

Technischen Universität München,
Hals - Nasen - Ohrenklinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar

**Analyse der funktionellen Integrität des p53-Tumorsuppressorgens
in Zelllinien maligner Melanome**

Andreas Knopf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier
2. apl. Prof. Dr. H.-P. Niedermeyer

Die Dissertation wurde am 18.02.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 27.05.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Verzeichnis der Abkürzungen	1
2. Einleitung	3
2.1. Definition	3
2.2. Epidemiologie	3
2.3. Risikofaktoren	4
2.4. Klinik und Histologie	4
2.5. Prognose und Stadieneinteilung	5
2.6. Therapie	7
2.7. Bedeutung des p53-Tumorsuppressorgens für das maligne Melanom	11
3. Fragestellung	15
4. Material und Methoden	18
4.1. Häufig verwendete Lösungen	18
4.2. Untersuchte Zelllinien	20
4.3. Zellkultur	21
4.4. Immunhistochemie	22
4.5. Bestrahlung von Zellen	23
4.6. Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika	25
4.7. Proteinpräparation aus Zellen	25
4.8. Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Proben	25
4.9. SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	26
4.10. Semi-Dry-Blot	26
4.11. Immunoblot	27
4.12. Untersuchung der Proteinstabilität	27
4.13. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	28
4.14. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration in Proben	28
4.15. Untersuchung der RNA-Stabilität	29
4.16. Real-time RT-PCR (qRT-PCR)	29
4.17. Makro-Arrays	33

5. Ergebnis	40
5.1. Immunhistochemie	40
5.2. RNA-Stabilität	44
5.3. Proteininstabilität	45
5.4. UV- und Chemoinduktion der p53-Proteinexpression	46
5.5. Expression und Regulation von Genen des p53-Signalwegs	48
5.6. Genregulation der einzelnen Zelllinien	49
5.7. Unterschiede in der konstitutionellen Genexpression	63
5.8. Genexpression nach UV-Bestrahlung	65
5.9. Genexpression nach Behandlung mit Cisplatin	71
5.10. Genexpression nach Behandlung mit Dacarbazin	74
5.11. P53-Proteinexpression in Bezug zu p53-regulierten und p53-regulierenden Genen	77
6. Diskussion	83
6.1. Hintergrund der Arbeit	83
6.2. Regelrechte p53-Induktion in p53-exprimierenden Zelllinien	83
6.3. Nukleäre Kompartimentierung als Folge der p53-Induktion	84
6.4. Die Genexpression in Makro-Arrays und qRT-PCR	85
6.5. Ursachen konstitutioneller und induzierter p53-Expression	86
6.6. Dysregulation der Zellzyklus-Kontrolle bei Erhalt des p53-Signalwegs	92
6.7. Verminderte BBC3-Induktion als Ursache beschriebener Apoptose-Resistenz	102
6.8. Keine Störung der Transkription Hypoxie-assoziiierter Gene	104
6.9. Keine Unterschiede in der APEX1-Expression bei den vorliegenden Zelllinien	106
6.10. Vermehrte TEAD1-Expressionen nach Gabe von Cisplatin – mögliche Interaktionen der p38- und p53-Signalwege	108
7. Zusammenfassung	109
8. Literaturverzeichnis	112
9. Anhang	127

1. Verzeichnis der Abkürzungen

AK	Antikörper
Abs	Absorption
Arg	Arginin
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bichinolin-4-carbonsäure
BSA	Rinderserum-Albumin
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
DAB	3,3`Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
Del	Deletion
D-PBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HEM	Hemizygotie
HepesBSS	Hepes Buffered Saline Solution
HE-Reagenz	Hämatoxylin-Eosin-Reagenz
Het	heterozygote Allele
LOH	Verlust der Heterozygotie
LOT	Verlust allelspezifischer Transkription
MEM	Minimum Essential Medium
MM	malignes Melanom

MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NP40	Nonidet-P40
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RPMI 1640 Medium	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
ROH	Retention der Heterozygotie
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	saline sodium citrate
TBE	Tris/Borate/EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TNS	Trypsin Neutralizing Solution
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ui	nicht informativ
UV	Ultraviolett

2. Einleitung

2.1. Definition

Das maligne Melanom ist eine aggressive Form des Hautkrebs, die von Melanozyten ausgeht und überwiegend im Bereich der Haut entsteht, jedoch auch in Schleimhäuten, Uvea, Iris, Cochlea, Vestibularorgan und Leptomeningen vorkommen kann. Das maligne Melanom ist zumeist stark pigmentiert, es werden allerdings auch amelanotische Formen beschrieben. Im Verhältnis zur Tumormasse besteht eine frühe Tendenz zur Metastasierung und damit eine ungünstige Prognose. Das maligne Melanom ist für etwa 90% der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich (Korting et al., 2007).

2.2. Epidemiologie

Die Inzidenz maligner Melanome hat in den letzten Jahrzehnten weltweit kontinuierlich zugenommen (Armstrong & Kricger, 1993, 1994; Coleman et al., 1993; Garbe et al., 2000). Besonders dramatisch ist der Anstieg an malignen Melanomen in Ländern mit starker Sonneneinstrahlung. In Australien ist das maligne Melanom das vierthäufigste Malignom des Mannes und das dritthäufigste Malignom der Frau (Looper & Bhatia, 2001). In Europa werden die höchsten Inzidenzraten in Skandinavien (Armstrong & Kricger, 1994; de Vries et al., 2003), die niedrigsten in mediterranen Ländern (de Vries et al., 2003) beobachtet. In Deutschland treten 10-12 neue Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf (Garbe & Blum, 2001). Es ist anzunehmen, dass Verbesserungen in der Früherkennung von Melanomen und veränderte Lebensgewohnheiten (ausgiebiges Sonnenbaden) zu erhöhten Inzidenzraten beitragen (Brochez & Naeyaert, 2000; Kricger et al., 1993; Marks, 2000). Neben einer erhöhten Inzidenz an malignen Melanomen konnte in den letzten Jahrzehnten ebenso eine erhöhte Mortalität nachgewiesen werden (de Vries et al., 2003; La Vecchia et al., 1999). In Deutschland wurde zwischen 1970 und 1995 eine Zunahme der Mortalität von 2,2 auf 3,0 Fälle für Männer und von 1,6 auf 2,0 Fälle für Frauen pro 100.000 Einwohner und Jahr ermittelt (Garbe & Blum, 2001). Ein vergleichbarer Trend wurde in den USA beobachtet (Howe et al., 2001; Streetly & Markowe, 1995). Seit Anfang der 90er Jahre stabilisiert sich der Anstieg der Mortalitätsrate in vielen Ländern (de Vries et al., 2003; Garbe & Blum, 2001; Howe et al., 2001; La Vecchia et al., 1999), wobei der Anteil dünnerer und weniger invasiver Melanome zunimmt (Armstrong & Kricger, 1994; Garbe & Blum, 2001; Thorn et al., 1994).

2.3. Risikofaktoren

Die genaue Ätiologie des malignen Melanoms ist unbekannt. Allerdings scheint die UV-Exposition der wichtigste exogene Faktor in der Entstehung maligner Melanome zu sein (IARC, 1992). Intermittierende, intensive UV-Exposition sowie schwerwiegende Sonnenbrände zeigen eine positive Assoziation mit der Entstehung maligner Melanome (Armstrong & Krickler, 1993; Gandini et al., 2005; Gilchrest et al., 1999; IARC, 1992; Krickler et al., 1993). Dass signifikant häufiger Personen höheren sozio-ökonomischen Status betroffen sind, wird auf ihr Freizeitverhalten mit wiederkehrend hoher UV-Belastung zurückgeführt (English et al., 1997; Gallagher et al., 1987). Die von Gandini et al. (2005) veröffentlichte Meta-Analyse von 57 Artikeln konnte kein signifikant erhöhtes Risiko für eine Melanomentstehung nach schwerwiegenden Sonnenbränden im Kindesalter, verglichen mit jenen des Erwachsenenalters nachweisen, wenngleich Migrationsanalysen dies nahe legen (Holman & Armstrong, 1984; Khlat et al., 1992; Mack & Floderus, 1991). Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom korreliert die Verteilung maligner Melanome am Körper nur schlecht mit der kumulativen Strahlendosis, mit Ausnahme des Lentigo-maligna Melanoms (IARC, 1992; van der Spek-Keijser et al., 1997).

Mithin gelten die totale Zahl benigner Nävi und insbesondere ein Vorkommen dysplastischer Nävi als unabhängige Risikofaktoren (Holly et al., 1987; MacKie et al., 1989). Menschen mit positiver Familienanamnese weisen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf (Ford et al., 1995; Platz et al., 2000).

Blaue Augen, blondes oder rotes Haar, gering pigmentierte Haut und Sommersprossen stellen phänotypische Risikofaktoren dar (Bliss et al., 1995; Wei et al., 2003).

Beim autosomal-dominant vererbten „Syndrom dysplastischer Nävi“ liegt eine genetische Disposition zur Entwicklung eines malignen Melanoms vor (Czajkowski et al., 2004; Tucker et al. 1997). Einen weiteren erblich determinierten Risikofaktor stellt die Xeroderma pigmentosum dar. Hierbei handelt es sich um eine sehr seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung der DNA-Reparatur, die das Risiko multipler Tumoren (Basalzellkarzinome, Plattenepithelkarzinome, Melanome) in Bereichen licht-exponierter Haut um ein Vielfaches erhöht (Kraemer et al., 1994; Tomescu et al., 2001).

2.4. Klinik und Histologie

Klinisch und histologisch lassen sich verschiedene Melanomsubtypen klassifizieren (Tab. 01, nach Garbe et al., 1995 c). Einige Typen sind jedoch nicht klassifizierbar oder repräsentieren

Mischformen. Klinische Sonderformen sind z.B. amelanotische Melanome sowie Schleimhaut- oder andere extrakutane Melanome.

Das superfiziell-spreitende Melanom (SSM) weist zunächst ein intraepidermal horizontales Wachstum auf und imponiert klinisch als Fleck. Später folgt die vertikale Ausbreitung, es wächst flach erhaben, unterschiedlich gefärbt und z.T. mit hellen Regressionszonen. Histologisches Charakteristikum ist das pagetoide Muster der intradermal wachsenden Tumorkomponente. Das noduläre Melanom imponiert primär knotig, exophytisch, schwarz-braun gefärbt, häufig erosiv blutend. Da bei diesem Subtyp die horizontale Wachstumskomponente überaus gering ist, fehlt die Möglichkeit zur Frühdiagnose. Das Lentigo-maligna-Melanom entsteht oft erst nach vielen Jahren aus einer Lentigo-maligna. Das akrolentiginöse Melanom entsteht palmo-plantar, seltener sub- oder periungual und zeichnet sich durch eine intraepidermale Frühphase aus, der eine vertikale Ausbreitung folgt (Korting et al., 2007).

<i>Klinisch-histologischer Subtyp</i>	<i>Anteil in %</i>
1. superfiziell spreitendes Melanom	57,4%
2. noduläres Melanom	21,4%
3. Lentigo-maligna Melanom	8,8%
4. akrolentiginöses malignes Melanom	4,0%
5. nicht klassifizierbare Melanome	3,5%
5. andere	4,9%

Tab. 01 Klinisch-histologische Subtypen des malignen Melanoms (nach Garbe et al., 1995 c)

2.5. Prognose und Stadieneinteilung

Bei Diagnosestellung liegen 90% der Melanome als Primärtumore vor, d.h. ohne erkennbare Metastasierung. Die wichtigsten prognostischen Faktoren beim primären malignen Melanom sind (Korting et al., 2007):

- histologische, vertikale Tumordicke nach Breslow (Balch et al., 2001; Garbe et al., 1995b; Kölmel et al., 2002; Morton et al., 1993)
- Vorhandensein histologisch erkennbarer Ulzerationen (Balch et al., 1981, 2001)
- Invasionslevel nach Clark (Garbe et al., 1995b; Morton et al., 1993)
- Mikrometastasennachweis in regionären Lymphknoten durch Wächterlymphknotenbiopsie (Balch et al., 1981, 2001)
- Geschlecht: signifikant schlechtere Prognose für Männer (Balch et al., 2001; Garbe et al., 1995b; Kölmel et al., 2002)

- Lokalisation: ungünstige Prognose für oberen Stamm, Oberarme, Hals und behaarten Kopf (Balch et al., 2001; Garbe et al., 1995a, b)

Die Metastasierung kann sowohl primär lymphogen als auch primär hämatogen ablaufen, wobei 2/3 der Erstmetastasierungen auf das regionäre Lymphabflussgebiet beschränkt sind (Korting et al., 2007). Die regionären Metastasen können als Satelliten-Metastasen (bis 2cm zum Primarius), In-transit-Metastasen (in der Haut bis zur ersten Lymphknotenstation) oder regionäre Lymphknotenmetastasen in Erscheinung treten (Korting et al., 2007). Mit zunehmenden Status lokoregionärer Metastasierung sinkt die Prognose dramatisch, beim Vorliegen von Fernmetastasen ist sie in aller Regel infaust (Balch et al., 1983, 2001).

Das American Joint Committee on Cancer (AJCC) überarbeitete die TNM-Klassifikation für Melanome, um anhand klinischer und pathologischer Faktoren präzisere Eingruppierungen der Läsionen vornehmen zu können (Balch et al., 2001). Dazu wurden Ergebnisse von 17.600 Patienten aus 13 kooperierenden Instituten weltweit einbezogen. Für die T-Kategorie gilt die Empfehlung, die Tumordicke nach Breslow und histologisch nachweisbare Ulzerationen zu berücksichtigen, wohingegen die Invasionstiefe nach Clark nur noch bei Melanomen ≤ 1 mm Dicke bedeutsam ist. In der N-Kategorie sind nunmehr die absolute Zahl betroffener Lymphknoten und deren Differenzierung in klinisch okkult gegenüber klinisch apparent relevante Determinanten. Anhand der Unterscheidung viszeraler gegen nicht-viszeraler Metastasen sowie des Gehaltes an Laktatdehydrogenase wird die M-Kategorie aufgegliedert. Ferner werden Patienten jeglichen Stadiums bei Vorhandensein histologisch nachweisbarer Ulzerationen im Primärtumor hochgestuft. Satelliten-Metastasen und In-Transit-Metastasen werden zu einer gemeinsamen Untergruppe innerhalb des Stadiums III zusammengefasst. Ein Novum in der TNM-Klassifikation ist der Einfluss von Informationen aus intraoperativen lymphatischen Mapping und Wächterlymphknotenbiopsien zur genaueren klinischen und pathologischen Einstufung (Tab.02).

Stadium	Histologische Eigenschaften / TNM-Klassifikation	5-Jahres-Überlebensrate	10-Jahres-Überlebensrate
0	Melanoma in situ (TisN0M0)	100%	100%
IA	≤ 1 mm ohne Ulzeration und Clark Level II/III (T1aN0M0)	95%	88%
IB	≤ 1 mm mit Ulzeration o. Level IV/V (T1bN0M0);	91%	83%
	1,01-2 mm ohne Ulzeration (T2aN0M0)	89%	79%
IIA	1,01-2mm mit Ulzeration (T2bN0M0)	77%	64%
	2,01-4mm ohne Ulzeration (T3aN0M0)	79%	64%
IIB	2,01-4 mm mit Ulzeration (T3bN0M0);	63%	51%
	> 4 mm ohne Ulzeration (T4aN0M0)	67%	54%
IIC	> 4 mm mit Ulzeration (T4bN0M0)	45%	32%

IIIA	1 regionale Lymphknotenmikrometastase, nicht-ulzerierter Primarius (T1-4aN1aM0);	69%	63%
	2-3 regionale Lymphknotenmikrometastasen, nicht-ulzerierter Primarius (T1-4aN2aM0)	63%	57%
IIIB	1 regionale Lymphknotenmikrometastase, ulzerierter Primarius (T1-4bN1aM0);	53%	38%
	2-3 regionale Lymphknotenmikrometastasen, ulzerierter Primarius (T1-4bN2aM0);	50%	36%
	1 regionale Lymphknotenmakrometastase, nicht-ulzerierter Primarius (T1-4aN1bM0);	59%	48%
	2-3 regionale Lymphknotenmakrometastasen, nicht-ulzerierter Primarius (T1-4aN2bM0);	46%	39%
	In-Transit/Satelliten Metastasen ohne Lymphknotenmetastasen (T1-4a/bN2cM0)	30-50%	
IIIC	1 regionale Lymphknotenmakrometastase, ulzerierter Primarius (T1-4bN1bM0);	29%	24%
	2-3 regionale Lymphknotenmakrometastasen, ulzerierter Primarius (T1-4bN2bM0);	24%	15%
	4 o. mehr Lymphknotenmetastasen o. In-Transit/Satelliten Metastasen mit Lymphknotenmetastasen (alle T, N3M0)	27%	18%
IV	Haut-, Subkutan- o. Lymphknotenmetastasen mit normalem LDH (alle T, alle N, M1a);	19%	16%
	Lungenmetastasen mit normalem LDH (alle T, alle N, M1b);	7%	3%
	Alle anderen Organfiliae mit normalem LDH o. jede Fernmetastase mit erhöhtem LDH (alle T, alle N, M1c)	9%	6%

Tab. 02 AJCC-Stadieneinteilung maligner Melanome, nach Balch et al., 2001

2.6. Therapie

Chirurgische Intervention

Die Therapie des primären Melanoms erfolgt operativ. Das Melanom wird mit 0,5cm Sicherheitsabstand bei Melanoma in situ, 1cm bei Melanomen bis 2,0mm Tumordicke und 2cm bei >2,0mm Tumordicke exzidiert (Balch et al., 1993; Heaton et al., 1998; Roberts et al., 2002; Sober et al., 2001). Aufgrund vorliegender Studien kann davon ausgegangen werden, dass die Wahl des Sicherheitsabstandes keinen entscheidenden Einfluss auf das Risiko der Fernmetastasierung und damit auf die Gesamtüberlebensrate hat (Kaufmann et al., 1998). Da mit zunehmender Tumordicke die Gefahr der Ausbildung von Satelliten-Metastasen zunimmt, ist davon auszugehen, dass ein kleinerer Sicherheitsabstand die Ausbildung dieser ermöglicht (Veronesi & Cascinelli, 1991).

Für akrolentiginöse und Lentigo-maligna Melanome konnte eine kontinuierliche Tumorausdehnung nachgewiesen werden (Breuninger et al., 1999), so dass bei diesen Subtypen unter Einsatz lückenloser Schnittrandhistologie auf ausgedehnte Resektionen

verzichtet werden kann. Dies ist insbesondere für anatomische Lokalisationen von großem Vorteil, wo die Einhaltung oben angeführter Sicherheitsabstände zu schwerwiegenden Defekten führt (z.B. Gesicht und Akren).

Bestehen Kontraindikationen für ein operatives Vorgehen können Lentigo-maligna Melanome einer primären Radiatio zugeführt werden (Farshad et al., 2002).

Eine wichtige Determinante für die Überlebensrate des Patienten ist der Status lokoregionärer Lymphknotenmetastasen sowie deren Differenzierung in Mikro- und Makrometastasen. Eine generelle Indikation zur elektiven Lymphknotendisektion besteht nicht, da nur einzelne Untergruppen des Patientenkollektivs davon profitieren (Drepper et al., 1993; Eggermont, 2002; Roberts et al., 2002). Zum Ausschluss einer Lymphknotenmetastasierung wird in Deutschland bei Melanomen $\geq 1,0$ mm Dicke und dünneren Tumoren mit prognostisch ungünstigen Parametern eine Wächterlymphknotenbiopsie empfohlen (Leitlinie Malignes Melanom, 2007). Bei Melanomen des Kopf-Hals-Bereichs sollte die Wächterlymphknotenbiopsie aufgrund überkreuzender Lymphabflusswege und enger Nachbarschaftsbeziehungen zwischen Primarius und Lymphstromgebiet nur ergänzend eingesetzt werden (Schwipper, 2000).

Beim Nachweis einer lokoregionären Lymphknotenmetastasierung wird die radikale Lymphadenektomie empfohlen (Coit et al., 1991; Eggermont, 2002; Morton et al., 1991; White et al., 2002).

Bei Vorliegen isolierter, R0-resezierbarer Fernmetastasen sollte die Exzision erwogen werden (Eggermont, 2002; Fletcher et al., 1998; Leo et al., 2000). Mithin wird die Metastasenchirurgie in palliativer Intention eingesetzt (Fletcher et al., 1998).

Radiotherapie

Die Indikation zur primären Radiatio besteht selten. Schwer zugängliche bzw. kosmetisch ungünstig gelegene Lentigo-maligna Melanome stellen mögliche Einsatzgebiete dar (Farshad et al., 2002; Schmid-Wendtner et al., 2000). Ferner kann sie Bestandteil der Therapie fortgeschrittener Melanomen mit Hochrisikokonstellation (Ballo et al., 2002) sowie bei primär inoperablen Melanomen sein (Burmeister et al., 1995). Die adjuvante Radiatio scheint dabei keinen Einfluss auf die Überlebensrate zu haben (Creagan et al., 1978; Fuhrmann et al., 2001). Strahlentherapeutische Maßnahmen in der Therapie von Melanommetastasen linderten die Symptome der Patienten, so dass ihr palliativer Einsatz gerechtfertigt ist (Kirova et al., 1999; Rate et al., 1988).

Das Standardchemotherapeutikum in der Behandlung maligner Melanome ist Dacarbazin. Die Ansprechrate maligner Melanome wird in der Literatur mit etwa 20% angegeben (Lee et al., 1995). In der Gruppe der alkylierenden Zytostatika gehört Dacarbazin zur Untergruppe der Triazene. Dacarbazin ist ein Prodrug, das durch N-Demethylierung in die wirksame Form 5-(3-methyl-1-triazen) Imidazol-4-Carboxamid (MTIC) überführt wird. MTIC ist instabil und zerfällt spontan zu 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid (AIC) sowie dem DNA-methylierenden Methyl diazohydroxid und dem Methyl-Carbonium-Ion (Garbe & Eigentler, 2004; Rooseboom et al., 2004). Dieser Umbau ist Cytochrom P450-abhängig, welches auch in Melanomzelllinien nachgewiesen worden ist (Rooseboom et al., 2004). Die Induktion dieses Prozesses ist mittels Lichtexposition möglich (Lev et al., 2003; Tentori & Grazani, 2004). Der UV-induzierte Abbau von Dacarbazin zu toxischem und unwirksamen 2-Azahypoxanthin über 5-Diazoimidazol-4-Carboxamid und Dimethylamin ist unerwünscht, bedarf aber einer Lichtexposition von mehr als 24h (Garbe & Eigentler, 2004; Tentori & Grazani, 2003).

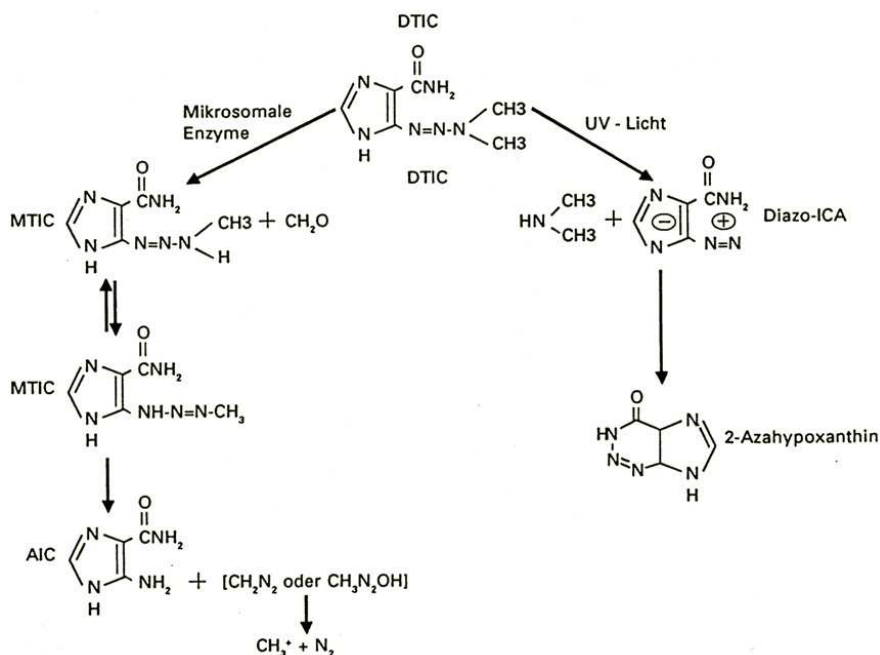


Abb. 01 Abbau von Dacarbazin, aus Garbe & Eigentler (2004)

Eine wirksame Alternative zu Dacarbazin stellt das oral verfügbare Alkylanz Temozolomid dar (Middleton et al., 2000). Der Nitrosoharnstoff Fotemustin weist Ansprechraten von bis zu 20% auf (Lee et al., 1995). Aufgrund seiner Liquorgängigkeit erscheint insbesondere der Einsatz bei Hirnmetastasen vielversprechend (Jacquillat et al., 1990; Mornex et al., 2003). Ein in der Behandlung bösartiger Tumore erfolgreich eingesetztes Chemotherapeutikum ist

Cisplatin. Hierbei handelt es sich um einen anorganischen, planen Komplex, dessen zentrales Platinatom zwei Amin- und zwei Chlorliganden gebunden hat.

