. S., Johnson, T. M., et al. (2006). BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Research* **16**(4): 267-273.
- Raaphorst, F. M., van Kemenade, F. J., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K. M., Satijn, D. P. E., et al. (2000). Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *American Journal of Pathology* **157**(3): 709-715.
- Rajasekhar, V. K. and Begemann, M. (2007). Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells* **25**(10): 2498-510.
- Rao, Z. Y., Cai, M. Y., Yang, G. F., He, L. R., Mai, S. J., Hua, W. F., et al. EZH2 supports ovarian carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of TGF-beta1 and is a predictor of outcome in ovarian carcinoma patients. *Carcinogenesis* **31**(9): 1576-83.
- Ringrose, L. and Paro, R. (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* **134**(2): 223-32.
- Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., et al. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by Noncoding RNAs. *Cell* **129**(7): 1311-1323.
- Romano, E., Pradervand, S., Paillusson, A., Weber, J., Harshman, K., Muehlethaler, K., et al. (2013). Identification of Multiple Mechanisms of Resistance to Vemurafenib in a Patient with BRAF(V600E)-Mutated Cutaneous Melanoma Successfully Rechallenged after Progression. *Clinical Cancer Research* **19**(20): 5749-5757.
- Rudin, C. M., Hong, K. and Streit, M. (2013). Molecular Characterization of Acquired Resistance to the BRAF Inhibitor Dabrafenib in a Patient with BRAF-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* **8**(5): E41-E42.
- Saito, T., Oda, Y., Kawaguchi, K., Sugimachi, K., Yamamoto, H., Tateishi, N., et al. (2004). E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* **23**(53): 8629-38.
- Sala, E., Mologni, L., Truffa, S., Gaetano, C., Bollag, G. E. and Gambacorti-Passerini, C. (2008). BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Molecular Cancer Research* **6**(5): 751-759.
- Saramaki, O. R., Tammela, T. L. J., Martikainen, P. M., Vessella, R. L. and Visakorpi, T. (2006). The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* **45**(7): 639-645.
- Sarma, K., Margueron, R., Ivanov, A., Pirrotta, V. and Reinberg, D. (2008). Ezh2 requires PHF1 to efficiently catalyze h3 lysine 27 trimethylation in vivo. *Molecular and Cellular Biology* **28**(8): 2718-2731.

- Satyamoorthy, K., Li, G., Gerrero, M. R., Brose, M. S., Volpe, P., Weber, B. L., et al. (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res* **63**(4): 756-9.
- Sauvageau, M. and Sauvageau, G. (2010). Polycomb Group Proteins: Multi-Faceted Regulators of Somatic Stem Cells and Cancer. *Cell Stem Cell* **7**(3): 299-313.
- Savla, U., Benes, J., Zhang, J. and Jones, R. S. (2008). Recruitment of Drosophila Polycomb-group proteins by Polycomblike, a component of a novel protein complex in larvae. *Development* **135**(5): 813-817.
- Schipper, J. H., Frixen, U. H., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K. and Birchmeier, W. (1991). E-Cadherin Expression in Squamous-Cell Carcinomas of Head and Neck - Inverse Correlation with Tumor Dedifferentiation and Lymph-Node Metastasis. *Cancer Res* **51**(23): 6328-6337.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* **128**(4): 735-745.
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**(7209): 58-63.
- Sha, K. (2008). A mechanistic view of genomic imprinting. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **9**: 197-216.
- Sharma, A., Trivedi, N. R., Zimmerman, M. A., Tuveson, D. A., Smith, C. D. and Robertson, G. P. (2005). Mutant B-V599E-RAF regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* **65**(6): 2412-2421.
- Shen, X., Kim, W., Fujiwara, Y., Simon, M. D., Liu, Y., Mysliwiec, M. R., et al. (2009). Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell* **139**(7): 1303-14.
- Shih, A. H., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P. and Levine, R. L. (2012). The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nature Reviews Cancer* **12**(9): 599-612.
- Shin, Y. J. and Kim, J. H. (2012). The Role of EZH2 in the Regulation of the Activity of Matrix Metalloproteinases in Prostate Cancer Cells. *PLoS One* **7**(1).
- Shinojima, T., Yu, Q., Huang, S. K., Li, M., Mizuno, R., Liu, E. T., et al. (2012). Heterogeneous epigenetic regulation of TIMP3 in prostate cancer. *Epigenetics* **7**(11): 1279-89.
- Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **62**(1): 10-29.
- Smits, A. H., Jansen, P. W., Poser, I., Hyman, A. A. and Vermeulen, M. (2013). Stoichiometry of chromatin-associated protein complexes revealed by label-free quantitative mass spectrometry-based proteomics. *Nucleic Acids Res* **41**(1): e28.