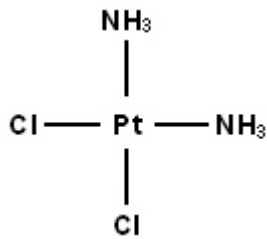


Abb. 02 Strukturformel Cisplatin

Die zytotoxische Aktivität wird durch die Interaktion mit der DNA vermittelt. Hierbei entstehen v.a. Intrastrang-Quervernetzungen, die über Aktivierung verschiedener Signalwege die Apoptose induzieren (Siddik, 2003). Aufgrund ausgeprägter Chemoresistenzen gegenüber Cisplatin ist der therapeutische Nutzen beim malignen Melanom limitiert (Lee et al., 1995). Während zahlreiche prospektiv randomisierte Studien belegen, dass eine systemische Chemotherapie in der adjuvanten Situation keinen Nutzen bringt, konnte durch die Gabe von Interferon-alpha das rezidivfreie Überleben signifikant verlängert werden. Zudem konnte ein geringer Vorteil für die Gesamtüberlebensrate nachgewiesen werden (Wheatley et al., 2007). Neben der Niedrig- und Hochdosistherapie mit Interferon-alpha stellen die nicht zugelassenen pegylierten Interferone eine neue Therapieoption dar (Wheatley et al., 2007). Es ist davon auszugehen, dass eine adjuvante Therapie mit Interferon-alpha (-2a und -2b) für Patienten mit Melanomen >1,5mm Dicke und/oder lokoregionären Lymphknotenmetastasen vorteilhaft ist (Cameron et al., 2001; Grob et al., 1998; Pehamberger et al., 1998). Kirkwood et al. (1996) konnten bei Patienten mit einer Tumordicke >4mm und/oder positivem Lymphknotenstatus durch Hochdosistherapie mit Interferon-alpha2b das krankheitsfreie Intervall und die Gesamtüberlebenszeit signifikant verlängern. Aufgrund der erheblichen Toxizität, die mit einer Hochdosistherapie verbunden ist, muss die Indikation zur Hochdosistherapie mit Interferon-alpha überaus streng gestellt werden. Darüber hinaus besteht die Indikation zur systemischen Chemo-/Immuntherapie bei inoperablen Rezidivtumoren oder inoperablen Metastasen. In einigen Studien wird der Nutzen einer Therapie mit Interferon-beta (Beiteke et al., 1993) oder dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (Spitler et al., 2000) untersucht. Für die klinische Anwendung einsetzbare Ergebnisse liegen noch nicht vor.

Es ist naheliegend, die ausgeprägte Chemoresistenz für die schlechte Prognose von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien verantwortlich zu machen (Koh, 1991). Da die meisten

konventionellen Chemotherapeutika ihre Wirkung über eine Induktion der Apoptose entfalten (Fisher, 1994), wird eine gesteigerte Apotoseresistenz beim malignen Melanom als Ursache schlechter Prognose angenommen (Grossman & Altieri, 2001; Satyamoorthy et al., 2001). Eine zentrale Rolle bei der Initiation der Apoptose spielt das Tumorsuppressorprotein p53. Li et al. (1998) untersuchten das Ansprechen von acht Melanomzelllinien (vier mit mutiertem p53, vier mit Wildtyp-p53) auf Chemotherapeutika, die durch unterschiedliche Wirkmechanismen Apoptose induzieren. Sowohl in Wildtyp-, als auch in Zelllinien mit mutiertem p53, ließ sich nach Chemoinduktion eine erhöhte p53-Proteinkonzentration beobachten, wenngleich die Wildtyp-p53-Zelllinien signifikant besser auf die eingesetzten Chemotherapeutika ansprachen. Dies impliziert eine Störung der funktionellen Integrität des mutierten p53-Proteins. Li et al. (1998) konstatieren eine p53-Abhängigkeit der Chemotherapie-induzierten Apoptose und erachten den p53-Mutationsstatus als Marker für die Chemosensitivität. Diese These wird von Gjerset et al. (1995) und Cirielli et al. (1995) gestützt, die nach Transfektion von Wildtyp-p53 in p53-defiziente Zelllinien eine erhöhte Apoptoserate nachwiesen. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um die p53-Abhängigkeit der Chemotherapie-induzierten Apoptose bei metastasierten Melanomen zu beweisen. Gelingt dies, muss der genterapeutische Einsatz von Wildtyp-p53 diskutiert werden.

2.7. Bedeutung des p53-Tumorsuppressorgens für das maligne Melanom

Für die Transformation vom Melanozyten zum malignen Melanom werden Alterationen in zwei bedeutenden Signalwegen der Zellzyklus-Kontrolle verantwortlich gemacht, die Signalwege des Retinoblastoma- (Rb) und des p53-Tumorsuppressorgens. Von allen möglichen Kontrollpunkten des Zellzyklus scheint der G1/S-Kontrollpunkt wesentlicher Angriffspunkt gestörter RB- und p53-Signalwege zu sein.

Das Protein p16, das durch das Gen CDKN2A codiert wird, ist initialer Bestandteil des Rb-Signalwegs. P16 gehört zur INK4-Familie, die Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk4 und Cdk6 sind. Neben p16^{INK4a} (p16) gehören p15^{INK4b} (p15), p18^{INK4c} (p18) und p14^{ARF} (p14) zu dieser Familie. P16 bindet an Cdk4/6 und inhibiert so die Wirkung des Cdk4/6-Cyclin D1-Komplexes. Durch Hemmung dieses Komplexes bleibt die Phosphorylierung von pRb aus. Hypophosphoryliertes pRb bindet den Transkriptionsfaktor E2F, hemmt dessen Aktivität und führt so zum Zellzyklusarrest (Li et al., 2006 a). Störungen dieses Signalweges, im Sinne von p16- oder pRb-Defizienzen, Cdk4/6-Mutationen oder Cyclin D1-

Überexpression, wurden in Melanomzelllinien häufig nachgewiesen. In sporadischen Melanomen sind diese Aberrationen seltener. Der Verlust der p16-Funktion ist mit der Melanomprogression assoziiert (Li et al., 2006a). Einige Autoren interpretieren den Nachweis von p16-Keimbahnmutationen bei familiären Melanomen als Hinweis für die Rolle von p16 in frühen Stadien der Melanomentwicklung (Li et al., 2006 a). Während p16-Mutationen bei einigen Melanomzelllinien nachgewiesen wurden, sind Rb-Mutationen selten (Li et al., 2006 a). Trotz fehlender Rb-Mutationen, ist die Rb-Funktion bei vielen Melanomen beeinträchtigt. Hyperphosphorylierungen durch deregulierte Cdk's oder Sequestration durch virale Proteine, wie E7, E1A oder SV40 large T-Antigen führen weitaus häufiger zu einer eingeschränkten Rb-Funktion als Mutationen (Li et al., 2006 a).

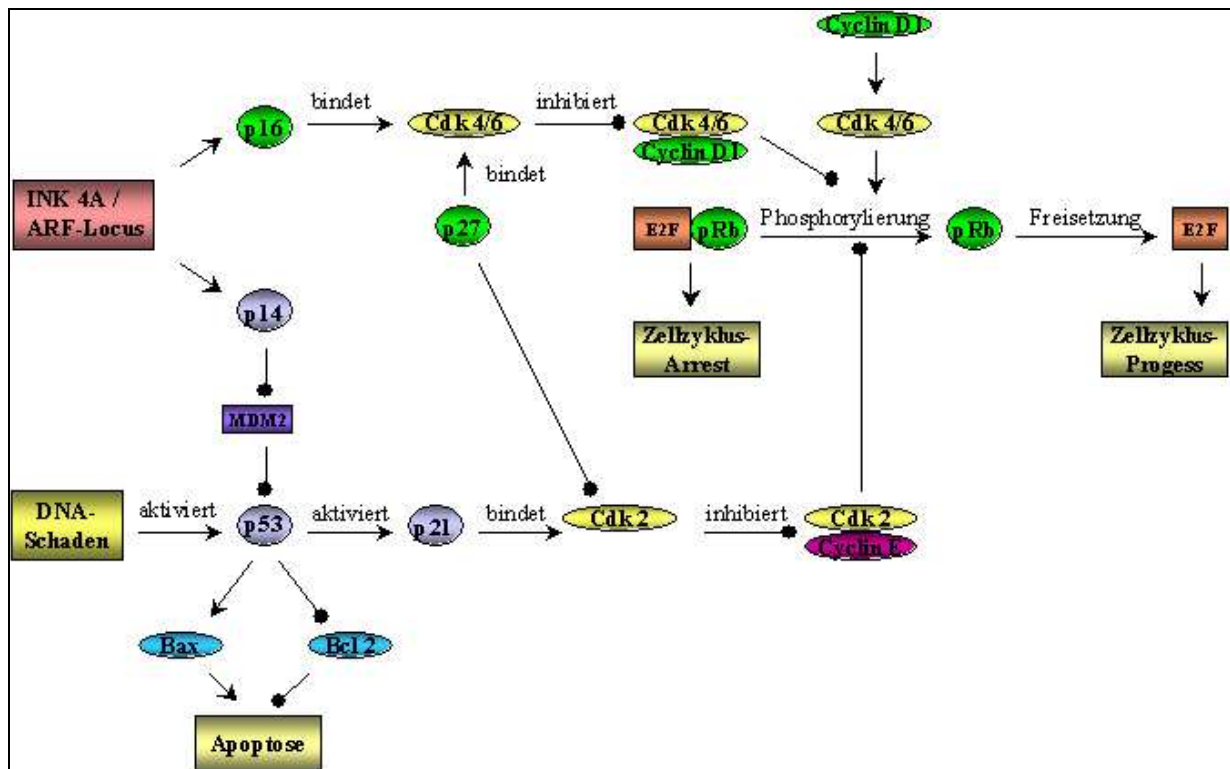


Abb. 03 P53- und Rb-Signalweg zur Regulation von Zellzyklus und Apoptose, modifiziert nach Li et al., 2006 a

Der p53-Signalweg ist von besonderer Bedeutung für die Suppression der Malignomentwicklung. Das p53-Tumorsuppressorgen (p53) liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13.1) und kodiert für ein 53 kDa schweres Protein. In normalen, adulten Zellen weist Wildtyp-p53 eine Halbwertszeit von weniger als 35 Minuten auf (Maltzman & Czyzyk, 1984), so dass es immunhistochemisch nicht nachweisbar ist. DNA-Schäden, hervorgerufen durch ionisierende Strahlen, UV-Strahlung sowie DNA-schädigende Agenzien, induzieren p53 und führen zur Akkumulation und damit zur Nachweisbarkeit des p53-

Proteins im Zellkern (Kastan et al., 1991; Lu & Lane, 1993; Maltzman & Czyzyk, 1984; Nelson & Kastan, 1994; Zhan et al., 1993). Eine charakteristische Akkumulation des p53-Proteins findet sich in den Zellkernen der meisten soliden Tumoren (Matlashewski et al., 1984; Oren & Levine, 1983; Zakout-Houri et al., 1983). Hierbei handelt es sich um eine Überexpression von aberrantem p53-Protein. Eine solche Akkumulation von p53-Protein konnte in immunhistochemischen Untersuchungen auch für das maligne Melanom nachgewiesen werden (Akslen & Morkve, 1992; Cristofolini et al., 1993; Gwosdz et al., 2006; Lassam et al., 1993; Stretch et al., 1991).

In der Pathogenese von mehr als der Hälfte aller soliden humanen Tumoren spielen p53-Mutationen eine wesentliche Rolle (Hollstein et al., 1991). Die Funktion von p53 trägt zur Integrität des Genoms bei (Bouffler et al., 1995; Livingstone et al., 1992; Yin et al., 1992). Dabei fungiert p53 als Transkriptionsfaktor, der an der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt ist (Wang & Harris, 1996). Diese Funktionen werden unter anderem durch p21^{CIP-1/WAF-1} (el-Deiry et al., 1993), MDM2 (Barak et al., 1993), Cyclin G1 (Okamoto & Beach, 1994), GADD45 (Kastan et al., 1992) und BAX (Miyashita & Reed, 1995) vermittelt, welche Effektor-Gene des p53-Signalweges darstellen.

Zellzyklusarrest (Mercer et al., 1990; Kastan et al., 1991) und Einleitung der Apoptose (Lowe et al., 1993; Shaw et al., 1992; Yonish-Rouach et al., 1991) sind zwei zentrale Funktionen von p53. Der Zellzyklusarrest im G1/S Stadium wird über die Induktion der Expression von p53-abhängigem p21^{CIP-1/WAF-1} kontrolliert, das für einen Inhibitor der Cyclin-abhängigen-Kinase Cdk2 kodiert (el-Deiry et al., 1993). Analog zum durch p16-vermittelten Signalweg wird die Phosphorylierung von pRB blockiert und der Zellzyklus arretiert. Diese inhibitorische Wirkung von p21^{CIP-1/WAF-1} ist an hohe Proteinkonzentrationen gebunden, wie sie nach p53-Induktion durch DNA-Schaden entstehen. Eine p53-unabhängige Beteiligung von p21 an der zellulären Alterung, terminalen Differenzierung und Apoptose wurde ebenfalls beschrieben (Sato et al., 2002). Mutationen von p21, die die Funktion beeinträchtigen, sind selten (Soto et al., 2005). Im Zellzyklusarrest können subletale Schäden, die z.B. durch UV-Strahlung hervorgerufen worden sind, durch DNA-Reparatur beseitigt werden, bevor sie sich in der Replikation als Mutation manifestieren. Hieran beteiligt ist das p53-regulierte GADD45.

In der Karzinogenese melanozytärer und nicht-melanozytärer Karzinome der Haut wird der UV-Strahlung eine herausragende Bedeutung zugesprochen (Bentham & Aase, 1996; IARC, 1992), wobei die kanzerogene Potenz der UV-B Strahlung (280-315nm) deutlich höher einzustufen ist als jene der UV-C (100-280nm), gefolgt von UV-A Strahlung (315-400nm) (de Gruijl, 1996; IARC, 1992). UV-Strahlung induziert die Bildung von Photoprodukten in

der DNA, hierunter vor allem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin(6-4)Pyrimidonaddukte (IARC, 1992; Krickler et al., 1991). Typische UV-induzierte Mutationen sind C>T Basenaustausch (häufig) bzw. CC>TT Tandembasenaustausch (seltener) (Brash et al., 1991; Hutchinson, 1994). Zahlreiche derartige Mutationen konnten für das p53-Tumorsuppressorgen bei Plattenepithel- und Basalzellkarzinomen sowie in gesunder Haut nachgewiesen werden (Brash et al., 1991; Nakazawa et al., 1994; Ziegler et al., 1993), wohingegen p53-Mutationen in Melanomen selten sind (Albino et al., 1994; Daya-Grosjean et al., 1995; Florenes et al., 1994; Gwosdz et al., 2006; Hartmann et al., 1996; Sparrow et al., 1995). Eine fehlende Reparatur von Photoprodukten in der DNA als Ursprung der Malignomentstehung implizieren Melanome von Xeroderma pigmentosum-Patienten, die in mehr als 90% der Fälle p53-Mutationen aufweisen, häufig in typisch UV-induzierter Form (Giglia-Mari & Sarasin, 2003). McKay et al. (1997) wiesen die Notwendigkeit von p53-Wildtyp-Protein zur Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden nach. Letal geschädigte Zellen werden in der Regel apoptotisch. P53 induziert die Expression des proapoptotischen Faktors BAX, der das anti-apoptotische Protein BCL-2 bindet (Miyashita & Reed, 1995). Neben der Aktivierung bestimmter Zielgene ist auch eine Transkriptions-unabhängige Regulation der Apoptose möglich. Das p53-Protein interagiert dazu mit zahlreichen zellulären Proteinen, wie HSP70 (Hinds et al., 1987), MDM2 (Oliner et al., 1992), TBP (Seto et al., 1992), TFIIH (Xiao et al., 1994) oder SP1 (Lagger et al., 2003).

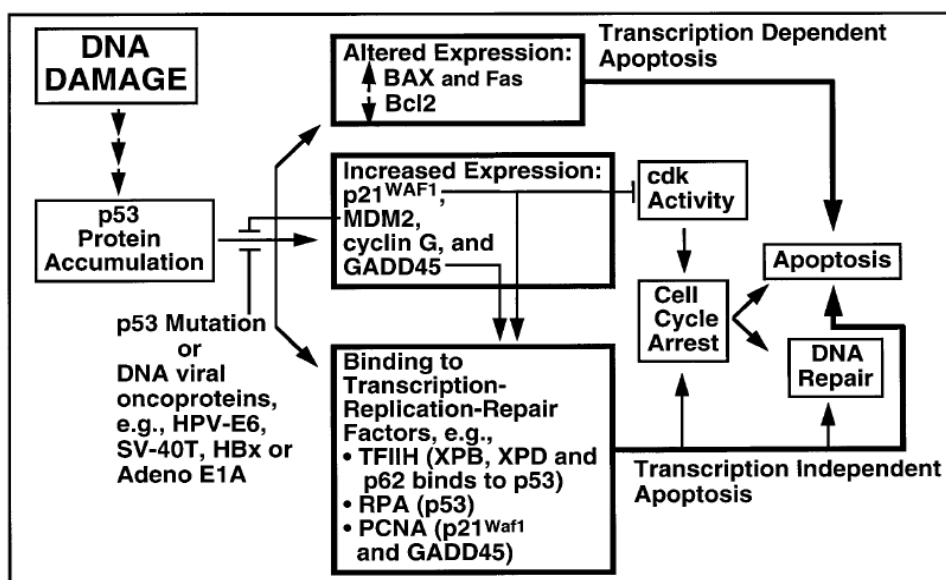


Abb. 04 Vereinfachtes Modell der p53-Signalwege aus Wang et al., 1996

Ein Verlust der Wildtyp-p53-Funktion durch Mutation reduziert die Fähigkeit der Zelle einen vorliegenden Schaden durch Einleitung der DNA-Reparatur oder Apoptose zu beseitigen, welches einen selektiven Vorteil zur klonalen Expansion neoplastischer Zellen darstellt (Kern et al., 1992; Lowe et al., 1993). Den Zusammenhang zwischen Verlust von Wildtyp-p53 und Malignomentwicklung illustrieren Patienten mit Li-Fraumeni Syndrom. Hierbei ist eine vererbte p53-Mutation für eine Prädisposition zur Ausbildung zahlreicher Malignome, v.a. Sarkome, Hirntumore, Mammakarzinome und Leukämien ursächlich (Malkin et al., 1990).

Es ist zu vermuten, dass die Resistenz gegenüber Apoptose auch beim malignen Melanom eine wesentliche Grundlage der Transformation eines normalen Melanozyten zum Melanom darstellt (Alanko et al., 1999; Gilchrest et al., 1999; Li et al., 1998). Li et al. (1998) wiesen nach, dass Melanomzellen, die eine p53-Mutation tragen, deutlich resistenter gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose als Melanomzellen mit Wildtyp-p53 sind. Mithin spricht für ein Ungleichgewicht im apoptotischen System die Tatsache, dass sich nach UV-induzierter Schädigung der Haut in Apoptose befindliche Keratinozyten leicht nachweisen lassen (Young, 1987), während apoptotische Melanozyten deutlich seltener beobachtet werden (Bowen et al., 2003). Eine mögliche Ursache ist der hohe Gehalt an anti-apoptischen Proteinen, z.B. BCL-2, in Melanozyten (Bowen et al., 2003; Morales-Ducret et al., 1995). Geringe Apoptoseraten und ein hoher Gehalt an BCL-2 konnten ebenfalls für das maligne Melanom nachgewiesen werden (Bowen et al., 2003; Mooney et al., 1995; Staunton & Gaffney, 1995).

Es wird deutlich, dass p53 als zentrale Instanz in der Regulation von DNA-Reparatur und Apoptose zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Zellsystems auch in der Karzinogenese des malignen Melanoms von Bedeutung ist. In Anbetracht des vergleichsweise seltenen Auftretens von p53-Mutationen bleibt letztlich unklar, welche genaue Rolle p53, respektive Veränderungen in dessen Signalwegen, in der Karzinogenese des malignen Melanoms spielen.

3. Fragestellung

Eine Vielzahl der malignen Melanome zeigt eine Akkumulation des Tumorsuppressorproteins p53, obwohl keine Protein-stabilisierenden Mutationen detektiert werden können. Eine aberrante Akkumulation des p53-Proteins wird für viele solide Tumoren mit einer funktionalen Störung zahlreicher Zellvorgänge gleichgesetzt. Zu den zentralen Vorgängen,

die infolge eines Zellschadens p53-abhängig ausgelöst werden, gehören die Zellzyklusverzögerung, Apoptose und Reparatur geschädigter DNA.

Aus diesen Punkten ergeben sich für die vorliegende Arbeit verschiedene Fragestellungen:

1. Welche Faktoren tragen zur Anreicherung des p53-Proteins bei?

Die Ursachen, die zur Anreicherung des p53-Proteins bei Melanomen führen sind derzeit nicht hinreichend geklärt. P53 liegt in nicht geschädigten Zellen in nur geringen Konzentrationen vor. Bei Zellschädigung akkumuliert das Protein im Zellkern und transaktiviert dort seine Zielgene. Ist der Zellschaden behoben, wird p53 mit Hilfe des MDM2-Proteins in das Zytoplasma ausgeschleust und anschließend im Proteasom degradiert. Sollte dagegen das p53-Protein im Zytoplasma statt im Zellkern akkumulieren, wird es nicht mehr von MDM2 zur Degradation markiert und wird so aberrant angereichert. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden immunhistochemische Analysen von primären Melanozyten und Zelllinien, die von Melanomen etabliert wurden, durchgeführt. Hierbei wurde nicht nur das Ausmaß der Akkumulation, sondern auch die Zuordnung zum jeweiligen Zellkompartiment und zum p53-Mutationsstatus berücksichtigt.

Neben einer fehlenden p53-Degradation könnte eine fehlerhafte Anreicherung des p53-Proteins auf eine erhöhte mRNA-Stabilität zurückzuführen sein. Für diese Untersuchung wurden alle Zelllinien sowie die primären Melanozyten mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D behandelt und die p53-Transkriptmenge zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Das p53 Protein selbst hat in gesunden Zellen eine Halbwertszeit von ca. 20 Minuten. In Proteinstabilitätsexperimenten sollte überprüft werden, ob diese in den vorliegenden Melanomzellen signifikant verändert ist.

2. Kann sowohl Wildtyp-p53-Protein als auch mutiertes p53-Protein durch gezielte Schädigung der Tumorzellen induziert werden?

Nach einem Zellschaden akkumuliert das p53-Protein in gesunden Zellen im Zellkern. Zur Überprüfung, ob diese Funktion weiterhin erhalten ist, wurden zum einen alle Melanomlinien und die primären Melanozyten mit Cisplatin, einem starken Induktor der p53-abhängigen Apoptose, stimuliert und mittels eines immunhistochemischen Nachweises analysiert. Zum anderen wurden zur semiquantitativen Analyse Western Blot Experimente von UV-bestrahlten (UV-B und UV-C), Cisplatin-behandelten und Dacarbazin-behandelten Zellen durchgeführt.

3. Besitzt das akkumulierte p53-Protein der vorliegenden Zelllinien seine volle funktionelle Integrität?

Zur Überprüfung der Integrität des p53-Signalwegs wurde die Makro-Array-Technologie eingesetzt. Hiermit war es möglich eine Vielzahl von Genen in einem einzigen Versuchansatz zu analysieren. Besondere Berücksichtigung erhielten hierbei Gene, die die p53-Expression und -Stabilität beeinflussen (siehe 1.) und Gene, die als Effektor-Gene die Zellzyklus-Kontrolle, die Apoptose-Regulation, die DNA-Reparatur und die Angiogenese beeinflussen. Anhand einiger Beispieltene wurden die in den Makro-Array-Analysen erhaltenen Resultate mittels quantitativer RT-PCR überprüft.

Für diese Experimente wurden die primären Melanozyten und Melanomlinien UV-bestrahlt bzw. mit Cisplatin oder Dacarbazin behandelt. Mit Hilfe der Makro-Array-Analysen wurde die Expression der Gene des p53-Signalwegs mit der Expression bei unbehandelten Zellen verglichen, um zu überprüfen, ob eine Induktion des p53-Proteins eine Veränderung im Expressionsmuster zur Folge hat. Eine Analyse der Expressionsveränderung entsprechend dem p53-Mutationsstatus sollte funktionale Unterschiede zwischen einem mutierten und einem Wildtyp-p53-Protein aufzeigen. Eventuelle grundsätzliche Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Melanomen und primären Melanozyten sollten ebenfalls durch die Makro-Array-Analysen detektiert werden.

4. Material und Methoden

4.1. Häufig verwendete Lösungen

Agarose Gel Loading Buffer:

50% Glycerin
50mM EDTA
0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanol
10 x TBE ad 50ml

Dnase-Inkubationsmix:

70µl Puffer RDD (Qiagen)
10µl DNase (1500 Kunitz units)

Hämatoxylin-/Eosin-Färbung (HE):

a) Hämalun-Lösung nach Mayer

1g Hämatoxylin (Merck)
0,2g Natriumjodat
50g Kalialun
50g Chloralhydrat
1g kristalline Zitronensäure
ad 1l dH₂O

b) Eosinlösung

10g Eosin (Merck)
ad 1l dH₂O

OD-Puffer:

1mM EDTA, pH 8,
10mM Tris-HCl, pH 7,5

6-fach Proteinprobenpuffer:

375mM Tris-HCl, pH 6,8
55% Glycerol
6% SDS
7,5% β-Mercaptoethanol
0,001% Bromphenolblau

RIPA Lysis Puffer:

150mM NaCl
50mM Tris-HCl pH 8,0
1% NP-40
0,1% SDS

RLT-Lysis-Puffer:

700µl RLT-Puffer (Qiagen)
7µl β-Mercaptoethanol

5% Sammelgel:

500µl PAA-Lösung 40%
1ml 4-fach Sammelgelpuffer
40µl 10% APS
4µl TEMED
ad 4ml dH₂O

<u>4-fach Sammelgelpuffer:</u>	0,5M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
<u>SDS-Laufpuffer:</u>	25mM Tris 192mM Glycin 0,1% SDS
<u>TBE (1-fach):</u>	89mM Tris 89mM Borsäure 2mM EDTA ad 1l dH ₂ O
<u>TBS:</u>	20mM Tris-HCl, pH 7,5 150mM NaCl
<u>TBST:</u>	20mM Tris-HCl, pH 7,5 150mM NaCl 0,1% Tween 20
<u>Transferpuffer:</u>	25mM Tris 192mM Glycin 20% Methanol
<u>10% Trenngel:</u>	3,0ml PAA-Lösung 40% 3,0ml 4-fach Trenngelpuffer 100µl 10% APS 4µl TEMED ad 12ml dH ₂ O
<u>4-fach Trenngelpuffer:</u>	1,5M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS

4.2. Untersuchte Zelllinien

In dieser Arbeit wurden Zelllinien kutaner, maligner Melanome (SK-Mel 1, SK-Mel 3, SK-Mel 30, Mel-JUSO, IGR-37 und COLO-849) sowie native Melanozyten (NHEM-c M2) untersucht. Die Melanomzelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland), die Zellreihe nativer Melanozyten wurde über die PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Die Tabelle 03 zeigt eine Zusammenfassung der Produktinformationen für die einzelnen Zelllinien gemäß DSMZ und der PromoCell GmbH.

Zellreihe	Zelltyp	DSMZ Nr.	Herkunft
SK-Mel 1	Humanes Melanom	ACC 303	Lymphknotenmetastase eines Melanoms bei einem 29 jährigen Kaukasier
SK-Mel 3	Humanes Melanom	ACC 321	Lymphknotenmetastase eines Melanoms bei einer 42 jährigen Kaukasierin
SK-Mel 30	Humanes Melanom	ACC 151	Subkutane Metastase eines Melanoms bei einem 67 jährigen Kaukasier
Mel-JUSO	Humanes Melanom	ACC 74	Melanom bei einer 58 jährigen Frau
IGR-37	Humanes Melanom	ACC 237	Lymphknotenmetastase eines Melanoms bei einem 26 jährigen Mann
COLO-849	Humanes Melanom	ACC 216	Lymphknotenmetastase eines Melanoms bei einem 43 jährigen Kaukasier
Zellreihe	Zelltyp	Cat.-No.:	Herkunft
NHEM-c M2	Humane epidermale Melanozyten der Vorhaut	C-10402	epidermale Melanozyten der Vorhaut eines vierjährigen Kaukasiers

Tab. 03 Produktinformationen der einzelnen Zelllinien gemäß DSMZ und PromoCell GmbH

Die Auswahl der insgesamt sieben Zelllinien wurde hinsichtlich ihrer molekulargenetischen Eigenschaften getroffen. Es stehen drei Melanomzelllinien sowie native Melanozyten zur Verfügung, die p53 als Wildtyp exprimieren (SK-Mel 30, Mel-JUSO, COLO-849 und NHEM-c M2). SK-Mel 1 und SK-Mel 3 tragen Punktmutationen, die zu einem veränderten Protein führen, IGR-37 trägt eine Deletion, die zu einer Leserasterverschiebung führt. Während SK-Mel 1 und IGR-37 ausschließlich mutierte Transkripte exprimieren, transkribiert SK-Mel 3 zusätzlich Wildtyp-p53.

Tabelle 04 fasst den p53-Status der untersuchten Zelllinien zusammen.

Zelllinie	p53 Aberration ¹	Codon 72 Genotyp (Tumor) (DNA / Transkript) ²	LOH / LOT / ROH ³
SK-Mel 1	c.1032G>A; R273W	Arg / Arg	LOH
SK-Mel 3	c.1013C>G; R267W	Arg / Arg	ROH
SK-Mel 30	-	Het / Pro	LOT
Mel-JUSO	-	Arg / Arg	ui
IGR-37	c.229DelTG	Pro / Pro	LOH
COLO-849	-	Arg / Arg	ui

Tab. 04 ¹ c., Lokalisation gemäß Genbank Accession No. K03199; Del, Deletion

² Arg, homozygot für Arginin; Pro, homozygot für Prolin; Het, heterozygote Allele

³ LOH, Verlust der Heterozygotie; LOT, Verlust allelspezifischer Transkription; ROH, Retention der Heterozygotie; ui, nicht informativ

4.3. Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C, einem Kohlendioxidgehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in 75cm² Kulturflaschen kultiviert. Bei der Kultur wurden für die verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Medien eingesetzt. SK-Mel 1, SK-Mel 30, Mel-JUSO, IGR-37 und COLO-849 wurden in MEM-Medium, SK-Mel 3 in RPMI 1640 Medium kultiviert. Beide Medien wurden mit 10% FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 1% Penicillin / Streptomycin sowie 5% Glutamin versehen (Gibco/BRL, Eggenstein, Deutschland). Das Medium wurde wöchentlich gewechselt. Bei der Kultivierung der NHEM-c M2 Zellen wurde das Melanocyte Growth Medium M2 mit zugehörigem Supplement Kit verwendet (PromoCell). Ein Mediumwechsel fand alle 2-3 Tage statt. Zum Mediumwechsel der Suspensionszelllinie SK-Mel 1 wurden die Zellen für drei Minuten bei 200g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem MEM-Medium aufgenommen. Zur Passage der adhärent wachsenden Tumorzelllinien wurden die Zellen mit 10ml D-PBS (Gibco/BRL) gewaschen und die Zellen mittels 2ml Trypsin / EDTA (Biochrom AG) gelöst. Das eingesetzte Trypsin wurde im Folgenden durch Zugabe von 9ml Medium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in 75cm² Kulturflaschen aliquotiert und auf ein Gesamtvolumen von 15ml aufgefüllt. Bei der Passage von NHEM-c M2 kam ein Detach Kit 30 (HepesBSS, Trypsin / EDTA und TNS) von PromoCell zum Einsatz. Die Zellen wurden mit 5ml HepesBSS gewaschen, durch 1ml Trypsin / EDTA gelöst und das Trypsin-Zellgemisch mit 5ml TNS inaktiviert. Die Zellen wurden in 75cm² Kulturflaschen aliquotiert, in denen 15ml Melanocyte Growth Medium vorgelegt waren.

4.4. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach der Avidin-Biotin-Methode, einer Form der Immunperoxidase-Färbemethode, durchgeführt. Hierbei ist der primäre Antikörper (DO-1, Immunotech, Hamburg, Deutschland bzw. DO-7, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) spezifisch gegen das p53-Protein gerichtet. Der Sekundärantikörper (biotinylierter Anti-Maus-Antikörper), der an den ersten bindet, ist mit Biotin konjugiert. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin Komplex. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase setzt ein geeignetes Chromogen (DAB, Nova Red) um, das daraufhin präzipitiert.

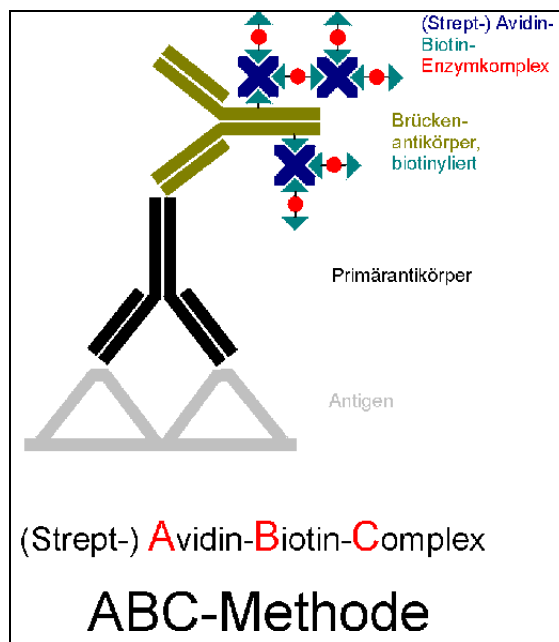


Abb. 05 Schema der immunhistochemischen Färbung, aus Immunochimistry Laboratory, DAKO Corporation

Herstellung der Präparate

Die adhären wachsenden Zelllinien wurden auf 4-well Objektträgern (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Die Fixierung der Präparate erfolgte bei einer Konfluenz von 60-80%. Die Suspensionszelllinie SK-Mel 1 wurde in 75cm² Kulturflaschen kultiviert. Bei einer Zellzahl von $\leq 1 \times 10^6$ Zellen / ml wurde die Zellsuspension mittels Zytospin (Shandon Cytospin 3, Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) bei 800rpm für 3min auf Glasobjektträger zentrifugiert.

Fixierung und Vorbereitung der Zellen

Die Präparate wurden zweimal in PBS (Gibco/BRL) gewaschen, fünf Minuten in 100% Methanol bei -20°C eingetaucht und für 30 Sekunden in einem 3:2 Aceton / PBS-Gemisch bei -20°C fixiert. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und bei -80°C konserviert.

Färbung

Um eine möglichst spezifische Färbung des p53 Antigens zu erhalten, wurde die endogene Peroxidase mit 0,6% H_2O_2 in Methanol für 20 Minuten inaktiviert. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurden die unspezifischen Stellen durch Normal-Pferde-Serum (Vector Laboratories, Burlingame, USA, 3:200 in PBS) für 30min blockiert. Hiernach wurden die Zellen über eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (1:200 in PBS) liegend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS schloss sich eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper an (biotinylierter Anti-Maus-AK, Vector Laboratories, 1:200 in PBS). Der nicht gebundene sekundäre Antikörper wurde durch Waschen mit PBS entfernt, bevor die Zellen mit dem StreptAB Komplex für 30 Minuten inkubiert wurden. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS erfolgte die Färbung mit DAB (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) oder Nova Red (Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 15 Minuten. Nach abgeschlossener Färbereaktion wurden über fünf Minuten alle nicht gebundenen Anteile unter fließendem Wasser entfernt. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) für zehn Sekunden. Die HE-Lösung wurde unter fließendem Wasser über fünfzehn Minuten entfernt. Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden mit ImmuMount (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) eingedeckt.

4.5. Bestrahlung von Zellen

Für die Bestrahlung der Zellen kam eine UV-Lampe (VL-6.ML, Fisher Scientific Bioblock, Illkirch Cedex, Frankreich) zum Einsatz, die wahlweise Licht der Wellenlänge 254nm (UV-C) oder 312nm (UV-B) emittiert. Nach den Angaben des Herstellers erreicht eine Wellenlänge von 254nm bei 15cm Abstand zwischen Lichtquelle und zu bestrahlenden Objekt eine Bestrahlungsstärke (irradiance) von $0,4 \text{ W/m}^2$. Für eine eingestellte Wellenlänge von 312nm wird damit bei 15cm Abstand eine Bestrahlungsstärke $0,58 \text{ W/m}^2$ erreicht. Damit

errechnet sich für eine Zielenergie von 30 J/m^2 bei UV-B-Bestrahlung eine Bestrahlungsdauer von 52 Sekunden (Zhang, 2006).

Berechnung (UV-B): Herstellerangaben: für 312nm und 15cm Abstand: $0,58 \text{ W/m}^2$
Umrechnung: $1 \text{ W} = 1 \text{ J/s} = 1 \text{ m}^2 \times \text{kg/s}$
Zielwert: 30 J/m^2
 $\Rightarrow \sim 52 \text{ s}$

Die Bestrahlungsdauer für eine Zielenergie von 40 J/m^2 bei UV-C-Bestrahlung beträgt 100 Sekunden (Haapajarvi et al., 1999).

Berechnung (UV-C): Herstellerangaben: für 254nm und 15cm Abstand: $0,4 \text{ W/m}^2$
Umrechnung: $1 \text{ W} = 1 \text{ J/s} = 1 \text{ m}^2 \times \text{kg/s}$
Zielwert: 40 J/m^2
 $\Rightarrow 100 \text{ s}$

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in einer für diese Zwecke gefertigten Bestrahlungsbox. Durch einen Schließmechanismus wurde der Innenraum der Bestrahlungsbox vom Umgebungslicht abgeschottet. Ferner waren die Innenseiten der Box mit einer matten, schwarzen Folie ausgekleidet. Schließmechanismus sowie Innenauskleidung hatten das Ziel, mögliche Effekte der Umgebungsstrahlung oder Reflexionseffekte der Boxinnenseiten gering zu halten, um die zu erreichende Bestrahlungsstärke nicht zu verfälschen.



Abb.06 Bestrahlungsbox

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 70%. Für alle adhärennten Zelllinien wurde das Medium für die Dauer der Bestrahlung entfernt. Bei der

Suspensionszelllinie SK-Mel 1 wurde das Medium nach Zentrifugation (200g, 3min) entfernt. Das Zellpellet wurde in 3,5ml PBS resuspendiert und gleichmäßig auf dem Boden einer 75cm² Kulturflasche verteilt. Hierauf folgte die Bestrahlung. Als Kontrollen dienten jeweils unbestrahlte Zellen. Die bestrahlten Zellen wie auch die Kontrollen wurden im Anschluss mit frischem Medium beschichtet. Nach 24 Stunden erfolgten die RNA- und Proteinisolation.

4.6. Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika

Alle Zelllinien wurden mit 20µM Cisplatin (Hexal, Holzkirchen, Deutschland) bzw. 2,5mM Dacarbazin (Sigma, Saint Luis, USA) in MEM-Medium inkubiert. Das Dacarbazin-Pulver wurde hierzu in 10mg/ml Zitronensäure, pH 3,5, gelöst und durch Lichtexposition (1h vor Gebrauch) aktiviert (Lev et al., 2003; Tentori & Grazani, 2003). Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen, die frisches Medium, jedoch kein Chemotherapeutikum erhielten. Nach 24 Stunden erfolgten die RNA- und Proteinisolation.

4.7. Proteinpräparation aus Zellen

Die Proteinpräparation erfolgte, nachdem die Zellen einen Monolayer ausgebildet hatten bzw. die Suspensionszellkultur SK-Mel 1 eine Zellzahl von 3-4 Millionen Zellen pro 75cm² Kulturflasche erreicht hatte.

Die Zellen wurden trypsiniert, zweimal mit 10ml PBS gewaschen und in 400µl RIPA Lysis Puffer, versetzt mit Proteinase Hemmer Cocktail III (16µl, Merck KgaA), aufgenommen. Zur Zell-Lyse wurden die Gemische mehrfach in einer Kanüle aufgezogen und anschließend für 30 Minuten auf Eis gekühlt.

Hiernach erfolgte die Trennung zwischen den Proteinen und den restlichen Zellbestandteilen mittels Zentrifugation bei 12500g für 20 Minuten bei 4°C. Die im Überstand gelösten Proteine wurden bei -80°C gelagert.

4.8. Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Proben

Die Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration wurde mit der BCA (Bicinchoninsäure) - Methode durchgeführt. Hierzu wurde ein BCA-Test-Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Es wurden 1:5 und 1:10 Verdünnungen der Proben mit RIPA-Lysis Puffer hergestellt. 20µl der Verdünnungen wurden in einer 96-Well Platte vorgelegt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde mit BSA (Pierce), 200-1500µg/ml in

RIPA-Lysis Puffer, eine Eichkurve erstellt. Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen untersucht. Die vorgelegten Verdünnungen wurden mit 200µl Working Solution (Lösung A (BCA) und Lösung B (4% CuSO₄ x 5 H₂O) in einem Verhältnis von 1:50) aufgefüllt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Proteine reduzieren bei alkalischem pH Cu²⁺ zu Cu⁺. BCA bindet an den Protein-Kupfer-Komplex, wobei zwei BCA-Moleküle mit einem Cu⁺-Ion einen violett-gefärbten Chelat-Komplex bilden. Die Extinktion der Proben wurde bei 570nm im ELISA Reader (Tecan Spectra Mini, Tecan, Crailsheim, Deutschland) ermittelt. Eine Berechnung der Konzentration erfolgte durch die Magellan 2 Software.

4.9. SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli.

Für die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurde ein Acrylamid-Gel mit einer Endkonzentration von 10% verwendet.

Nach Gießen des Trenngels wurde es mit Butanol überschichtet, damit eine luftblasenfreie, scharfe Trennlinie erreicht werden konnte. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol abgegossen und die Oberfläche mit dH₂O gespült. Das Trenngel wurde mit einem 5%-igen Sammelgel überschichtet und ein Profilformer eingesetzt.

Je Probe wurden 10µg Protein mit dH₂O auf ein Volumen von 12,5µl aufgefüllt und 2,5µl 6-fach Proteinprobenpuffer beigefügt. Die Proben und der biotinylierte Molekulargewichtsstandard (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurden bei 95°C für 5 Minuten denaturiert, auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden 3,5µl Rainbow Standard (Bio-Rad), 15µl des denaturierten Probengemisches bzw. 5µl des biotinylierten Molekulargewichtsstandard in die Probenaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte über eine Stunde bei 25mA pro Gel mit SDS-Laufpuffer.

4.10. Semi-Dry-Blot

Die Proteine wurden im Anschluss auf eine PVDF-Membran, Porengröße 0,45µm (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) transferiert. Für den Semi-Dry Transfer wurde die PVDF-Membran über 5 Minuten in 100% Methanol angefeuchtet und 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Als Pufferreservoir dienten zwei Filter, die in Transferpuffer getränkt wurden.

Das Sandwich aus Filter-Membran-Gel-Filter wurde luftblasenfrei in die Western Blot Apparatur (Semi Phor, Hoefler, San Francisco, USA) eingesetzt. Dabei war die PVDF-Membran der Anode, das Acrylamid-Gel der Kathode zugewandt. Der Transfer erfolgte für 90 Minuten bei 80mA.

4.11. Immunoblot

Die Membranen wurden 5 Minuten in TBS geschwenkt. Hiernach erfolgte die Blockierung der nicht beladenen Proteinbindungsstellen durch 100% Superblock (Pierce) über 1 Stunde unter kontinuierlicher Bewegung. Die Membranen wurden dreimal über 5 Minuten mit TBST gewaschen. Es wurden der anti-p53-AK DO-1 sowie der anti-GAPDH-AK (Abcam plc, Cambridge, UK) eingesetzt. Die Inkubation der Membranen mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Antikörper wurden 1:1000 (DO-1) bzw. 1:200.000 (GAPDH) in TBST verdünnt. Bevor die Inkubation der Membranen mit dem zweiten Antikörper erfolgen konnte, mussten nicht gebunden Anteile des ersten Antikörpers durch dreimaliges Waschen über 5 Minuten und einmaliges Waschen über 15 Minuten in TBST entfernt werden.

Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Membranen mit dem sekundären, Peroxidasegekoppelten Ziege-Anti-Maus-AK (Pierce) über 1 Stunde in einer 1:1000 Verdünnung in TBST.

Der biotinylierte Molekulargewichtsstandard wurde für 1 Stunde in einem Strept-HRP-Komplex (Vector Laboratories), 1:5000 in 50% Superblock (in TBST) verdünnt, inkubiert. Es folgten Waschschrte mit TBST (3 x 5min, 2 x 15min) und TBS (5min).

Nach Inkubation der Membranen (5min, RT) mit einer Substratlösung (Super Signal West Dura Stable Peroxide Buffer, Pierce) wurde die Chemolumineszenz auf einem Röntgenfilm detektiert. Belichtungen zwischen 10 Sekunden und 15 Minuten wurden durchgeführt.

4.12. Untersuchung der Proteinstabilität

Die Untersuchungen zur Proteinstabilität wurden unter drei verschiedenen Bedingungen durchgeführt:

1. unstimulierte Zellen
2. 24h nach Mediumwechsel
3. Induktion mit 20µM Cisplatin über 24h

Für die Bestimmung der Proteinstabilität wurden die Kulturen mit 25µg/ml Cycloheximid (Sigma, Saint Luis, USA) für 15, 30, 60 und 120 Minuten behandelt und die Konzentration an p53- bzw. GAPDH-Protein in Western Blots analysiert. Jeder Zeiteinheit wurde eine Kontrolle gegenübergestellt, die für die jeweilige Zeit mit Medium ohne Zusatz inkubiert wurde. Cycloheximid ist ein von *Streptomyces griseus* produziertes Antibiotikum, welches die Translation in eukaryoten Zellen inhibiert (Agarwal et al., 2001).

4.13. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Das für die RNA-Isolierung erforderliche Material wurde von Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen.

Die RNA-Isolierung erfolgte, nachdem die Zellen einen Monolayer ausgebildet hatten bzw. die Suspensionszellkultur SK-Mel 1 eine Zellzahl von 3-4 Millionen Zellen pro 75cm² Kulturflasche erreicht hatte.

Die Zellen wurden trypsiniert, mit 10ml PBS gewaschen und in 700µl RLT-Lysis-Puffer lysiert. Das Lysat wurde auf die QIA-Shredder-Säule gegeben und zentrifugiert (15000g, RT, 1min). Der Durchfluss wurde mit 700µl 70%-igen Ethanol vermischt. 700µl des Gemisches wurden auf eine RNeasy Säule gegeben und bei 15000g und RT für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang mit den restlichen 700µl wiederholt. Die Säulen wurden mit 350µl RW1 Puffer gewaschen (15000g, RT, 1min). Im Anschluss wurden 80µl DNase-Inkubationsmix für 15 Minuten auf die Säule gegeben. Hiernach wurden erneut 350µl RW1 Puffer bei 15000g, RT, 1min durch die Säule zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule durch Zentrifugation (15000g, RT, 2min) von der Restflüssigkeit befreit. Die RNA wurde mit 50µl RNase-freien Wasser von der Säule eluiert (15000g, RT, 1min). Der Durchfluss wurde ein zweites Mal auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Es schloss sich eine photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration an.

4.14. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration in Proben

Die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Absorption bei den Wellenlängen von 260 und 280nm (DU 530, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Die zu untersuchenden Proben wurden dabei 1:100 in OD-Puffer verdünnt.

Die Konzentrationsberechnung folgte nach der Formel: $\mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Abs}_{260} * \text{Verdünnung} * 40$.

Die Probe wurde als hinreichend rein angenommen, wenn der Quotient der Absorptionswerte von 260nm und 280nm zwischen 1,7 und 2,2 lag.

4.15. Untersuchung der RNA-Stabilität

Die Bestimmung der RNA-Stabilität wurde unter zwei Bedingungen durchgeführt:

1. unstimulierte Zellen (SK-Mel 1 u. SK-Mel 30)
2. Induktion mit 20 μM Cisplatin über 24h (alle Zellreihen)

Für die Bestimmung der RNA-Stabilität wurde Actinomycin D (Sigma) eingesetzt. Actinomycin D ist ein Antibiotikum, gewonnen aus *Streptomyces antibioticus*, welches reversibel an Doppelstrang-DNA bindet und so die Transkription wie Replikation inhibiert. Actinomycin D wurde auf eine Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in dem für die Zelllinie erforderlichen Medium verdünnt. Die Kulturen wurden 30, 60, 120 und 240 Minuten mit Actinomycin D inkubiert. Zu jeder Zeiteinheit wurde eine Kontrolle ohne Actinomycin D im Medium mitgeführt (Agarwal et al., 2001).

Nach der RNA-Isolation und photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte die Auswertung der RNA-Stabilität mittels qRT-PCR. Die Primer wurden über Qiagen (Hilden) bezogen.