- Sosman, J. A., Kim, K. B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A. C., Weber, J. S., et al. (2012). Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *New England Journal of Medicine* **366**(8): 707-714.
- Sparmann, A. and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**(11): 846-56.
- Squazzo, S. L., O'Geen, H., Komashko, V. M., Krig, S. R., Jin, V. X., Jang, S. W., et al. (2006). Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res* **16**(7): 890-900.
- Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J. Q., Bosenberg, M. W., et al. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* **64**(19): 7002-10.
- Sudo, T., Utsunomiya, T., Mimori, K., Nagahara, H., Ogawa, K., Inoue, H., et al. (2005). Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* **92**(9): 1754-1758.
- Takeo, S., Noguchi, T., Fumoto, S., Kimura, Y., Shibata, T. and Kawahara, K. (2004). E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, Snail overexpression, and clinicopathologic implications. *Am J Clin Pathol* **122**(1): 78-84.
- Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P. L., et al. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* **21**(9): 1050-63.
- Ting, A. H., McGarvey, K. M. and Baylin, S. B. (2006). The cancer epigenome - components and functional correlates. *Genes & Development* **20**(23): 3215-3231.
- Tong, Z. T., Cai, M. Y., Wang, X. G., Kong, L. L., Mai, S. J., Liu, Y. H., et al. (2012). EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. *Oncogene* **31**(5): 583-94.
- Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F. M., Oosterhof, G. O. N., et al. (1994). Decreased E-Cadherin Expression Is Associated with Poor-Prognosis in Patients with Prostate-Cancer. *Cancer Res* **54**(14): 3929-3933.
- Valente, P., Fassina, G., Melchiori, A., Masiello, L., Cilli, M., Vacca, A., et al. (1998). TIMP-2 overexpression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* **75**(2): 246-53.
- van Kemenade, F. J., Raaphorst, F. M., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K. M., Satiijn, D. P. E., et al. (2001). Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **97**(12): 3896-3901.
- Varambally, S., Cao, Q., Mani, R. S., Shankar, S., Wang, X. S., Ateeq, B., et al. (2008). Genomic Loss of microRNA-101 Leads to Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2 in Cancer. *Science* **322**(5908): 1695-1699.

- Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**(6907): 624-9.
- Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., et al. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**(7078): 871-4.
- Visser, H. P. J., Gunster, M. J., Kluijn-Nelemans, H. C., Manders, E. M. M., Raaphorst, F. M., Meijer, C. J. L. M., et al. (2001). The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *British Journal of Haematology* **112**(4): 950-958.
- Wagener, N., Holland, D., Bulkescher, J., Crnkovic-Mertens, I., Hoppe-Seyler, K., Zentgraf, H., et al. (2008). The enhancer of zeste homolog 2 gene contributes to cell proliferation and apoptosis resistance in renal cell carcinoma cells. *Int J Cancer* **123**(7): 1545-50.
- Walker, E., Chang, W. Y., Hunkapiller, J., Cagney, G., Garcha, K., Torchia, J., et al. (2010). Polycomb-like 2 Associates with PRC2 and Regulates Transcriptional Networks during Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* **6**(2): 153-166.
- Wang, C. G., Ye, Y. J., Yuan, J., Liu, F. F., Zhang, H. and Wang, S. (2010). EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *World Journal of Gastroenterology* **16**(19): 2421-2427.
- Wang, H. B., Wang, L. J., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., et al. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in polycomb silencing. *Nature* **431**(7010): 873-878.
- Wang, H. J., Ruan, H. J., He, X. J., Ma, Y. Y., Jiang, X. T., Xia, Y. J., et al. (2010). MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *European Journal of Cancer* **46**(12): 2295-2303.
- Warren, B. A. and Shubik, P. (1966). The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest* **15**(2): 464-78.
- Weinhold, B. (2006). Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect* **114**(3): A160-7.
- Whiteman, D. C., Whiteman, C. A. and Green, A. C. (2001). Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* **12**(1): 69-82.
- Woo, C. J., Kharchenko, P. V., Daheron, L., Park, P. J. and Kingston, R. E. (2010). A Region of the Human HOXD Cluster that Confers Polycomb-Group Responsiveness. *Cell* **140**(1): 99-110.
- Wu, H. A. and Bernstein, E. (2008). Partners in Imprinting: Noncoding RNA and Polycomb Group Proteins. *Developmental Cell* **15**(5): 637-638.
- Wu, H., Goel, V. and Haluska, F. G. (2003). PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**(20): 3113-22.
- Wu, L. G., Fan, J. H. and Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(11): 4034-4039.

- Wu, Z. Y., Zhan, W. H., Li, J. H., He, Y. L., Wang, J. P., Lan, P., et al. (2005). Expression of E-cadherin in gastric carcinoma and its correlation with lymph node micrometastasis. *World J Gastroenterol* **11**(20): 3139-43.
- Wu, Z. Y., Zhan, W. H., Li, J. H., He, Y. L., Wang, J. P., Lan, P., et al. (2005). Expression of E-cadherin in gastric carcinoma and its correlation with lymph node micrometastasis. *World Journal of Gastroenterology* **11**(20): 3139-3143.
- Wutz, A. (2007). Xist function: bridging chromatin and stem cells. *Trends in Genetics* **23**(9): 457-464.
- Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Bradley, W. D., Lee, R. J., et al. (2012). Antitumor Activity of BRAF Inhibitor Vemurafenib in Preclinical Models of BRAF-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Res* **72**(3): 779-789.
- Yi, R., Pasolli, H. A., Landthaler, M., Hafner, M., Ojo, T., Sheridan, R., et al. (2009). DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(2): 498-502.

**Abkürzungsverzeichnis**

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	akral-lentiginöses Melanom
APS	Ammoniumopersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	copyDNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA-Methyltransferase
DZNep	3-Deazaneplanocin A
EED	Embryonic Ectoderm Development
EZH2	Enhancer Zeste Homolog 2
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDAC	Histondeacetylase
HRP	Meerrettichperoxidase
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
miRNA	microRNA
MMP	Matrixmetalloproteinase
ncRNA	lange, nichtkodierende RNA
NM	noduläres Melanom
OD	optische Dichte
PcG	Polycombgruppe
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRC	Polycomb Repressive Complex
PRE	Polycomb Response Elemente
RbAp46/48	Retinoblastoma Associated Protein 46/48
siRNA	small interfering RNA
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
SUZ12	Suppressor of Zeste 12
TrxG	Thrithoraxgruppe
TSA	Trichostatin A
VASH1	Vasohibin1
YY1	Yin und Yang 1