4.16. Real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Das Verfahren der klassischen RT-PCR bietet ausschließlich die Möglichkeit qualitative Aussagen über synthetisierte PCR-Produkte am Ende aller PCR-Zyklen zu fällen. Verschiedene Faktoren führen dazu, dass die Menge des entstandenen PCR-Produktes nicht immer mit der Menge der eingesetzten cDNA korreliert. Ursächlich hierfür ist die Kinetik der PCR-Amplifikation, die im zeitlichen Verlauf immer ein Sättigungsplateau erreichen wird. Somit ist es unmöglich, eine Aussage hinsichtlich der Quantität der zu Beginn der RT-PCR vorliegenden cDNA-Menge zu treffen. Erst mit Entwicklung der qRT-PCR war es möglich, quantitative Aussagen über die eingesetzte cDNA zu treffen. Bei der real-time qRT-PCR erfolgt eine Messung der Konzentration der entstandenen PCR-Produkte mittels einer Fluoreszenzreaktion bei jedem PCR-Zyklus. Um eine Fluoreszenz zu erreichen, enthält der PCR-Ansatz sequenzspezifische Oligonukleotide, die an ihrem 5'-Ende mit einem Fluorophor, an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher-Molekül gekoppelt sind. Werden die

Oligonukleotide mit Licht einer Wellenlänge von 485nm bestrahlt, wird die Emission von Licht durch den Fluorophor aufgrund sterischer Hinderung durch den Quencher unterdrückt. Die Oligonukleotide hybridisieren sequenzspezifisch an die neu-synthetisierten Amplifikate. Durch die Anlagerung der Oligonukleotide an ihre Ziel-Sequenzen wird die räumliche Konformation der Oligonukleotide verändert. Damit entfällt die sterische Hinderung des Quenchers auf den Fluorophor und es erfolgt eine Emission von Licht, die an der Detektionseinheit des entsprechenden PCR-Gerätes aufgezeichnet wird. Da an jede Ziel-Sequenz der zu untersuchenden cDNA nur ein Oligonukleotid binden kann, korreliert die Zunahme an Fluoreszenz direkt mit der Menge an synthetisierter DNA.

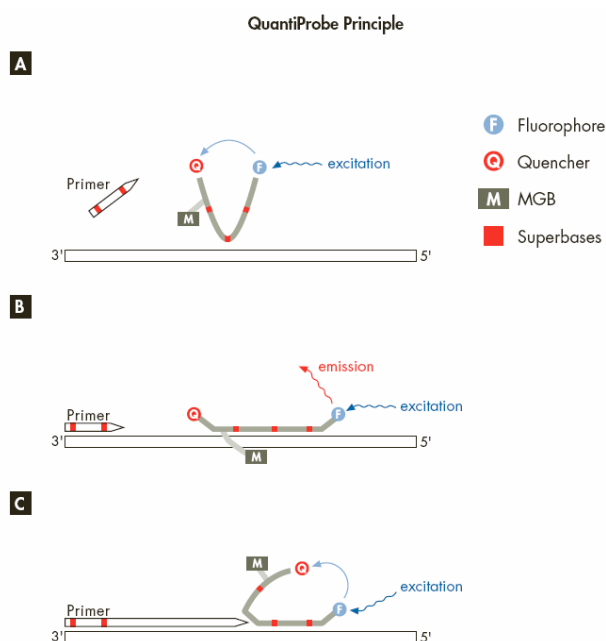


Abb. 07 Prinzip der qRT-PCR, aus QuantiTect Gene Expression Assay Handbook

Die Bestimmung der Ausgangsmenge an cDNA erfolgt anhand von Ct oder CP (Crossing Point) Werten. Sie entsprechen der Anzahl an PCR Zyklen die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Ein um einen Zyklus geringerer CP entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA.

Zur Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) zwischen zu untersuchendem Gen und Haushaltsgen wurde die $\Delta\Delta Ct$ Methode angewandt. Dabei wurde vom Ct Wert des Zielgens der Ct Wert des Haushaltsgens GAPDH abgezogen (ΔCt). Da zu jeder Probe Dreifach-Bestimmungen durchgeführt worden sind, wurde das arithmetische Mittel der Ct Werte eingesetzt. Hiernach wurde von dem ΔCt Wert der experimentell behandelten Probe der ΔCt

Wert der zugehörigen Kontrolle abgezogen. Hieraus ergibt sich der $\Delta\Delta C_t$ Wert. Der relative Expressionsunterschied (Ratio) der experimentell behandelten Probe zu ihrer Kontrolle, normalisiert über das Haushaltsgen GAPDH, ergibt sich aus $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Die Expressionsunterschiede wurden als Säulendiagramme mit Microsoft Excel 2000 dargestellt und ab einem Faktor von 2,5 als hinreichend signifikant angenommen.

Zur Kontrolle der Spezifität der qRT-PCR wurden stichprobenartig 5µl der Amplifikate mit 5µl 2x Agarose-Gel-Loadingpuffer vermischt und bei 100V in einem 0,7%-igen TBE-Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese ging der qRT-PCR voraus. Sie stellt mit der reversen Transkription den ersten Schritt der eingesetzten 2-Schritt qRT-PCR dar. 1µg RNA wurde mit 1µl Oligo-dT (50µM, MWG Biotech AG, Martinsried, Deutschland) vermischt und auf 11µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde über 10 Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Zu jeder Probe wurden 9µl Premix gegeben.

Premix-Komponente	Volumen	Hersteller
10x RT Puffer	2µl	Sigma
RNase-freies Wasser	4µl	
dNTP-Mix (10mM)	1µl	Qiagen
SuperaseIn (20U/µl)	1µl	Ambion, Austin, USA
M-MLV reverse Transkriptase (200U/µl)	1µl	Sigma
Gesamtvolumen	9µl	

Zur cDNA-Synthese wurde das Gemisch auf 42°C für 2 Stunden und abschließend auf 95°C für 5 Minuten erhitzt. Die vorliegenden Proben wurden jeweils mit dH₂O 1:10 verdünnt.

qRT-PCR

Das Verfahren der qRT-PCR wurde zum einen im Rahmen der RNA-Stabilitätsuntersuchungen genutzt, zum anderen diente dieses Verfahren der Verifizierung der bei den Makro-Array-Analysen detektierten Expressionsunterschiede.

Das Protokoll der qRT-PCR zur Quantifizierung von RNA in Proben basiert in dieser Arbeit auf den Angaben des QuantiTect Gene Expression Assay Handbook von Qiagen.

Zur Anwendung kam eine 2-Schritt RT-PCR für ABI PRISM 7700/7900 Sequenz-Detektion-Systeme. Für die zu untersuchenden Proben wurde ein Mix der notwendigen Reaktionskomponenten zusammengestellt. Die Primer wurden sämtlich über Qiagen bezogen. Ausgenommen GAPDH (VIC) waren alle anderen Primer mit dem Farbstoff FAM markiert (Tab. 05).

Assay-Name	QuantiProbe-Sequenz	Sense-Primer / Antisense-Primer (5' - 3')
APEX1	AACCTGCCACACT*CAA	CAGAAAACCTCACCCAGT / GGCTTCTTCCTTTACCCAATC
BBC3 (PUMA)	GCGGAGA*CAAGAGGAG	GACCTCAACGCACAGTA / GCAGGAGTCCCATGATGAGAT
CDC2	Sequenzen von Qiagen geschützt	
CDKN1A	Sequenzen von Qiagen geschützt	
GADD45A	Sequenzen von Qiagen geschützt	
GAPDH	Sequenzen von Qiagen geschützt	
HIF1A	GAAGACACAGAAGCAA	TGT*GGAT*AGT*GATATGGT / GT*CCTGAGTAGAAAATGGGTT
HIPK2	AAAAGAAGCA*AGAAAG	CAGATGACCATGAAGCAGAGA / TCATGTTACCTGGGCCATA
MAP 4	GCCAGAAGAT*A*CCAAC	GAATACCCAAATAGCCAGAAC / GATAGGATCGACCACTTGCTCA
MDM2	Sequenzen von Qiagen geschützt	
P53	Sequenzen von Qiagen geschützt	
SP1	GGTAATGGTGGTGGTG	GAAAAAGGAGTTGGTGGCAATA / TGCTACTTCGAGCCTGTGAAA
TEAD1	TAAACCTCACACACA	CACTCTCTCTCCATTATCGAAC / ACCAGAACTTCACAGCTACA

Tab. 05 Probe- und Primer Sequenzen; *modifizierte Nukleotide

Für Proben aus den RNA-Stabilitätsuntersuchungen wurden 5µl cDNA, zur Verifizierung der Makro-Array-Analysen 2µl cDNA eingesetzt. In beiden Untersuchungen wurden Gesamtvolumina von 20µl genutzt.

Komponente	Vol. / Well	Endkonzentration
2x QuantiTect Probe PCR Master Mix	10µl	1x
10x QuantiTect Assay Mix (Primer)	2µl	1x
RNase-freies Wasser	variabel	
cDNA	variabel	<500ng / Reaktion
Gesamtvolumen	20µl	

Zu jeder Probe wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Verunreinigungen, die zu unspezifischen Reaktionen mit den eingesetzten Primern hätten führen können, wurden durch Non-template-controls (NTC) ausgeschlossen, deren Reaktionsgemisch alle obigen

Komponenten mit Ausnahme der cDNA enthält. An ihrer Stelle wurde RNase-freies Wasser hinzugefügt.

Die 96-Well Platte wurde mit einer Folie versiegelt und bis zur Analyse auf Eis gekühlt. Die Analyse erfolgte im ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Programmierung des ABI PRISM 7900 HT erfolgte nach den Angaben des QuantiTect Gene Expression Assay Handbook.

Schritt	Zeit	Temperatur
PCR, initiale Aktivierung	15min	95°C
40 Zyklen:		
Denaturieren	15s	94°C
Annealing / Detektion	30s	56°C
Extension	30s	76°C

Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software SDS 2.2 RQ (Applied Biosystems). Zur Quantifizierung der eingesetzten cDNA mittels Fluoreszenz wurden relative Quantifizierungen bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH durchgeführt.

4.17. Makro-Arrays

Die Makro-Array-Technologie ermöglicht Analysen von einer Vielzahl von Genen mit nur einem Experiment. Die Array-Membran besteht aus Nylon und weist eine Größe von 3,8cm x 4,8cm auf. Auf die Membran sind genspezifische cDNA-Fragmente zu Vierergruppen aufgespottet. Die Membranen der eingesetzten Q-Serie beinhalten 122 Gene (Biomol/Superarray, Hamburg, Deutschland). Davon stehen 90 Gene im Zusammenhang mit dem humanen p53-Signalweg, 3 Positionen dienen dem Nachweis von Fremd-DNA, 3 Positionen markieren unspezifische Reaktionen im Hintergrund und 10 Positionen weisen Transkripte von Haushaltsgenen nach.

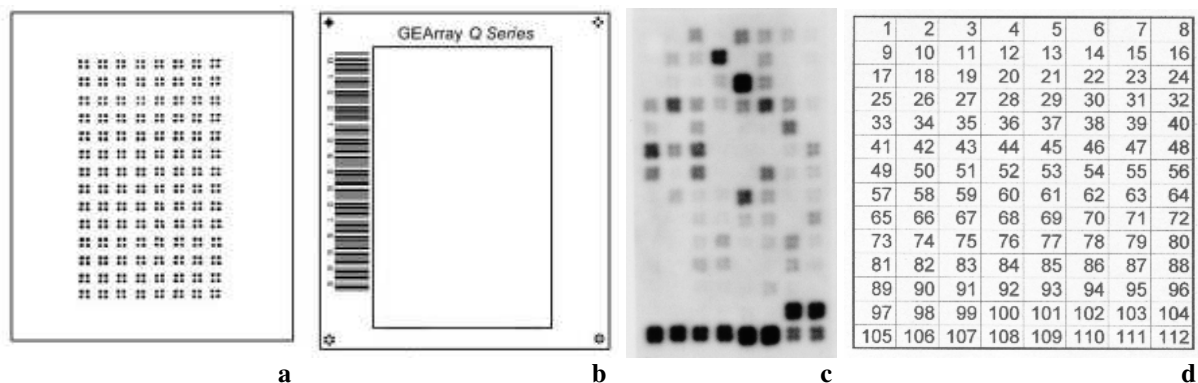


Abb. 08 a, b schematische Darstellung der Array Spot- und Rückseite, aus SuperArray User Manual
 c Scan eines verarbeiteten Arrays
 d Array-Positionen

Tabelle 06 zeigt die Gen-Belegung der einzelnen Tetraspot-Positionen des Arrays.

Pos.	Unigene	GeneBank	Symbol	Description	Gene Name
1	Hs.21330	M14758	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	PGY1, MDR1
2	Hs.1288	NM_001100	ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	ACTA/ASMA
3	Hs.403010	NM_016614	TTRAP	TRAF and TNF receptor associated protein	AD022/EAP2
4	Hs.552567	NM_001160	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor	CED4
5	Hs.73722	NM_080649	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	APE/APE1
6	Hs.9527	NM_016085	C2orf28	Chromosome 2 open reading frame 28	APR--3/APR-3
7	Hs.435561	NM_000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	AT1/ATA
8	Hs.271791	NM_001184	ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	FRP1/MEC1
9	Hs.194654	NM_001702	BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	BAI1
10	Hs.106674	NM_004656	BAP1	BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)	HUCEP-13/hucep-6
11	Hs.159428	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein	Bax zeta
12	Hs.467020	NM_014417	BBC3	BCL2 binding component 3	JFY1/PUMA
13	Hs.150749	NM_000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2
14	Hs.530940	NM_006768	BRAP	BRCA1 associated protein	BRAP2/IMP
15	Hs.194143	NM_007294	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	BRCAI/BRCC1
16	Hs.202	NM_000714	BZRP	Benzodiazepine receptor (peripheral)	MBR/PBR
17	Hs.329502	NM_001229	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	APAF-3/APAF3
18	Hs.292524	NM_001239	CCNH	Cyclin H	CAK/p34
19	Hs.334562	NM_001786	CDC2	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	CDK1/DKFZp686L20222
20	Hs.184298	NM_001799	CDK7	Cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	CAK1/CDKN7
21	Hs.370771	NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CAP20/CDKN1
22	Hs.512599	NM_000077	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	ARF/CDK4I
23	Hs.24529	NM_001274	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	CHK1
24	Hs.291363	NM_007194	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	CDS1/CHK2
25	Hs.459759	NM_004380	CREBBP	CREB binding protein (Rubinstein-Taybi syndrome)	CBP/RSTS
26	Hs.529862	NM_001892	CSNK1A1	Casein kinase 1, alpha 1	CK1/HLCDGP1
27	Hs.446484	NM_001895	CSNK2A1	Casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	CK2A1/CKII
28	Hs.82201	NM_001896	CSNK2A2	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide	CK2A2/CSNK2A1
29	Hs.73527	NM_001320	CSNK2B	Casein kinase 2, beta polypeptide	CK2B/CK2N
30	Hs.121575	NM_001909	CTSD	Cathepsin D (lysosomal aspartyl peptidase)	CPSD
31	Hs.429608	NM_005669	C5orf18	Chromosome 5 open reading frame 18	D5S346/DPI1
32	Hs.336916	NM_001350	DAXX	Death-associated protein 6	BING2/DAP6
33	Hs.155218	NM_007040	HNRPUL1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	E1B-AP5/E1BAP5
34	Hs.96055	NM_005225	E2F1	E2F transcription factor 1	E2F-1/RBBP3
35	Hs.517517	NM_001429	EP300	E1A binding protein p300	p300
36	Hs.208124	NM_000125	ESR1	Estrogen receptor 1	DKFZp686N23123/ER
37	Hs.86131	NM_003824	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	GIG3/MORT1
38	Hs.530402	NM_007051	FAF1	Fas (TNFRSF6) associated factor 1	CGI-03/HFAF1s
39	Hs.80409	NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	DDIT1/GADD45
40	Hs.386189	NM_016426	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	B99
41	Hs.509554	NM_001530	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF-1alpha/HIF1-ALPHA
42	Hs.397465	NM_022740	HIPK2	Homeodomain interacting protein kinase 2	PRO0593
43	Hs.90093	NM_002154	HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4	APG-2/HS24
44	Hs.129867	NM_006383	CIB2	Calcium and integrin binding family member 2	KIP2
45	Hs.255432	NM_054113	CIB3	Calcium and integrin binding family member 3	KIP3
46	Hs.558510	NM_018494	LRDD	Leucine-rich repeats and death domain containing	DKFZp434D229/PIDD

47	Hs.514681	NM_003010	MAP2K4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	JNKK/JNKK1
48	Hs.531754	NM_145185	MAP2K7	Mitogen-activated protein kinase kinase 7	Jnk2/MAPKK7
49	Hs.517949	NM_002375	MAP4	Microtubule-associated protein 4	DKFZp779A1753
50	Hs.356523	NM_012324	MAPK8IP2	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	IB2/JIP2
51	Hs.567303	NM_002392	MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	hdm2
52	Hs.567454	NM_022045	MTBP	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse) binding protein, 104kDa	MDM2BP
53	Hs.202453	NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-Myc
54	Hs.372914	NM_006096	NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	CAP43/CMT4D
55	Hs.431926	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	DKFZp686C01211/EBP-1
56	Hs.509909	NM_003744	NUMB	Numb homolog (Drosophila)	S171
57	Hs.160953	NM_022112	P53AIP1	P53-regulated apoptosis-inducing protein 1	P53AIP1
58	Hs.533055	NM_003884	PCAF	P300/CBP-associated factor	CAF/GCN5
59	Hs.343911	NM_004879	EI24	Etoposide induced 2.4 mRNA	PIG8/TP53I8
60	Hs.96	NM_021127	PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	APR/NOXA
61	Hs.526464	NM_033238	PML	Promyelocytic leukemia	MYL/PP8675
62	Hs.372031	NM_000304	PMP22	Peripheral myelin protein 22	CMT1A/CMT1E
63	Hs.531704	NM_002737	PRKCA	Protein kinase C, alpha	AAG6/PKC-alpha
64	Hs.460355	NM_002738	PRKCB1	Protein kinase C, beta 1	PKC-beta/PKCB
65	Hs.2890	NM_002739	PRKCG	Protein kinase C, gamma	PKC-gamma/PKCC
66	Hs.498570	NM_006257	PRKQC	Protein kinase C, theta	PRKCT/nPKC-theta
67	Hs.491682	NM_006904	PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	DNAPK/DNPK1
68	Hs.582303	NM_002890	RASA1	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	CMAVM/DKFZp434N071
69	Hs.408528	NM_000321	RB1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	OSRC/RB
70	Hs.502875	NM_021975	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (avian)	NFKB3
71	Hs.100890	NM_019845	RPRM	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	REPRIMO
72	Hs.512592	NM_015713	RRM2B	Ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)	DKFZp686M05248/p53R2
73	Hs.55279	NM_002639	SERPINB5	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	PI5/maspin
74	Hs.523718	NM_006142	SFN	Stratifin	14-3-3
75	Hs.369779	NM_012238	SIRT1	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)	SIR2L1
76	Hs.524461	NM_138473	SP1	Sp1 transcription factor	Sp1
77	Hs.437058	NM_003152	STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	MGF/STAT5
78	Hs.1100	NM_003194	TBP	TATA box binding protein	GTF2D/GTF2D1
79	Hs.568169	NM_021961	TEAD1	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	TCF13/TEF-1
80	Hs.164226	NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1	THBS/TSP
81	Hs.724	NM_003250	THRA	Thyroid hormone receptor, alpha (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog, avian)	AR7/EAR7
82	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF/TNF-alpha
83	Hs.76090	NM_021137	TNFAIP1	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	B12/B61
84	Hs.521456	NM_003842	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	DR5/KILLER
85	Hs.2007	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	APT1LG1/CD178
86	Hs.408312	NM_000546	TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	LFS1/TRP53
87	Hs.523968	NM_005426	TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2	53BP2/ASPP2
88	Hs.274329	NM_007233	TP53AP1	TP53 activated protein 1	P53TG1/P53TG1-D
89	Hs.137569	NM_003722	TP73L	Tumor protein p73-like	B(p51A)/B(p51B)
90	Hs.192132	NM_005427	TP73	Tumor protein p73	P73
91	Hs.531251	NM_005658	TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	EBI6/MGC:10353
92	Hs.8375	NM_004295	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	CART1/MLN62
93	Hs.523930	NM_004619	TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	MGC:39780/RNF84

94	Hs.386299	NM_022470	WIG1	P53 target zinc finger protein	PAG608/WIG-1
95	Hs.567358	NM_000553	WRN	Werner syndrome	RECQ3/RECQL2
96	Hs.408453	NM_000378	WT1	Wilms tumor 1	GUD/WAGR
97	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
98	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
99	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
100				Blank	
101				Blank	
102				Blank	
103	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD
104	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD
105	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	CYPA/CYPH
106	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	CYPA/CYPH
107	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	CYPA/CYPH
108	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	CYPA/CYPH
109	Hs.546356	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
110	Hs.546356	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
111	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
112	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin

Tab. 06 Gen-Belegung des Arrays, Biomol/Superarray

Um Makro-Array-Analysen durchführen zu können, wurde die aus Zellen gewonnene RNA mittels reverser Transkription in eine cDNA überführt. Dabei wurden biotinylierte Nukleotide in die cDNA eingebaut. Ist durch eine Kontrolle der Synthese cDNA in ausreichender Konzentration nachgewiesen worden, wurde die Probe denaturiert. Um unspezifische Bindungen der markierten cDNA an die Array-Membran zu verhindern, erfolgte eine Prä-Hybridisierung mit Lachs-Sperma-DNA. In der Hybridisierung haben die markierten cDNA-Sonden an die aufgespotteten, genspezifischen cDNA-Fragmente gebunden. Zur Detektion wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppeltes Streptavidin eingesetzt. Das Biotin der markierten cDNA-Sonden bindet an die freien Bindungsstellen der Avidinmoleküle. Die an diesen Komplex konjugierte alkalische Phosphatase setzt CDP-Star-Substratlösung um und generiert so eine Chemolumineszenz. Diese wurde auf einem Röntgenfilm mit Belichtungszeiten von 2, 3 und 5 Minuten dargestellt. Das Vorgehen in den Makro-Array-Analysen basierte auf dem Protokoll GEMatrix Q and S series Kits, pathway specific gene expression profiling systems for chemoluminescent detection, Superarray Bioscience Corporation.

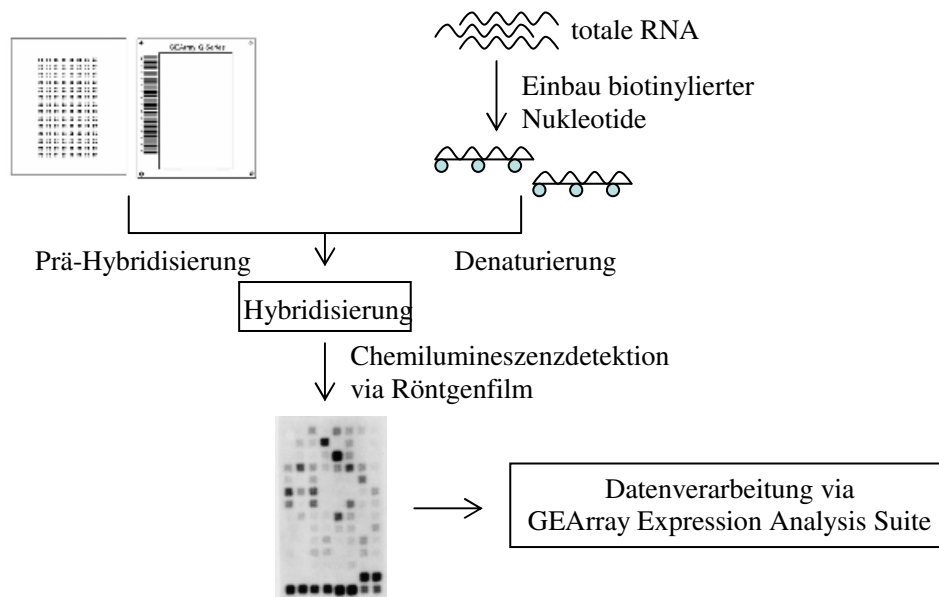


Abb. 09 Schematische Darstellung der Makroarray-Analyse, modifiziert nach GEArray® Q and S Series User

Synthese von cDNA-Sonden

Die aus den Zellen isolierte RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA überführt. Dazu wurden 5µg RNA mit Puffer A (Primer Mix, Superarray) vermischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 10µl gebracht. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 70°C erhitzt und anschließend für 5 Minuten auf Zimmertemperatur abgekühlt. Jeder Untersuchungsansatz wurde daraufhin mit 10µl RT-Cocktail vermischt.