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ABCDE-Regel _____	7
Abbildung 2: Das Epigenom im Überblick (modifiziert nach Baylin und Jones, 2011) _____	11
Abbildung 3: Veränderte DNA-Methylierung und deren Einfluss auf die Genexpression (modifiziert nach Esteller, 2007) _____	13
Abbildung 4: Lokalisation verschiedener, kovalenter Modifikationen der Histone H3, H4, H2A und H2B (modifiziert nach Allis et al., 2007) _____	14
Abbildung 5: Zusammensetzung der Polycomb-Multiproteinkomplexe PRC2 und PRC1 (modifiziert nach Margueron und Reinberg, 2011) _____	16
Abbildung 6: Charakterisierte Domänen und Interaktionsbereiche von EZH2 _____	17
Abbildung 7: Epigenetische Repression durch PRC2, PRC1 und DNMT (modifiziert nach Shih et al., 2012) _____	18
Abbildung 8: EZH2-Expression von Melanomzelllinien auf mRNA- und Proteinebene _____	47
Abbildung 9: Subzelluläre Lokalisation von EZH2 in Melanomzellen _____	49
Abbildung 10: siRNA-vermittelter Knockdown von EZH2 _____	50
Abbildung 11: Einfluss des EZH2-Knockdowns auf die Zellproliferation von Sk-Mel-28 _____	51
Abbildung 12: Einfluss des EZH2-Knockdowns auf die Migration von Sk-Mel-28 _____	52
Abbildung 13: Anteil YFP-positiver Zellen ohne und mit Doxyzyklin _____	54
Abbildung 14: Agarosegel nach PCR mit YFP/EZH2-Oligonukleotidprimern _____	55
Abbildung 15: Induzierbare Expression des Fusionsproteins YFP-EZH2 nach Doxyzyklinzugabe _____	56
Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisation von YFP-EZH2 nach Doxyzyklinzugabe _____	57
Abbildung 17: Einfluss der gesteigerten EZH2-Expression auf die Zellproliferation von Klon E9 _____	58
Abbildung 18: Einfluss der gesteigerten EZH2-Expression auf die Migration von Klon E9 _____	59
Abbildung 19: Vergleichsanalyse der EZH2 mRNA-Expressionsdaten des Illumina Arrays mit der quantitativen real-time PCR _____	61
Abbildung 20: Relative mRNA-Expression von EZH2 und CDKN2B _____	63
Abbildung 21: Relative mRNA-Expression von EZH2 und E-Cadherin _____	64
Abbildung 22: Relative mRNA-Expression von EZH2 und TIMP1 _____	65
Abbildung 23: Relative mRNA-Expression von EZH2 und TIMP3 _____	66
Abbildung 24: Relative mRNA-Expression von EZH2 und VASH1 _____	67
Abbildung 25: Relative mRNA-Expression von CDKN2B, TIMP3 und VASH1 nach siRNA vermitteltem Knockdown von EZH2 _____	69
Abbildung 26: Modellhafte Darstellung von EZH2 als potentielles Onkogen _____	81

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Clark	5
Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Breslow	6
Tabelle 3: Kommerzielle Reagenziensets	23
Tabelle 4: Geräte	23
Tabelle 5: Übersicht verwendeter Melanomzelllinien mit Patientendaten.	25
Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen	26
Tabelle 7: Übersicht verwendeter siRNA	26
Tabelle 8: Übersicht verwendeter Filtersets für Fluoreszenzmikroskopie	28
Tabelle 9: Enzyme	29
Tabelle 10: Übersicht verwendeter Oligonukleotidprimer	30
Tabelle 11: Übersicht verwendeter Oligonukleotidprimer für die Klonierung	30
Tabelle 12: Reaktionsansatz für reverse Transkription – Teil 1	31
Tabelle 13: Reaktionsansatz für reverse Transkription – Teil 2	32
Tabelle 14: Reaktionsansatz für Standard-PCR	32
Tabelle 15: Temperaturprogramm für Standard-PCR	33
Tabelle 16: Reaktionsansatz für Zwei-Schritt-PCR	33
Tabelle 17: Temperaturprogramm für Zwei-Schritt-PCR	34
Tabelle 18: Reaktionsansatz für real-time PCR	34
Tabelle 19: Temperaturprogramm für real-time PCR	35
Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR	36
Tabelle 21: Temperaturprogramm für die Kolonie-PCR	36
Tabelle 22: Reaktionsansatz für die Ligation	38
Tabelle 23: Primäre und sekundäre Antikörper für Western Blot	41
Tabelle 24: Zusammensetzung des Sammelgels (5ml)	43
Tabelle 25: Zusammensetzung des Trenngels (10ml)	43