<u>RT-Cocktail:</u>	4µl Puffer BN	(Superarray, Hamburg, Deutschland)
	2µl Biotin-16-dUTP	(Roche, Grenzach, Deutschland)
	2µl RNase freies Wasser	
	1µl RNase Inhibitor	(Promega, Mannheim, Deutschland)
	1µl reverse Transkriptase	(Superarray)

Der Reaktionsansatz wurde 120 Minuten bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 2µl Puffer C (Superarray) wurde die RT-Reaktion gestoppt.

Kontrolle der cDNA-Synthese

Jede cDNA wurde hinsichtlich ihrer Quantität kontrolliert. Dazu wurde 1µl cDNA mit 19µl 1x Agarose Gel Loading Buffer vermischt. Es wurden Verdünnungen von 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280 und 1:5120 hergestellt. Von jeder der Verdünnungen wurde 1µl auf eine HyBond Nylon Membran (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) aufgetragen und 10 Minuten luftgetrocknet. Ein Vernetzen der cDNA mit der Membran wurde durch kurze UV-

Bestrahlung erreicht. Eine Verdünnung von 1:500 sollte in der nachfolgenden Chemolumineszenz-Reaktion gut nachweisbar sein.

Chemolumineszenz-Detektion (Detektions-Kit von Superarray)

Die unbeladenen Bindungsstellen der Arrays oder der in der Kontrolle der cDNA-Synthese verwendeten Membranen wurden durch 2ml GEA Blocking Solution geblockt. Die Inkubation erfolgte unter kontinuierlicher Bewegung von 20-30rpm für 40 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 5-10rpm mit 2ml Puffer F, versetzt mit AP-Streptavidin im Verhältnis 1:10.000.

Nachdem die AP-Streptavidin Komplexe an die biotinylierten Aminosäuren der cDNA gebunden hatten, folgten mehrere Waschschrte (1x mit 4ml Puffer F für 15 Minuten, 3x mit 4ml Puffer F für 5 Minuten und 2x mit 3ml Puffer G für 5 Minuten unter kontinuierlicher Bewegung).

Die Chemolumineszenz-Reaktion erfolgte durch Dephosphorylierung von CDP-Star (Substrat) für 2-5 Minuten unter kontinuierlicher Bewegung. Die Chemolumineszenz wurde durch Belichtungen von 2, 3 und 5 Minuten auf einem Röntgenfilm dargestellt.

Denaturieren / Prä-Hybridisierung / Hybridisierung / Waschen / Detektion

Das Denaturieren der cDNA erfolgte erst nach erfolgreich abgeschlossener Kontrolle der cDNA-Synthese.

Zu jedem cDNA-Ansatz wurden 2µl Puffer D (Superarray) gegeben und für 20 Minuten bei 68°C inkubiert. Hiernach wurden 25µl Puffer E (Superarray) hinzu gegeben und weitere 10 Minuten bei 68°C inkubiert. Die denaturierte cDNA wurde im Eisblock gekühlt.

Die Lachs-Sperma-DNA (27,5µl/Array, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde durch 5-minütiges Kochen denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt.

In der Prä-Hybridisierung wurden zu jedem Array 2ml GEAhyp-Lösung gegeben, welcher zuvor 20µl denaturierter Lachs-Sperma-DNA zugefügt wurde. Die Prä-Hybridisierung erfolgte bei 62°C für 2 Stunden im Hybridisierungs-Ofen.

In der nachfolgenden Hybridisierung wurden 7,5µl denaturierte Lachs-Sperma-DNA mit der denaturierten cDNA vermischt und auf Eis gekühlt. Je Array wurden 750µl vorgewärmte GEAhyp-Lösung (62°C) zum Gemisch aus cDNA und Lachs-Sperma-DNA gegeben. Die GEA-Prä-Hybridisierungs-Lösung wurde durch die GEA-Hybridisierungs-Lösung ersetzt.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 62°C im Hybridisierungs-Ofen unter kontinuierlicher Bewegung. Hiernach wurde die GEA-Hybridisierungs-Lösungen von den Membranen entfernt und für etwaige spätere Hybridisierungen bei -20°C eingefroren. Jede Membran wurde zweimal mit 5ml 2x SSC und 1% SDS sowie zweimal mit 5ml 0,1x SSC und 0,5% SDS für 15 Minuten bei 62°C im Hybridisierungs-Ofen gewaschen. Die Detektion erfolgte wie bei der Kontrolle der cDNA-Synthese.

Auswertung

Die Röntgenfilme wurden in einem Scanner mit Durchlichteinheit als Graustufen-Bild einer Farbtiefe von 16 Bit und einer Auflösung von 600px/inch eingescannt.

Die vorliegenden Bilddateien wurden auf einen externen Server der SuperArray Bioscience Corporation eingeladen und konnten via Internet mit der GEArray Expression Analysis Suite (Superarray Bioscience Corp., Frederick, USA) ausgewertet werden. Hier besteht die Möglichkeit, die einzelnen Arrays zu verschiedenen Gruppen zusammenzustellen und hinsichtlich ihrer Genexpression miteinander zu vergleichen. Um einzelne Arrays miteinander vergleichen zu können, wurden alle Arrays mit der Expression der aufgetragenen Haushaltsgene normalisiert. Die Hintergrundkorrektur erfolgte über den *Local Background* und in einer weiteren Berechnung über *Empty Spots*. Bei der Korrektur über den *Local Background* erfolgte für jeden Tetraspot der Abgleich mit der ihm umgebenden Hintergrundschwärzung. Im Falle *Empty spot* wurde die Korrektur über den Abgleich mit Positionen ohne cDNA-Fragmente erreicht. (Für Berechnungen mit der Auswahl *Empty Spot* wurde GAPDH und für Berechnungen mit der Auswahl *Local Background* wurden ACTB und GAPDH zur Normalisierung ausgewählt.) Ein Gen wurde als exprimiert gewertet, wenn die Intensität des Spots über 5% des errechneten Gesamtmittels aller Spots lag. Weitere Datensatzparameter wie *Density (Average)*, *Adjust to a Common mean (100)* und *Clover (off)* dienten der Normalisierung mehrerer Arrays zueinander. Anhand dieser Datensatzparameter wurden die einzelnen Arrays beziehungsweise die Arraygruppen miteinander verglichen. Expressionen wurden ab einem Faktor 2,5 als unterschiedlich angenommen. Die ermittelten Vergleichsdaten wurden in Excel-Dateien exportiert und tabellarisch gegenübergestellt.

Die Resultate einiger Gene (APEX1, BBC3, CDC2, CDKN1A, GADD45A, HIF1A, HIPK2, MAP4, MDM2, SP1, TEAD1) wurden mittels qRT-PCR kontrolliert.

5. Ergebnis

5.1. Immunhistochemie

Das p53-Protein weist in normalen, adulten Zellen eine Halbwertszeit von weniger als 35 Minuten auf, so dass es sich im Allgemeinen einer immunhistochemischen Darstellung entzieht. In zahlreichen Untersuchungen konnte jedoch eine Akkumulation des p53-Proteins in Melanomen sowie in etablierten Zelllinien nachgewiesen werden. Akkumuliertes p53-Protein in Malignomen impliziert eine funktionelle Störung der Integrität des p53-Signalwegs. Diese Beobachtungen stellten den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar.

Alle Tumorzelllinien sowie die nativen Melanozyten wurden hinsichtlich der p53-Expression immunhistochemisch untersucht. Als Anti-p53-Antikörper wurde DO-7 eingesetzt. Die Antikörperreaktion wurde mit dem Chromogen DAB sichtbar gemacht. Die p53-Expression wurde in drei Kategorien unterteilt. Es wurde zwischen <40%, 40-70% und >70% angefärbter Zellen pro Präparat unterschieden.

Neben immunhistochemischen Untersuchungen unbehandelter Zellen wurde die gleiche Versuchsreihe auch nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin, einem potenten Induktor der p53-abhängigen Apoptose, durchgeführt.

DO-7 Färbungen mit und ohne Cisplatin-Behandlung

Ein einheitliches Färbungsmuster von nativen Melanozyten und Tumorzelllinien ließ sich nicht nachweisen.

Ohne vorangegangene Induktion konnte in nativen Melanozyten kein p53-Protein detektiert werden (Abb. 10a). Dagegen konnte in vier von sechs Tumorzelllinien (67%) p53 nachgewiesen werden, dabei in drei von vier Fällen (75%) im Zytoplasma (Abb. 10c, g, i, k).

Bei den p53-mutierten Zelllinien SK-Mel 1 und SK-Mel 3 war eine p53-Akkumulation im Zytoplasma zu beobachten (Abb. 10i, k). Bei der Zelllinie IGR-37, die eine Mutation trägt, die zu einer Leserasterverschiebung führt, konnte dagegen kein p53 Protein nachgewiesen werden (Abb. 10m).

Zwei der drei Wildtyp-p53-Tumorzelllinien exprimierten p53 ebenfalls konstitutiv. Bei COLO-849 war die p53-Akkumulation nukleär, bei SK-Mel 30 zytoplasmatisch (Abb. 10g, c). Für Mel-JUSO ließ sich kein p53-Protein nachweisen (Abb. 10e).

Nach Gabe von Cisplatin zeigten die meisten der untersuchten Zelllinien eine deutliche immunhistochemische Veränderung in Bezug auf die Lokalisation und/oder auf die Expressionsstärke von p53. So konnte bei Melanozyten sowohl nukleäres, als auch zytoplasmatisches p53-Protein, in den Melanomzelllinien SK-Mel 3, SK-Mel 30, Mel-JUSO und COLO-849 nukleäres p53-Protein nachgewiesen werden (Abb. 10b, d, f, h, l). Zusätzlich zeigte COLO-849 als einzige Melanomzelllinie eine Cisplatin-bedingte Zunahme der zytoplasmatischen p53-Expression (Abb. 10h). Bei IGR-37 ließ sich auch nach Induktion durch Cisplatin kein p53 Protein anfärben (Abb. 10n). SK-Mel 1 zeigte unter Cisplatin-Gabe keine Veränderung (Abb. 10j).

Insgesamt zeigten nach Gabe von Cisplatin alle Wildtyp-p53-Zelllinien eine höhere p53-Expression als in der unbehandelten Form. Hierbei färbte sich nukleäres und, mit Ausnahme von Mel-JUSO, zytoplasmatisches p53. SK-Mel 30, die unbehandelt bereits eine zytoplasmatische p53-Akkumulation aufwies, zeigte zusätzlich eine nukleäre p53-Expression nach Cisplatin-Gabe. Umgekehrt verhielt sich COLO-849, bei der nach Induktion ausschließlich zytoplasmatisches p53 nachgewiesen werden konnte.

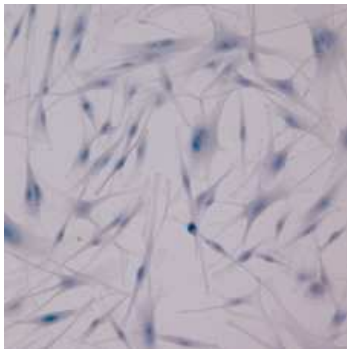


Abb. 10a Melanozyten

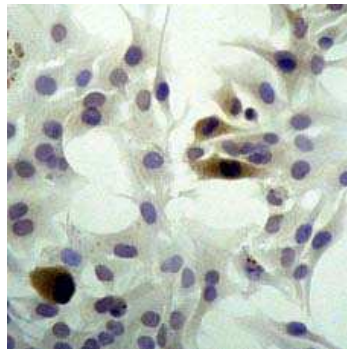


Abb. 10c SK-Mel 30

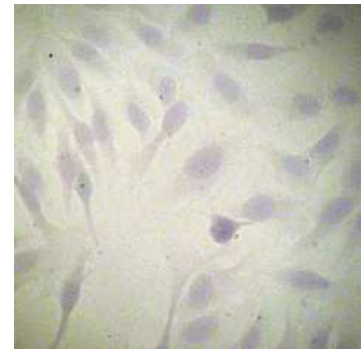


Abb. 10e Mel-JUSO

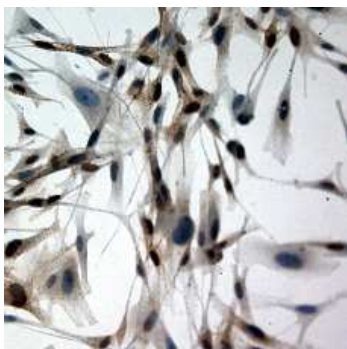


Abb. 10b Melanozyten Cis

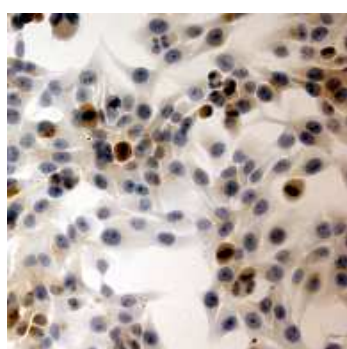


Abb. 10d SK-Mel 30 Cis



Abb. 10f Mel-JUSO Cis

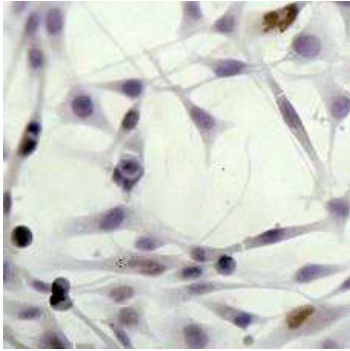


Abb. 10g COLO-849

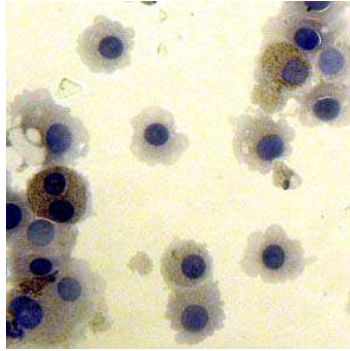


Abb. 10i SK-Mel 1

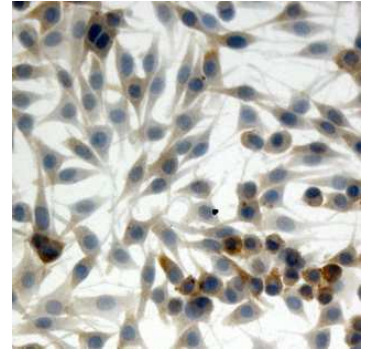


Abb. 10k SK-Mel 3

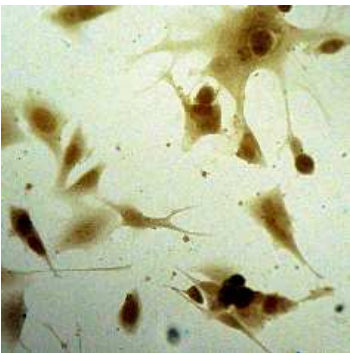


Abb. 10h COLO-849 Cis

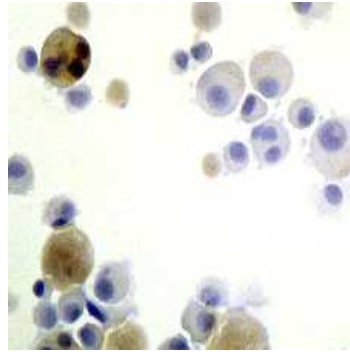


Abb. 10j SK-Mel 1 Cis

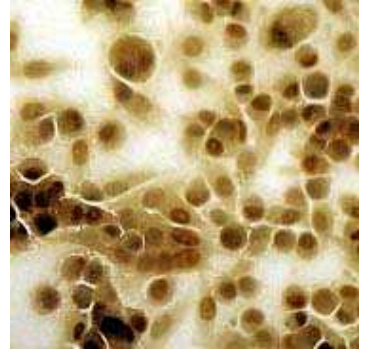


Abb. 10l SK-Mel 3 Cis



Abb. 10m IGR-37



Abb. 10n IGR-37 Cis

Abb. 10a-n Immunhistochemischer p53-Nachweis mit DO-7, vor und nach 24h Inkubation mit Cisplatin (Cis)

Tabelle 07 listet Zellkompartiment und Ausprägung der p53-Akkumulationen auf.

Zelllinie	P53-Status	unbehandelt		nach Cisplatin	
		Nukleus	Zytoplasma	Nukleus	Zytoplasma
Melanozyten	WT	/	/	++	++
SK-Mel 30	WT	/	+	+	+
Mel-JUSO	WT	/	/	+++	/
COLO-849	WT	+	/	++	++
SK-Mel 1	Mut	/	+	/	+
SK-Mel 3	Mut	/	++	+++	++
IGR-37	Mut	/	/	/	/

Tabelle 07 Immunhistochemischer p53-Nachweis mit DO-7; >70% Expression: +++, 40-70% Expression: ++, < 40% Expression: +, fehlende Expression: /; Mut : Mutation, WT : Wildtyp

Zusammenfassend lässt sich für die immunhistochemischen Untersuchungen festhalten:

1. Primäre Melanozyten zeigen keine konstitutive p53-Protein Expression.
2. Bei Melanozyten akkumuliert p53 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nach Cisplatin-Gabe.
3. 2/3 der Melanom-Zelllinien zeigen bereits unstimuliert eine p53-Akkumulation.
4. Für Melanom-Zelllinien mit mutiertem p53 ist die Akkumulation meist im Zytoplasma zu beobachten.
5. Alle Wildtyp-p53 Melanom-Linien und 1/3 der Melanom-Linien mit mutiertem p53 zeigen immunhistochemisch Veränderungen der p53-Expression durch Cisplatin. Dies gilt sowohl für die Expressionsstärke als auch für die Lokalisation des p53 Proteins.
6. Unabhängig des Mutationsstatus der Melanom-Linie führt eine Induktion durch Cisplatin in 75% der Fälle zu einer nukleären p53-Anreicherung.

Beim malignen Melanom wurden Akkumulationen des p53-Proteins in bis zu 97% der untersuchten Melanome beobachtet. Während für viele solide Tumoren proteinstabilisierende p53-Mutationen nachgewiesen werden konnten, sind diese beim malignen Melanom eher selten. Die molekularen Ursachen, die zu einer stabilen p53-Proteinexpression führen, sind jedoch unklar. Zum einen kann eine erhöhte p53-Transkriptstabilität zu einer vermehrten Translation des Proteins führen, zum anderen kann der Abbau des p53-Proteins gestört sein. Beide Möglichkeiten wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

5.2. RNA-Stabilität

Zur Überprüfung der p53-Transkriptstabilität wurden alle Zelllinien mit Actinomycin D, einem Transkriptions- und Replikationshemmer, für 30, 60, 120 und 240 Minuten inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde die Gesamt-RNA isoliert und die p53-Transkriptmenge mittels qRT-PCR bestimmt. Bei einem stabilen Transkript sollte sich die Transkriptmenge nicht verändern. Sollte das Transkript dagegen schnell abgebaut werden, verringert sich die gemessene p53-mRNA-Quantität, da Actinomycin D eine erneute Transkription verhindert. Jedem Zeitwert wurde eine unbehandelte Kontrolle zugeordnet, d.h. K1: 30min, K2: 60min, K3: 120min und K4: 240min. Die p53-mRNA-Expression wurde über die konstitutiv exprimierte beta-2-Microglobulin-mRNA normalisiert und auf den Mittelwert der p53-Expression in den Kontrollproben bezogen. Die mittlere p53-Expression nach 30-minütiger Inkubation mit Actinomycin D wurde jeweils auf 1 gesetzt und die gemessenen Expressionswerte hierzu in Relation gesetzt.

Die Transkriptstabilität unbehandelter Zellen wurde exemplarisch an SK-Mel 1 und SK-Mel 30 untersucht. Für alle Linien wurde zudem die Versuchsreihe mit Zellen durchgeführt, die vor der Actinomycin D-Gabe für 24 Stunden mit 20µM Cisplatin vorinkubiert wurden.

Unabhängig vom p53-Mutationsstatus zeigten die nicht mit Cisplatin vorinkubierten Zelllinien SK-Mel 30 und SK-Mel 1 ein stabiles p53-Transkript über den hier beobachteten Zeitraum.

Nach 24-stündiger Inkubation mit Cisplatin konnte dies ebenfalls für die Linien COLO-849, SK-Mel 1, SK-Mel 30 beobachtet werden. Die primären Melanozyten zeigten ebenfalls keine Abnahme in der p53-Transkriptmenge während des Beobachtungszeitraums von 240min. Im Gegensatz dazu war bei den Linien SK-Mel 3, Mel-JUSO und IGR-37 eine signifikante Abnahme der p53-Transkriptmenge zu finden (Abb. 11).

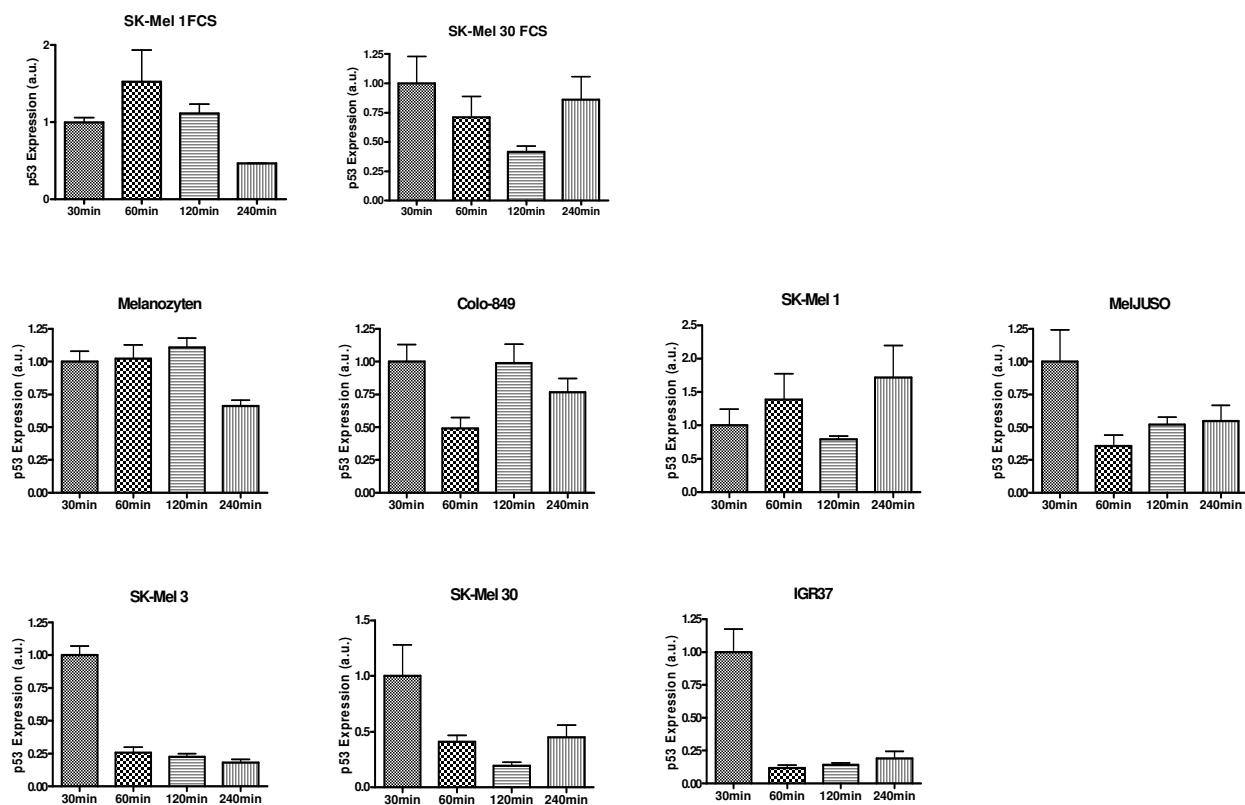


Abb. 11 qRT-PCR-Analysen zur p53-Transkriptstabilität. Die obere Diagrammzeile bildet FCS-inkubierte Zellen, die beiden weiteren Diagrammzeilen bilden Cisplatin-stimulierte Zellen ab. Alle Zellen wurden 30, 60, 120 und 240min mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D behandelt. Die p53mRNA-Expression wurde über beta-2-Microglobulin-mRNA normalisiert und auf den Mittelwert der zu jeder Zeiteinheit bestehenden, unbehandelten Kontrollen bezogen. Die mittlere p53-Expression nach 30min Actinomycin D Inkubation wurde gleich 1 gesetzt.

5.3. Proteinstabilität

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Proteinstabilität durchgeführt, um zu klären, ob eine aberrante p53-Akkumulation Folge einer erhöhten Proteininstabilität ist. Alle Zelllinien, ausgenommen IGR-37, die kein p53-Protein exprimiert, wurden untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinsynthese, für 15, 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Parallel zu jedem Zeitwert wurde eine unbehandelte Kontrolle bearbeitet. Um die Qualität und Quantität des eingesetzten Proteins zu prüfen, wurde die Expression des konstitutionell exprimierten Haushaltgens GAPDH bestimmt.

Die Experimente wurden mit unbehandelten Zellen (exemplarisch SK-Mel 30) sowie mit Zellen, die für 24 Stunden mit Cisplatin vorinkubiert wurden, durchgeführt.

Für alle untersuchten Bedingungen zeigten die Zelllinien keine signifikante Abnahme der p53-Expression, was ein stabiles p53-Protein sowohl konstitutionell, wie auch nach Induktion mit Cisplatin nahe legt (Abb. 12).

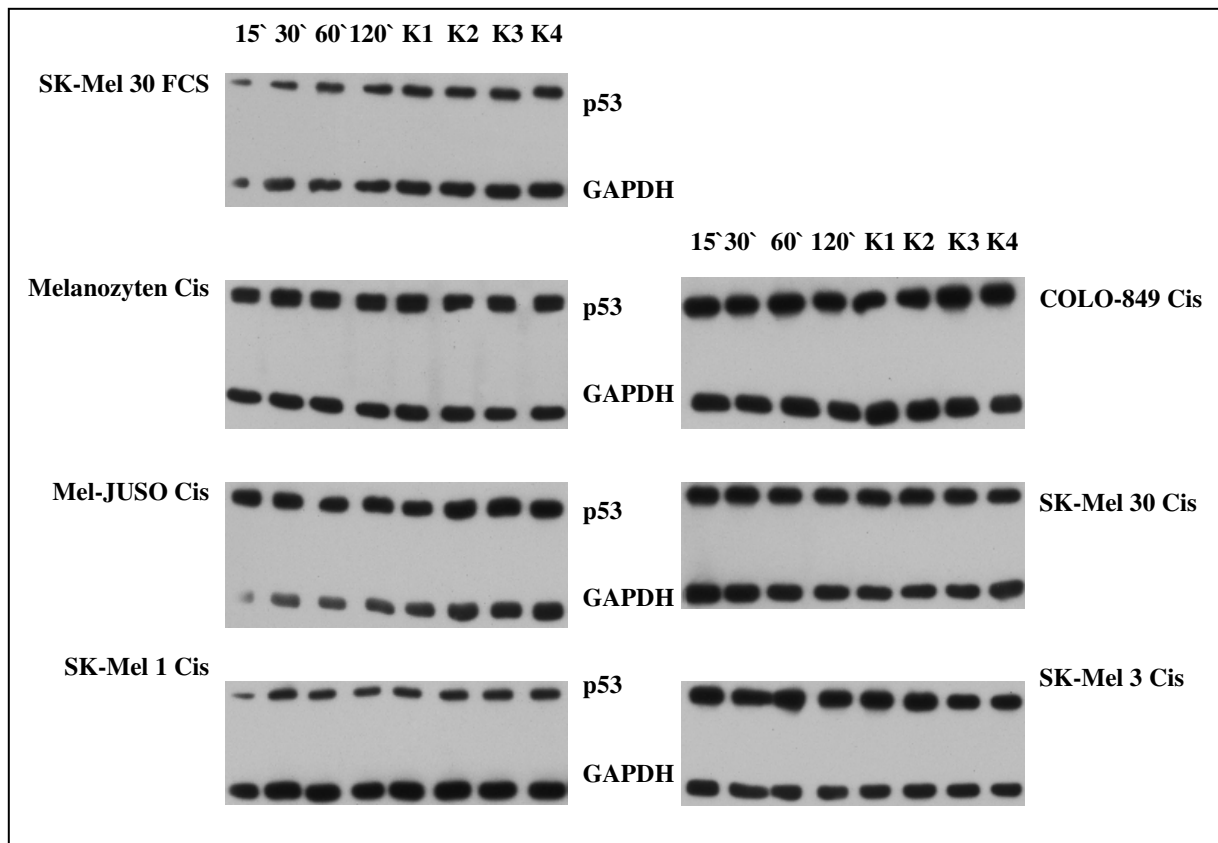


Abb. 12 Western-Blot-Analysen zur p53-Proteininstabilität, normalisiert über GAPDH. Cycloheximid-Inkubation für 15, 30, 60 und 120min. Jeder Probe steht eine unbehandelte Kontrolle gegenüber.

5.4. UV- und Chemoinduktion der p53 Proteinexpression

Demographische Untersuchungen beurteilen die UV-Strahlung als wichtigsten exogenen Faktor in der Karzinogenese des malignen Melanoms, wenngleich die genaue Pathogenese unbekannt ist.

Der Effekt von UV-B- bzw. UV-C-Bestrahlung auf die p53-Proteinexpression der Melanozyten und der einzelnen Tumorzelllinien wurde in Western-Blots analysiert. Unbehandelte Kontrollen wurden mit UV-B- bzw. -C-bestrahlten Zellen verglichen. Neben Untersuchungen der Photoinduktion, wurde die p53-Proteinexpression nach Gabe von Chemotherapeutika überprüft. Mit Cisplatin wurde ein potenter Induktor der Apoptose eingesetzt. Ferner wurde die Wirkung von Dacarbazin, dem Standard-Chemotherapeutikum in der Behandlung des malignen Melanoms, untersucht.

Übereinstimmend mit den bereits durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine hohe konstitutive p53-Expression für SK-Mel 3 und SK-Mel 30. Primäre Melanozyten sowie Mel-JUSO, SK-Mel 1 und COLO-849 exprimierten niedrigere p53-Level. IGR-37 zeigte unter keiner Bedingung eine p53-Proteinexpression.

Eine Bestrahlung mit UV-B bzw. UV-C führte zu einem Anstieg der p53-Proteinkonzentration für COLO-849, Mel-JUSO, SK-Mel 30 und SK-Mel 1. Die p53-Induktion scheint für UV-B geringfügig höher zu sein als für UV-C. Entgegengesetzt dazu verhielten sich die Melanozyten. Hier nahm die p53-Expression unter UV-Strahlung ab, für UV-B stärker als für UV-C-Strahlung.

Unabhängig vom p53-Mutationsstatus ließ sich in allen p53-exprimierenden Zelllinien nach 24-stündiger Cisplatin-Gabe eine erhöhte p53-Proteinkonzentration nachweisen. Von allen eingesetzten Konditionen war Cisplatin der stärkste p53-Induktor. Dagegen zeigte keine der etablierten Tumorzelllinien eine veränderte p53-Expression gegenüber den Kontrollen unter Behandlung mit Dacarbazin (Abb. 13). Interessanterweise war die p53-Proteinkonzentration nach Dacarbazin-Gabe in primären Melanozyten beträchtlich vermindert.

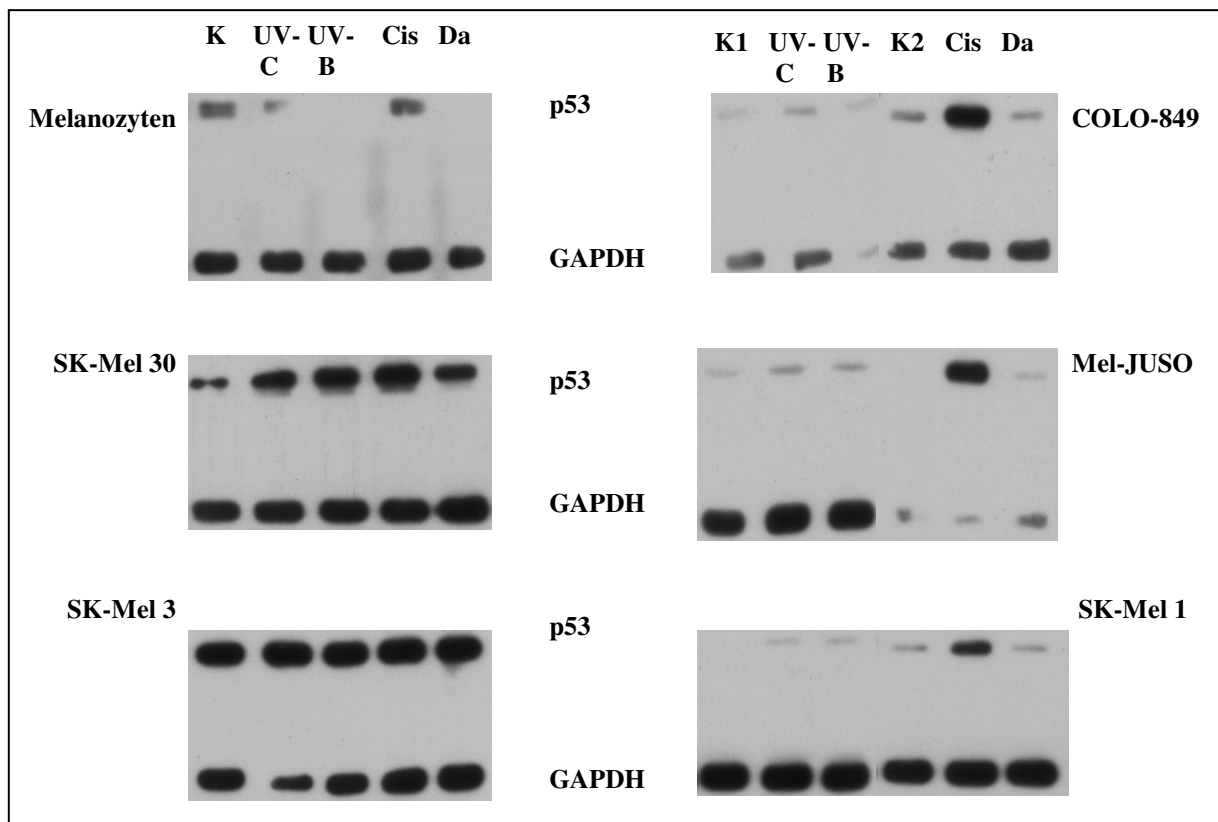


Abb. 13 Western-Blots: UV- und Chemoinduktion von p53, normalisiert über GAPDH. K:Kontrolle; Cis: Cisplatin; Da: Dacarbazin.

5.5. Expression und Regulation von Genen des p53-Signalwegs

Die vorangegangenen Untersuchungen zur UV- und Chemoinduktion legen eine p53-Induzierbarkeit für die meisten der hier untersuchten Melanomlinien sowie für primäre Melanozyten nahe. Dabei war die p53-Induktion nach Cisplatin-Behandlung am eindrucksvollsten. Einhergehend mit einer erhöhten p53-Proteinstabilität ist für normale Zellen auch eine erhöhte Aktivität von p53 zu beobachten und damit die vermehrte Expression p53-abhängiger Gene. Um die Regulation des p53-Signalwegs zu beurteilen, wurden Makro-Array-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde die aus Zellen gewonnene RNA mittels reverser Transkription in eine Biotin-markierte cDNA überführt. Die cDNA wurde an aufgespottete, genspezifische cDNA-Fragmente hybridisiert und die entstandenen Signale auf einem Chemilumineszenz-sensitiven Film festgehalten. Nach Einscannen mit einem Durchlichtscanner wurden die Signale densitometrisch ausgewertet. Analog zu den Untersuchungen der UV- und Chemoinduktion der p53-Proteinexpression wurde auch in den Makro-Array-Analysen UV-B- und -C-Bestrahlung sowie die Gabe von Cisplatin bzw. Dacarbazin als Versuchsbedingungen gewählt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Die Ergebnisse der Arrays wurden anschließend einzeln, d.h. die Expressionsunterschiede unbehandelter Zellen zu behandelten Zellen einer Zelllinie sowie in unterschiedlichen Gruppen (p53 Wildtyp vs. p53 Mutanten, Melanome vs. Melanozyten etc.) miteinander verglichen. Eine differentielle Expression wurde ab einem Faktor 2,5 als hinreichend unterschiedlich angenommen. Für elf Gene wurden die Ergebnisse in qRT-PCR Untersuchungen validiert (APEX1, BBC3, CDC2, CDKN1A, GADD45, HIF1A, HIPK2, MAP4, MDM2, SP1 und TEAD).

Insgesamt umfasst der hier eingesetzte Makro-Array 90 verschiedene Gene, die auf unterschiedliche Art und Weise in den p53-Signalweg eingreifen. Es wurden Gene untersucht, die p53-abhängig induziert werden oder deren Genprodukte p53 modifizieren oder mit p53 interagieren. Viele der entsprechenden Proteine sind an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose oder der DNA-Reparatur beteiligt.

Zur besseren Übersicht wurde in den nachfolgenden Fließtexten hauptsächlich die Genexpression der in der qRT-PCR validierten Gene näher beschrieben. Im Anhang befindet sich eine Übersichtstabelle, die alle auf dem Array gespotteten Gene in der relativen Expression zur jeweiligen Kontrolle auflistet. Die Gene sind entsprechend ihrer funktionellen Zugehörigkeit zum p53-Signalweg gruppiert (9. Anhang).

5.6. Genregulation der einzelnen Zelllinien

Primäre Melanozyten und Melanom-Linien, die p53-Wildtyp exprimieren:

Melanozyten

In Makro-Array-Untersuchungen war die Regulation der 11 Gene, die durch qRT-PCR-Analysen validiert wurden, gering ausgeprägt. Nach UV-Bestrahlung beider Wellenlängen wurde SP1 abreguliert. Auch nach Behandlung mit Cisplatin bzw. Dacarbazin kam es zu verminderten Expressionen von SP1. Diese Regulation wurden in qRT-PCR-Untersuchungen bestätigt (Abb. 14, 15, Tab. 8).

Die Behandlung mit Cisplatin hatte den stärksten Einfluss auf die Genregulation. Neben SP1 wurden HIPK2, MAP4, MDM2 und TEAD1 vermindert exprimiert. Verstärkt exprimierte Gene infolge von Cisplatin-Gabe konnten in den Makro-Array-Untersuchungen nicht ermittelt werden. Dieses Expressionsmuster wurde in der qRT-PCR bestätigt. In der qRT-PCR konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass GADD45A infolge von Cisplatin-Gabe vermehrt und CDKN1A vermindert exprimiert wurden. In der Summe überwog in beiden Analyseverfahren die Zahl abregulierter Gene deutlich.

Während in den Makro-Array-Untersuchungen nur SP1 eine Regulation infolge von Dacarbazin-Gabe zeigte, kam es in der qRT-PCR zusätzlich zur verminderten Expression von CDC2, CDKN1A, MAP4 und MDM2. Aufregulierte Gene konnten auch in der qRT-PCR nicht ermittelt werden.

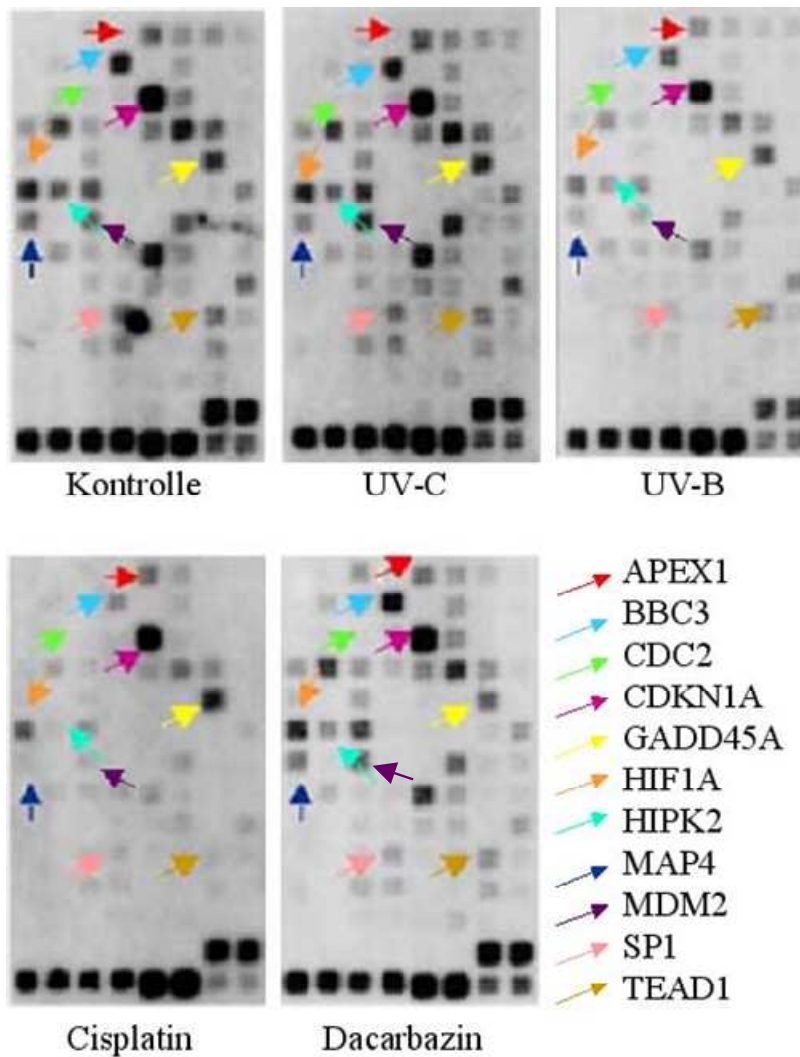


Abb. 14 Makro-Arrays: Genexpression bei Melanozyten nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie.

Melanozyten	<i>nach UV-C</i>	<i>nach UV-B</i>	<i>nach Cisplatin</i>	<i>nach Dacarbazin</i>
<i>APEX1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>BBC3</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>CDC2</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>CDKN1A</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>GADD45A</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>HIF1A</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>HIPK2</i>	n.r.	n.r.	0,26	n.r.
<i>MAP4</i>	n.r.	n.r.	0,40	n.r.
<i>MDM2</i>	n.r.	n.r.	0,32	n.r.
<i>SP1</i>	0,38	0,18	0,36	0,23
<i>TEAD1</i>	n.r.	n.r.	0,32	n.r.

Tab. 08 Makro-Array-Analyse: Relative Genexpression bei Melanozyten nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. n.r.: nicht reguliert.

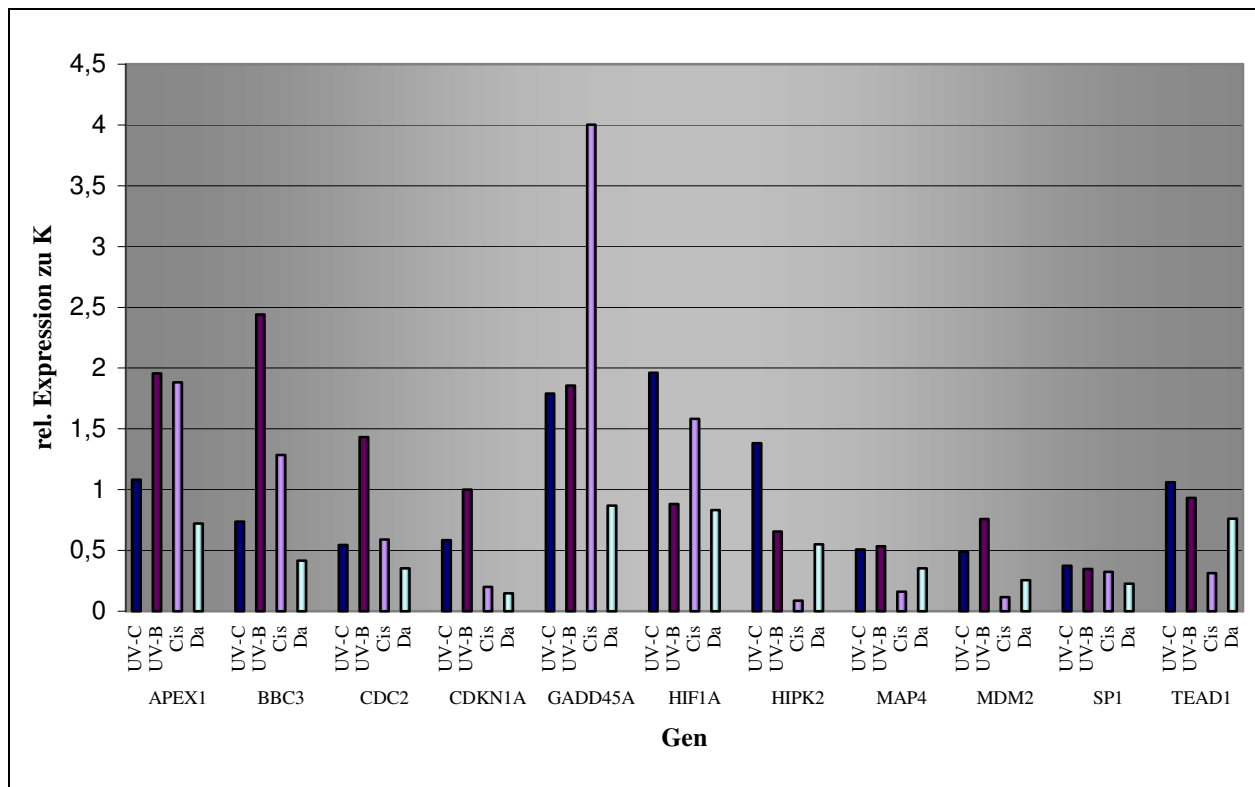


Abb. 15 qRT-PCR: Relative Genexpression nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie bei Melanozyten. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. Die unbehandelten Kontrollzellen sind nicht abgebildet. Cis: Cisplatin; Da: Dacarbazin.

SK-Mel 30

SK-Mel 30 zeigte in den Makro-Arrays keine signifikante Genregulation infolge von Bestrahlung. Demgegenüber konnte in der qRT-PCR nachgewiesen werden, dass MAP4 und TEAD1 UV-B-bedingt aufreguliert waren. Nach UV-C-Bestrahlung konnte auch in der qRT-PCR keine signifikante Genregulation ermittelt werden. Wie bereits bei den Melanozyten erfolgte die umfangreichste Genregulation nach Gabe von Cisplatin. In den Makro-Arrays waren CDKN1A und GADD45A aufreguliert, während wie bereits bei den Melanozyten HIPK2 und MAP4 vermindert exprimiert wurden. Zudem kam es bei SK-Mel 30 zu einer verminderten Expression von BBC3. In der qRT-PCR konnte die Regulation von CDKN1A, GADD45A, HIPK2 und MAP4 bestätigt werden. Die in Makro-Arrays beobachtete Minderexpression von BBC3 konnte in der qRT-PCR nicht bestätigt werden.

In den Makro-Array-Untersuchungen war nach Gabe von Dacarbazin, wie bereits nach Cisplatin-Gabe BBC3 abreguliert, nach Dacarbazin-Gabe zusätzlich CDC2, während GADD45A verstärkt exprimiert wurde. Entgegen der Makro-Array-Untersuchungen war in der qRT-PCR BBC3 Dacarbazin-bedingt aufreguliert und CDC2 unterlag keiner Regulation.

Die Regulation von GADD45A entsprach jener der Makro-Arrays. Darüber hinaus wurde in der qRT-PCR eine vermehrte Expression von CDKN1A bestimmt (Abb. 16, 17, Tab. 09).

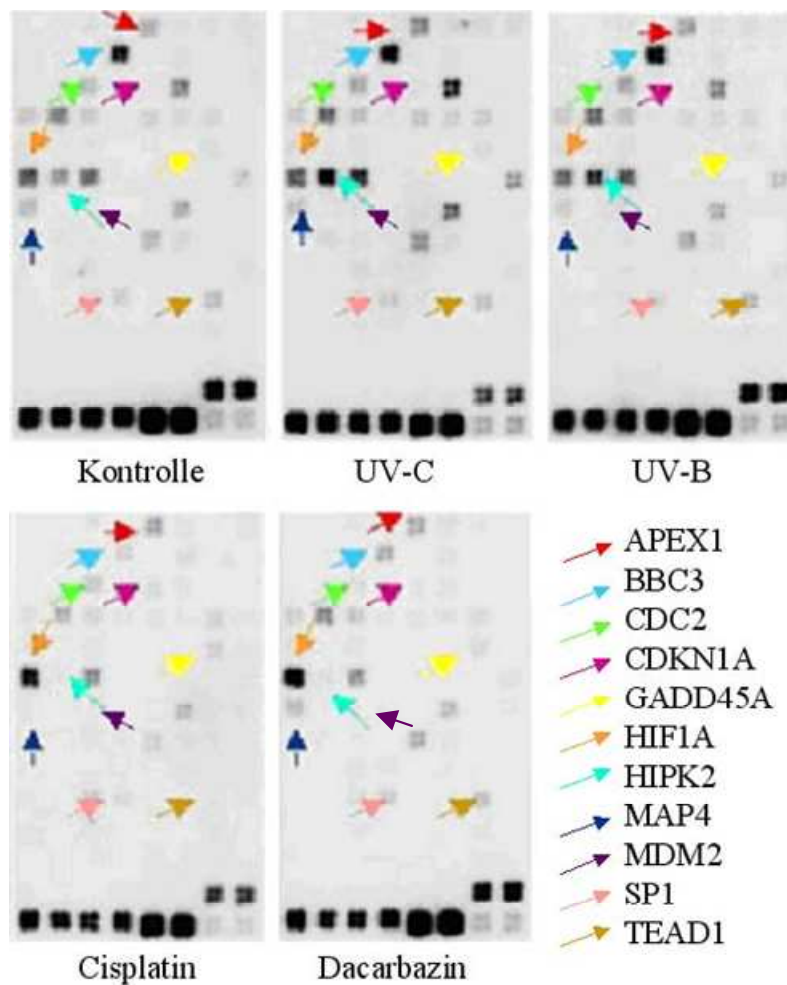


Abb. 16 Makro-Arrays: Genexpression bei SK-Mel 30 nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie.