## Publikationen

Regenbrecht CRA, Welte Y, **Hugel R**, Trefzer U, Losch FO, Adjaye J & Walden P (2008); Cancer stem cells in melanoma; *ecancermedicalscience*, Volume: 2 Article Number: 114 DOI: 10.3332/ecancer.2008.114

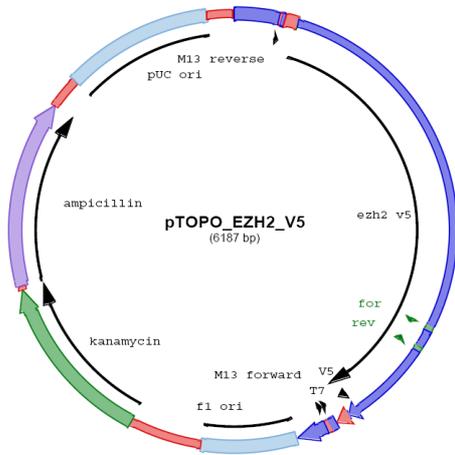
Regenbrecht CRA, Welte Y, Jödicke A, **Hugel R**, Walden P, Jung M, Lehrach H & Adjaye J (2008); Molecular characterization of signaling pathways in cancer stem cells; *ecancermedicalscience*, Volume: 2 Article Number: 115 DOI:10.3332/ecancer.2008.115

Li Y, Seidel K, Marschall P, Klein M, **Hugel R**, Walden P, Schlosser, Goldin-Lang P, Unger T, Funke-Kaiser H (2012); A polymorphic microsatellite repeat within the ECE-1c promoter is involved in transcriptional start site determination, human evolution, and Alzheimer's disease; *The Journal of Neuroscience*, 21 November 2012, 32(47):16807-16820; doi: 10.1523/JNEUROSCI.2636-12.2012

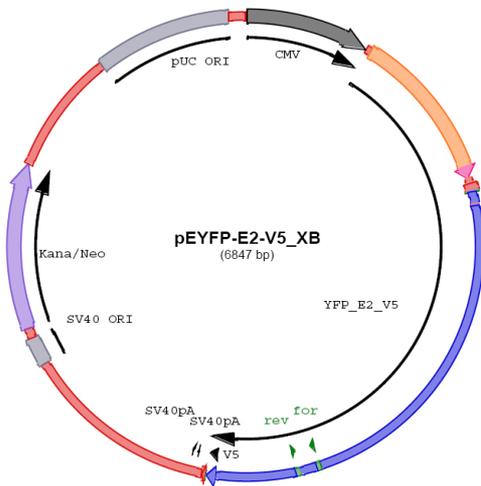
## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

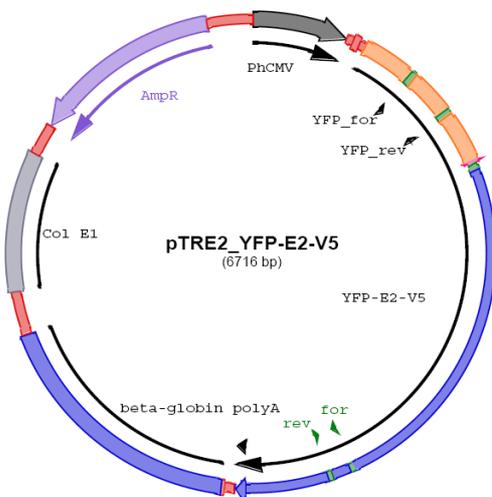
Anhang



Anhang 1: Vektorkarte pTOPO-EZH2-V5



Anhang 2: Vektorkarte pEYFP-EZH2-V5



Anhang 3: Vektorkarte pTRE2-YFP-EZH2-V5