SK-Mel 30	<i>nach UV-C</i>	<i>nach UV-B</i>	<i>nach Cisplatin</i>	<i>nach Dacarbazin</i>
<i>APEX1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>BBC3</i>	n.r.	n.r.	0,13	0,29
<i>CDC2</i>	n.r.	n.r.	n.r.	0,27
<i>CDKN1A</i>	n.r.	n.r.	5,57	n.r.
<i>GADD45A</i>	n.r.	n.r.	3,31	2,99
<i>HIF1A</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>HIPK2</i>	n.r.	n.r.	0,04	n.r.
<i>MAP4</i>	n.r.	n.r.	0,07	n.r.
<i>MDM2</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>SP1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>TEAD1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

Tab. 09 Makro-Array-Analyse: Relative Genexpression bei SK-Mel 30 nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. n.r.: nicht reguliert.

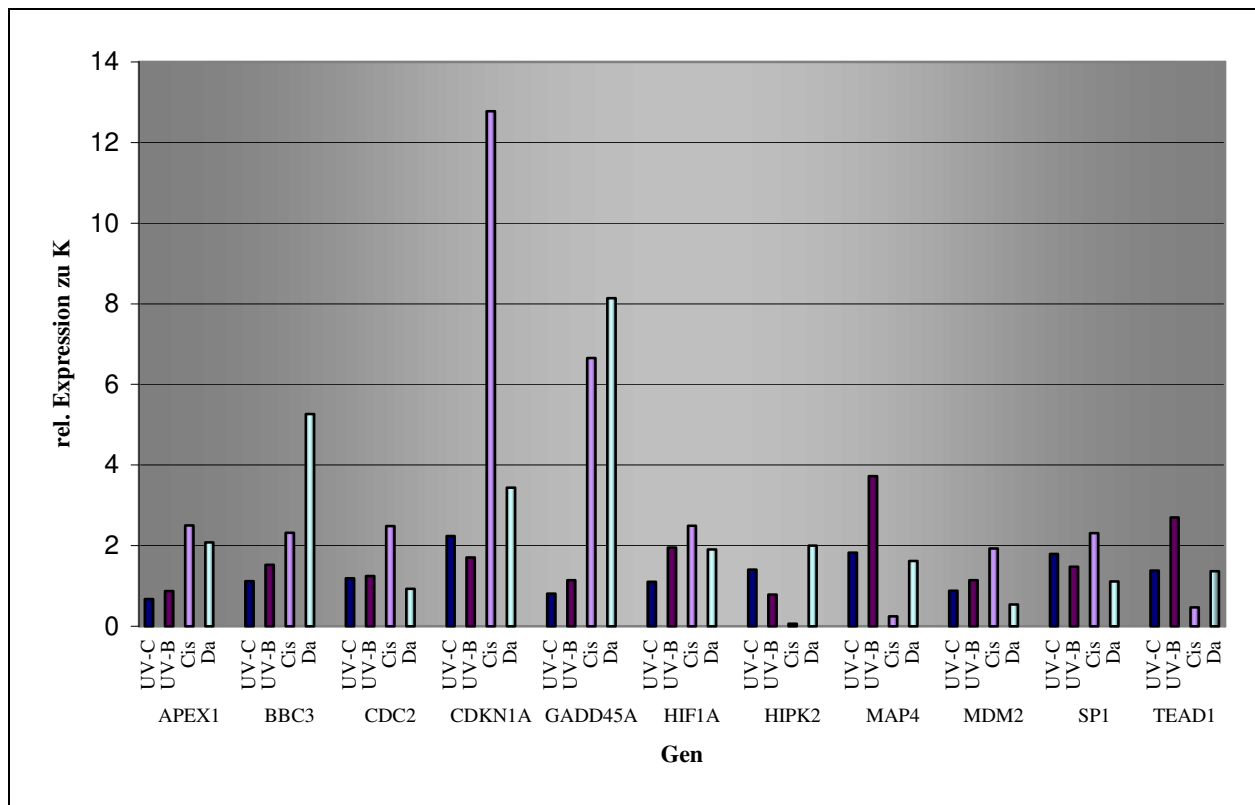


Abb. 17 qRT-PCR: Relative Genexpression nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie bei SK-Mel 30. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. Die unbehandelten Kontrollzellen sind nicht abgebildet. Cis: Cisplatin; Da: Dacarbazin.

COLO-849

Bei COLO-849 wurde nach Bestrahlung beider Wellenlängen CDC2 vermehrt exprimiert (Makro-Arrays). Dieses Ergebnis wurde durch qRT-PCR Untersuchungen bestätigt. Zusätzlich war APEX1 nach UV-C-Bestrahlung stärker exprimiert.

Wie bei Melanozyten und SK-Mel 30 waren auch bei COLO-849 sowohl in Makro-Arrays als auch in der qRT-PCR CDKN1A und GADD45A nach Cisplatin-Gabe verstärkt, MAP4 und TEAD1 vermindert exprimiert. Zudem konnte auch für MDM2 in beiden Experimenten eine vermehrte Expression nachgewiesen werden. Nach Gabe von Dacarbazin war in den Makro-Arrays GADD45A verstärkt exprimiert. In der qRT-PCR konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 18, 19, Tab. 10).

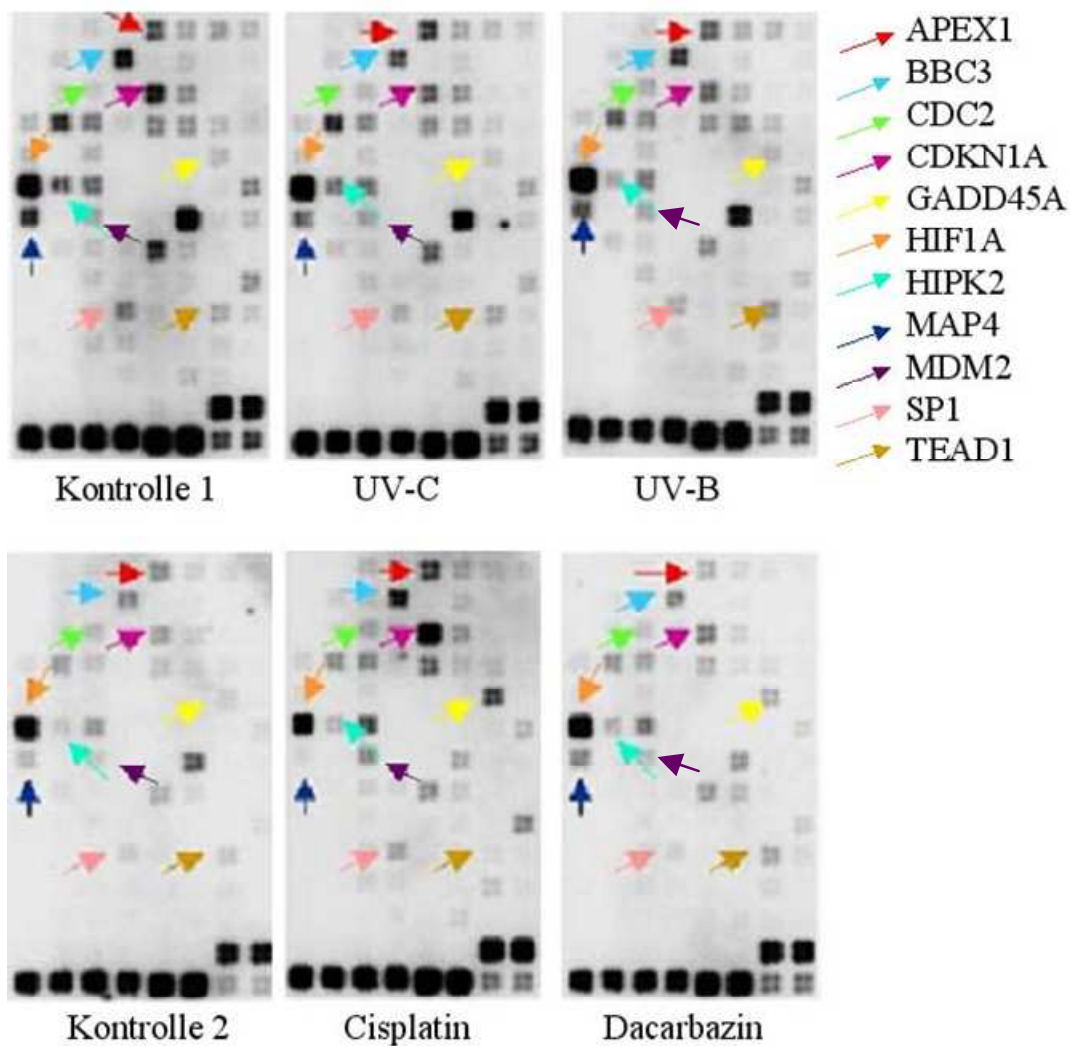


Abb. 18 Makro-Arrays: Genexpression bei COLO-849 nach Bestrahlung und Chemotherapie.

COLO-849	nach UV-C	nach UV-B	nach Cisplatin	nach Dacarbazin
<i>APEX1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>BBC3</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>CDC2</i>	3,51	4,01	n.r.	n.r.
<i>CDKN1A</i>	n.r.	n.r.	4,05	n.r.
<i>GADD45A</i>	n.r.	n.r.	7,13	3,66
<i>HIF1A</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>HIPK2</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>MAP4</i>	n.r.	n.r.	0,07	n.r.
<i>MDM2</i>	n.r.	n.r.	3,49	n.r.
<i>SP1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>TEAD1</i>	n.r.	n.r.	0,24	n.r.

Tab. 10 Makro-Array-Analyse: Relative Genexpression bei COLO-849 nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. n.r.: nicht reguliert.

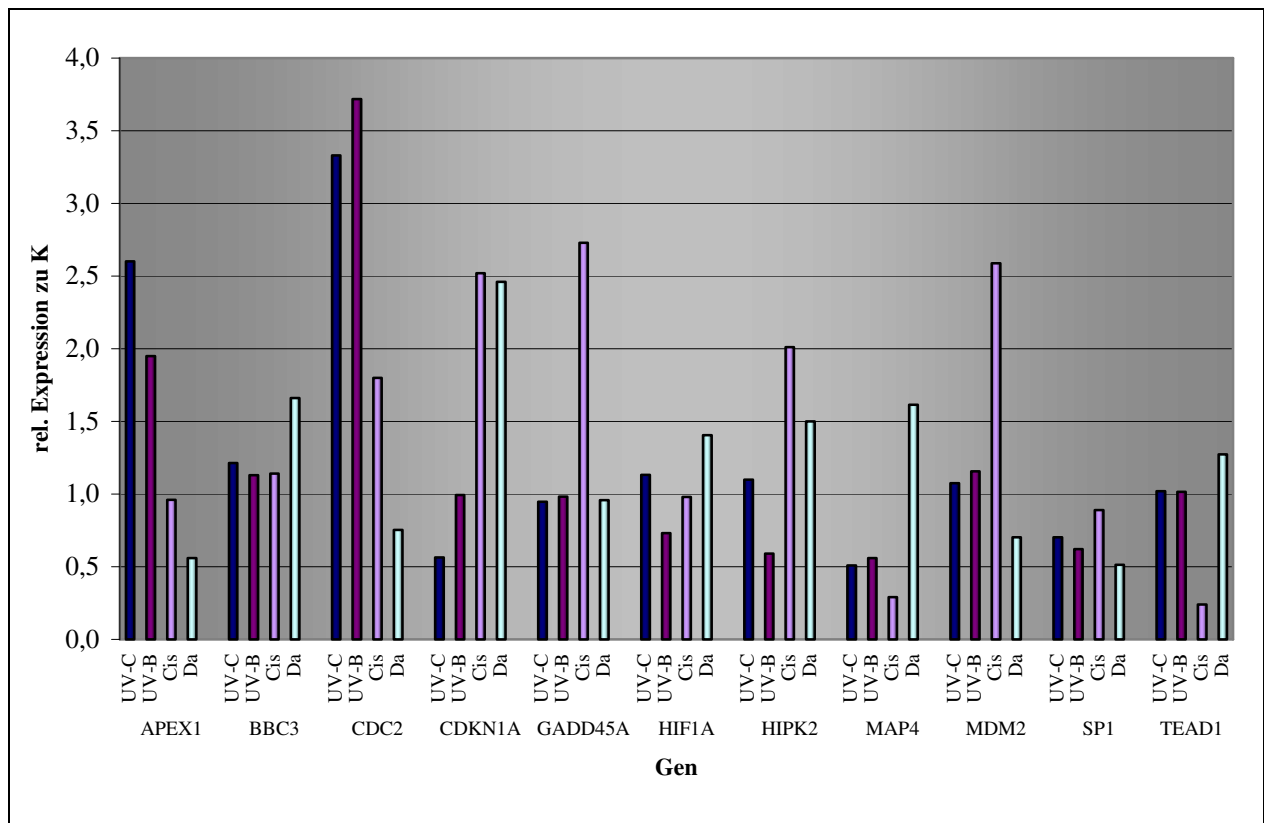


Abb. 19 qRT-PCR: Relative Genexpression nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie bei COLO-849. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. Die unbehandelten Kontrollzellen sind nicht abgebildet. Cis: Cisplatin; Da: Dacarbazin.

Mel-JUSO

Für Mel-JUSO konnten in den Makro-Array-Untersuchungen und qRT-PCR keine Gene ermittelt werden, die infolge Bestrahlung einer Regulation unterlagen.

Nach Gabe von Cisplatin waren APEX1, CDKN1A und GADD45A verstärkt, HIPK2, MAP4 und TEAD1 vermindert exprimiert (Makro-Arrays). Diese Regulation wurde in der qRT-PCR bestätigt. In der qRT-PCR war MDM2 verstärkt exprimiert. Eine Mehrexpression von BBC3 infolge von Cisplatin lag bei Wildtyp-Zelllinien nur bei Mel-JUSO vor.

Nach Dacarbazin-Gabe war in Makro-Arrays ausschließlich CDKN1A verstärkt exprimiert, was in der qRT-PCR jedoch nicht bestätigt werden konnte (Abb. 20, 21, Tab. 11).

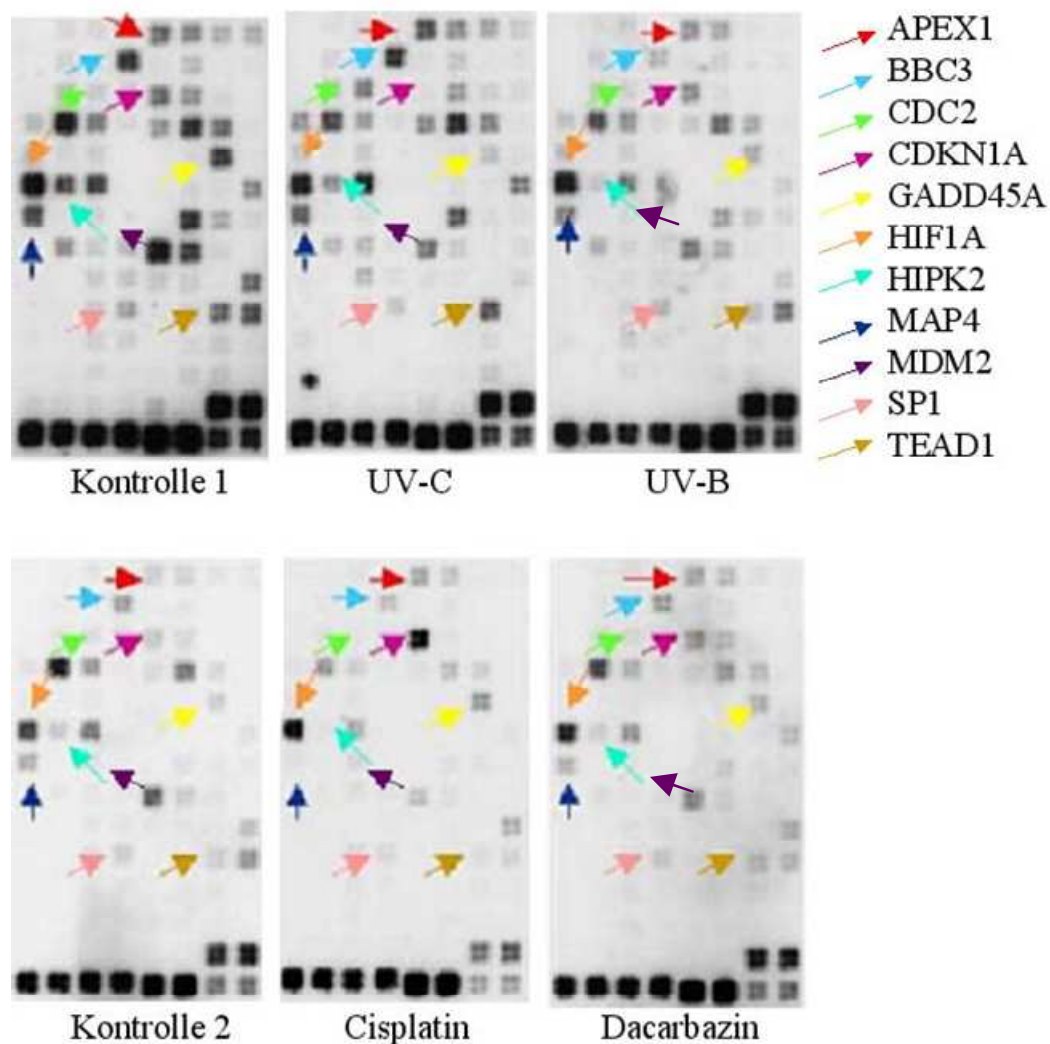


Abb. 20 Makro-Arrays: Genexpression bei Mel-JUSO nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie.

Mel-JUSO	nach UV-C	nach UV-B	nach Cisplatin	nach Dacarbazin
<i>APEX1</i>	n.r.	n.r.	3,93	n.r.
<i>BBC3</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>CDC2</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>CDKN1A</i>	n.r.	n.r.	9,32	3,27
<i>GADD45A</i>	n.r.	n.r.	4,04	n.r.
<i>HIF1A</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>HIPK2</i>	n.r.	n.r.	0,14	n.r.
<i>MAP4</i>	n.r.	n.r.	0,17	n.r.
<i>MDM2</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>SP1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>TEAD1</i>	n.r.	n.r.	0,19	n.r.

Tab. 11 Makro-Array-Analyse: Relative Genexpression bei Mel-JUSO nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. n.r.: nicht reguliert.

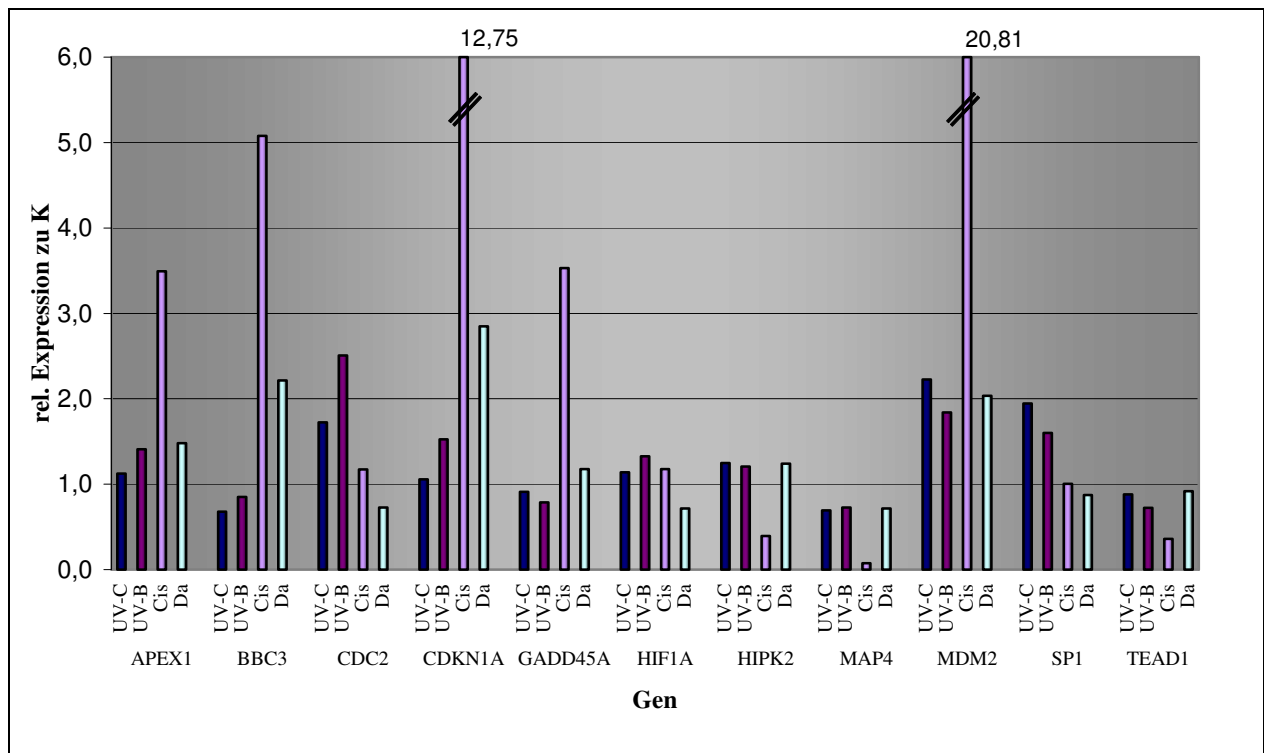


Abb. 21 qRT-PCR: Relative Genexpression nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie bei Mel-JUSO. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. Die unbehandelten Kontrollzellen sind nicht abgebildet. Cis: Cisplatin; Da: Dacarbazin.

Melanom-Linien, die eine p53-Mutation tragen

SK-Mel 1

In den Makro-Array-Untersuchungen war CDC2 nach Bestrahlung mit beiden Wellenlängen verstärkt exprimiert. Dies konnte in der qRT-PCR bestätigt werden.

Ferner waren in den Makro-Arrays GADD45A und HIF1A für beide Wellenlängen, HIPK2 nach UV-B-Bestrahlung vermindert exprimiert. Auch diese Resultate wurden durch die qRT-PCR verifiziert. Zusätzlich waren in der qRT-PCR APEX1 in beiden Wellenlängen, MAP4 und TEAD1 nach UV-B-Bestrahlung vermindert exprimiert. Demgegenüber waren CDKN1A, MDM2 und TEAD1 nach UV-C-Bestrahlung gering überexprimiert.

Wie bei oben beschriebenen Wildtyp-Zelllinien waren CDKN1A und GADD45A nach Gabe von Cisplatin auf-, TEAD1 abreguliert. Entsprechende Regulation konnte auch in der qRT-PCR nachgewiesen werden. MDM2 war in der qRT-PCR zudem schwach aufreguliert.

Nach Dacarbazin-Gabe waren in Makro-Arrays CDKN1A, GADD45A und HIF1A aufreguliert, in der qRT-PCR zusätzlich HIPK2 und MAP4 (Abb. 22, 23, Tab. 12).

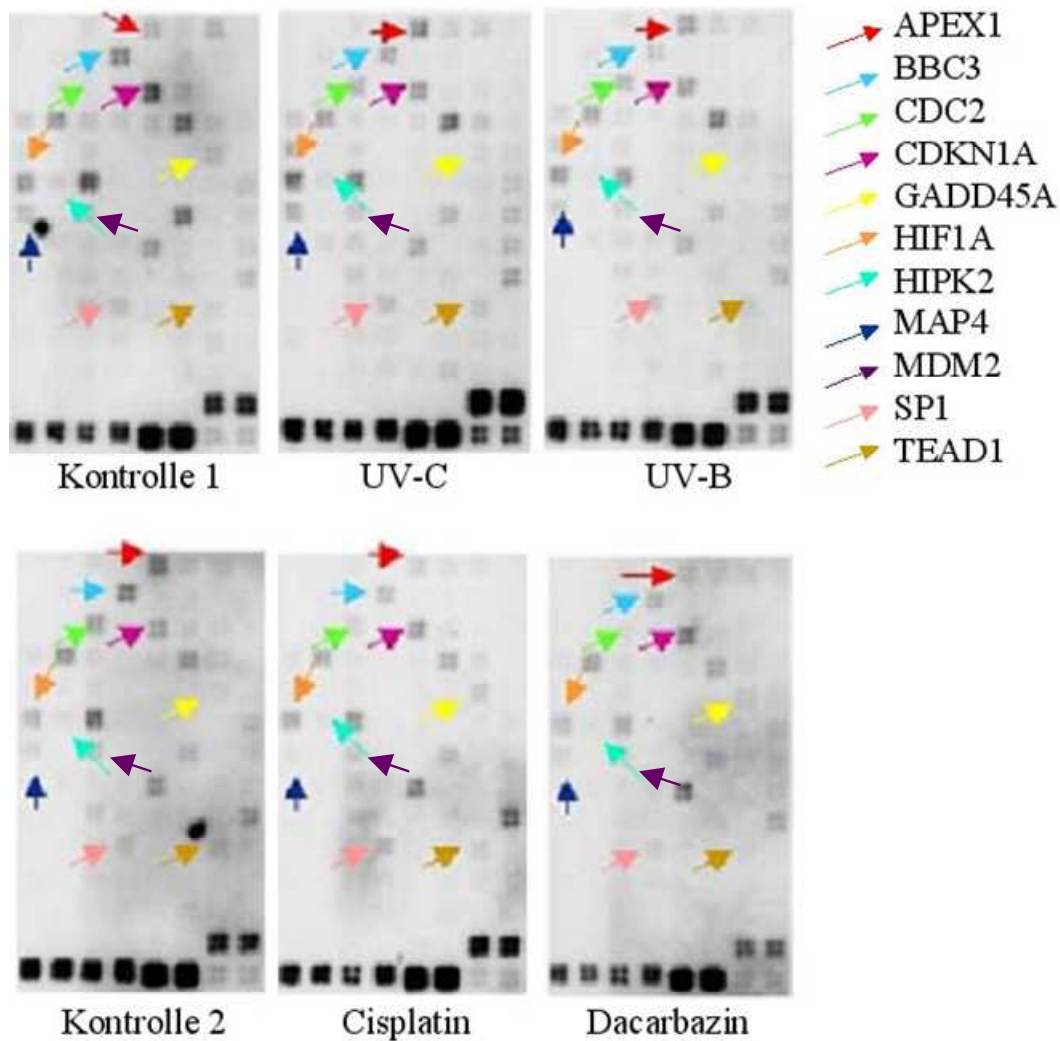


Abb. 22 Makro-Arrays: Genexpression bei SK-Mel 1 nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie.

SK-Mel 1	nach UV-C	nach UV-B	nach Cisplatin	nach Dacarbazin
<i>APEX1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>BBC3</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>CDC2</i>	17,37	14,41	n.r.	n.r.
<i>CDKN1A</i>	n.r.	n.r.	7,73	3,96
<i>GADD45A</i>	0,33	0,34	9,82	2,50
<i>HIF1A</i>	0,33	0,16	n.r.	5,07
<i>HIPK2</i>	n.r.	0,32	n.r.	n.r.
<i>MAP4</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>MDM2</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>SP1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>TEAD1</i>	n.r.	n.r.	0,4	n.r.

Tab. 12 Makro-Array-Analyse: Relative Genexpression bei SK-Mel 1 nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. n.r.: nicht reguliert.

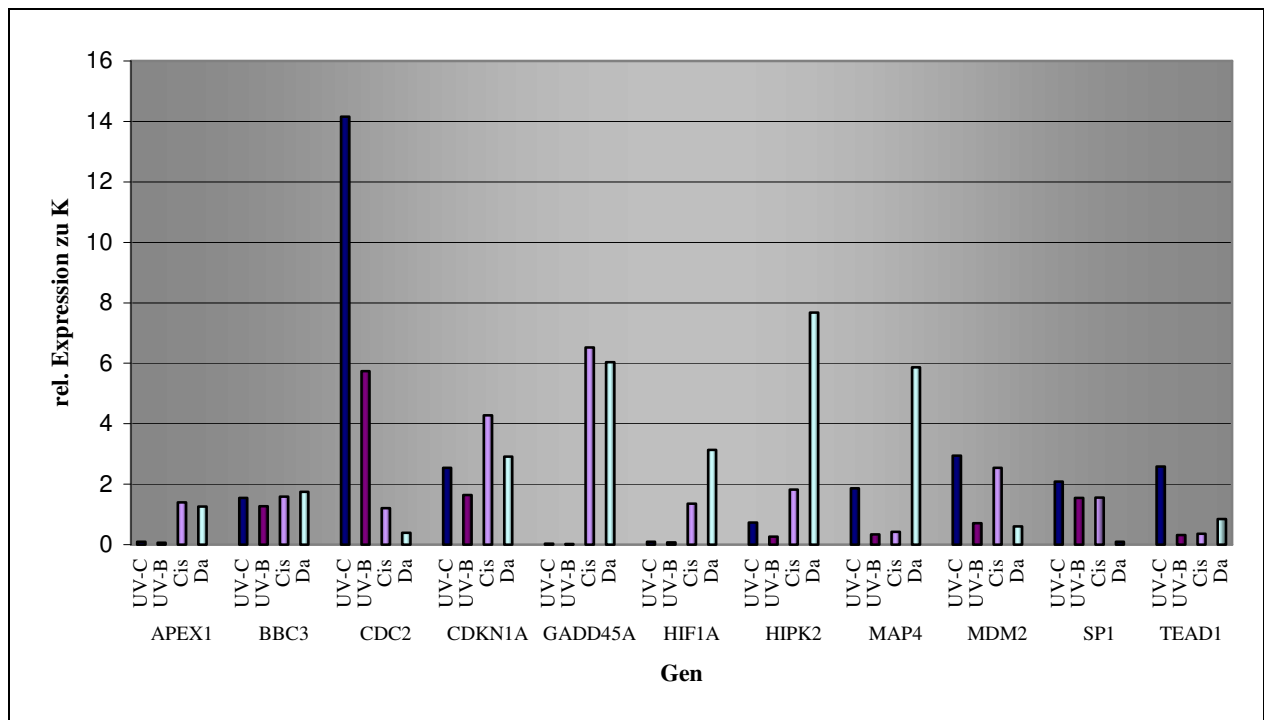


Abb. 23 qRT-PCR: Relative Genexpression nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie bei SK-Mel 1. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. Die unbehandelten Kontrollzellen sind nicht abgebildet. Cis: Cisplatin; Da: Dacarbazin.

SK-Mel 3

BBC3 und HIPK2 zeigten in den Makro-Array-Untersuchungen eine verminderte Expression für beide Wellenlängen, CDC2 nach UV-C-Bestrahlung. CDKN1A war UV-B-bedingt vermehrt exprimiert. Diese Regulation konnte in der qRT-PCR für CDKN1A und HIPK2 verifiziert werden. Zudem konnte in der qRT-PCR eine vermehrte Expression von CDKN1A nach UV-B-Bestrahlung und von TEAD1 nach Bestrahlung mit beiden Wellenlängen beobachtet werden.

Nach 24h-Inkubation mit Cisplatin wurden CDKN1A, GADD45A und MDM2 aufreguliert, wohingegen HIPK2, MAP4 und TEAD1 vermindert exprimiert wurden (Makro-Arrays). Diese Ergebnisse wurden mittels qRT-PCR bestätigt.

Nach Gabe von Dacarbazin kam es in den Makro-Array-Analysen ausschließlich zu einer Regulation von HIPK2, das verminderte Expressionswerte zeigte. Dieses Ergebnis wurde in der qRT-PCR bestätigt. BBC3 und CDKN1A waren zudem in der qRT-PCR verstärkt exprimiert (Abb. 24, 25, Tab. 13).

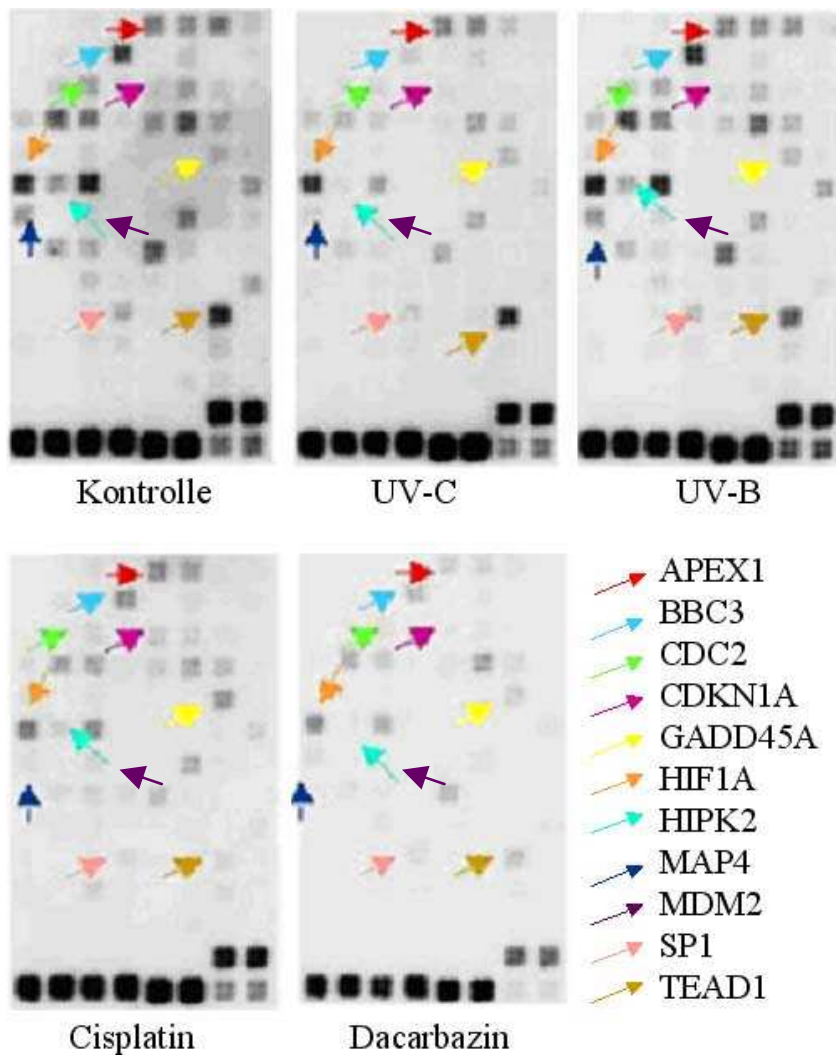


Abb. 24 Makro-Arrays: Genexpression bei SK-Mel 3 nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie.

SK-Mel 3	nach UV-C	nach UV-B	nach Cisplatin	nach Dacarbazin
<i>APEX1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>BBC3</i>	0,11	0,24	n.r.	n.r.
<i>CDC2</i>	0,15	n.r.	n.r.	n.r.
<i>CDKN1A</i>	n.r.	7,25	3,19	n.r.
<i>GADD45A</i>	n.r.	n.r.	3,08	n.r.
<i>HIF1A</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>HIPK2</i>	0,1	0,13	0,27	0,04
<i>MAP4</i>	n.r.	n.r.	0,35	n.r.
<i>MDM2</i>	n.r.	n.r.	2,54	n.r.
<i>SP1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>TEAD1</i>	n.r.	n.r.	0,12	n.r.

Tab. 13 Makro-Array-Analyse: Relative Genexpression bei SK-Mel 3 nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. n.r.: nicht reguliert.

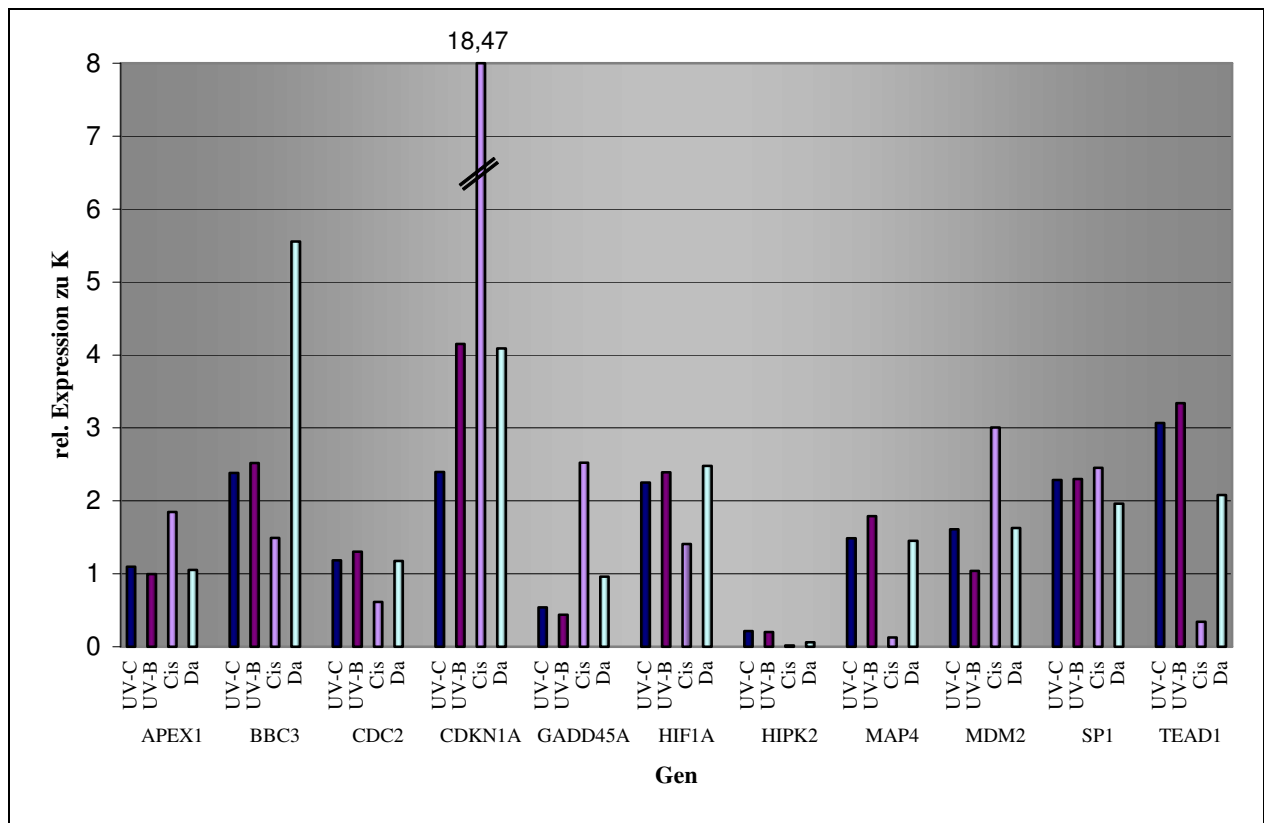


Abb. 25 qRT-PCR: Relative Genexpression nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie bei SK-Mel 3. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. Die unbehandelten Kontrollzellen sind nicht abgebildet. Cis: Cisplatin; Da: Dacarbazin.

IGR-37

IGR-37 zeigte nach Bestrahlung beider Wellenlängen eine erhöhte Expression von CDC2 sowie vermindert exprimiertes HIPK2 (Makro-Arrays). Die Regulation von CDC2 konnte in der qRT-PCR bestätigt werden, während die differentielle Expression von HIPK2 nicht nachvollzogen werden konnte. Demgegenüber war in der qRT-PCR zusätzlich eine Minderepression von BBC3 nach Bestrahlung beider Wellenlängen nachweisbar. Nach Cisplatin-Gabe waren in beiden Untersuchungsverfahren BBC3 und GADD45A vermehrt und TEAD1 vermindert exprimiert. In der qRT-PCR wurde darüber hinaus eine Mehrexpression von CDKN1A und MDM2 sowie vermindert exprimiertes HIPK2 nachgewiesen.

Nach Behandlung mit Dacarbazin waren in beiden Untersuchungsverfahren übereinstimmend BBC3, MAP4 und TEAD1 überexprimiert. In der qRT-PCR wurde eine Dacarbazin-bedingte Mehrexpression von CDKN1A und GADD45A gefunden (Abb. 26, 27, Tab. 14).

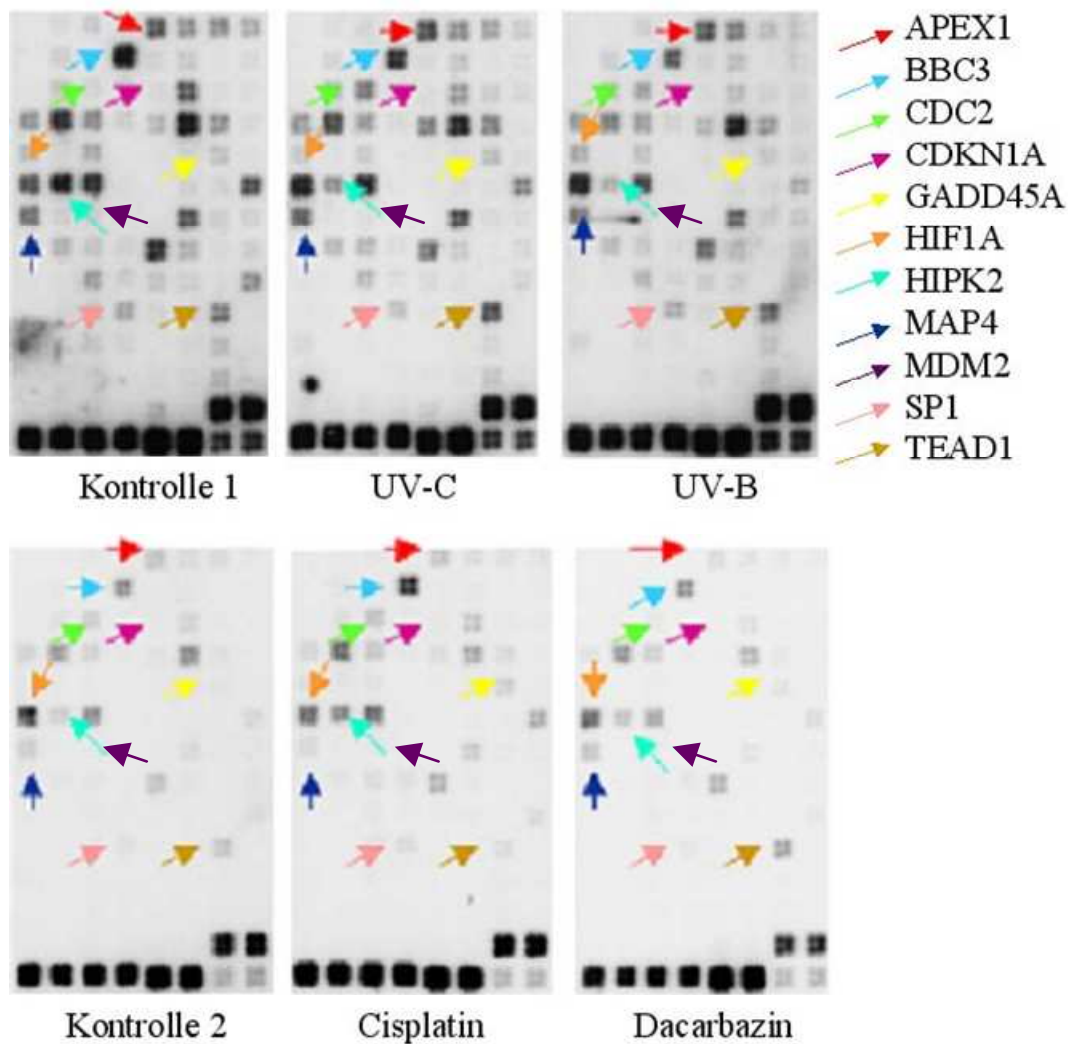


Abb. 26 Makro-Arrays: Genexpression bei IGR-37 nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie.

IGR-37	<i>nach UV-C</i>	<i>nach UV-B</i>	<i>nach Cisplatin</i>	<i>nach Dacarbazin</i>
<i>APEX1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>BBC3</i>	n.r.	n.r.	2,67	2,89
<i>CDC2</i>	11,38	7,05	n.r.	n.r.
<i>CDKN1A</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>GADD45A</i>	n.r.	n.r.	11,63	n.r.
<i>HIF1A</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>HIPK2</i>	0,32	0,17	n.r.	n.r.
<i>MAP4</i>	n.r.	n.r.	n.r.	2,67
<i>MDM2</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>SP1</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>TEAD1</i>	n.r.	n.r.	0,31	2,78

Tab. 14 Makro-Array-Analyse: Relative Genexpression bei IGR-37 nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. n.r.: nicht reguliert.

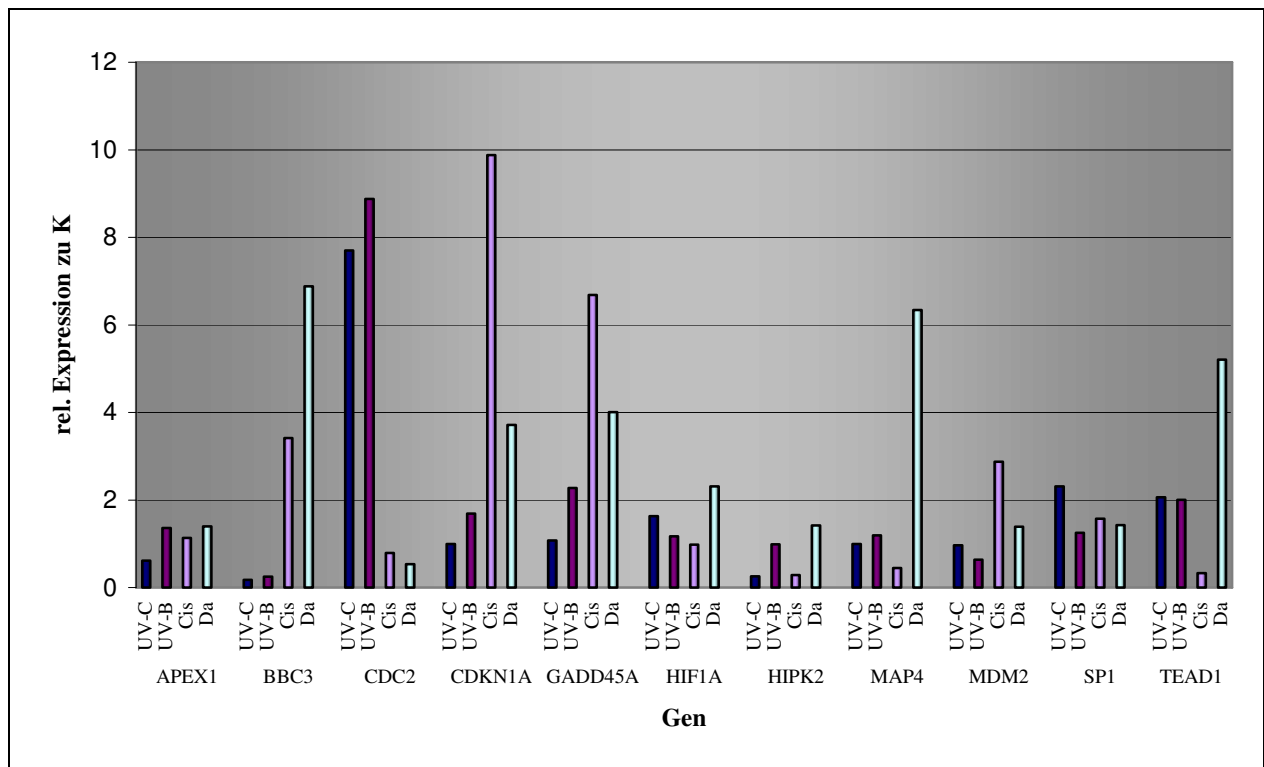


Abb. 27 qRT-PCR: Relative Genexpression nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie bei IGR-37. Die Expression der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. Die unbehandelten Kontrollzellen sind nicht abgebildet. Cis: Cisplatin; Da: Dacarbazin.

5.7. Unterschiede in der konstitutionellen Genexpression

Unterschiede in der konstitutionellen Genexpression Melanome gegenüber primären Melanozyten

Um grundlegende Unterschiede der Genexpression zwischen primären Melanozyten und Melanomen zu erarbeiten, wurden die unbehandelten Kontrollen der Melanozyten der Gesamtheit aller Kontrollen der vorliegenden Melanomzelllinien gegenübergestellt.

In den Makro-Arrays zeigte nur MAP4 eine Tendenz zu einer höheren Expression in den Melanomen. Dies konnte in der qRT-PCR verifiziert werden. In den Makro-Array-Untersuchungen wies die Gesamtheit der Melanome eine Reihe von Genen auf, die konstitutionell schwächer exprimiert waren als bei den primären Melanozyten. Mit CDKN1A und GADD45A waren zwei zentrale Gene der Zellzyklus-Kontrolle, DNA-Reparatur und Apoptose-Regulation in Melanomen unterexprimiert (Faktor 0,3 bzw. 0,36). Ferner waren MDM2, das die p53-Stabilität beeinflusst, sowie der Transkriptionsfaktor SP1 vermindert exprimiert (Faktor 0,22 bzw. 0,16). Für APEX1, HIPK2 und TEAD1 lag kein signifikanter Expressionsunterschied vor. Diese Ergebnisse konnten in der qRT-PCR verifiziert werden. In der qRT-PCR wurden zudem eine schwächere Expression von BBC3 und HIF1A und eine stärkere Expression von CDC2 für die Gruppe der Melanome beobachtet (Abb. 28).

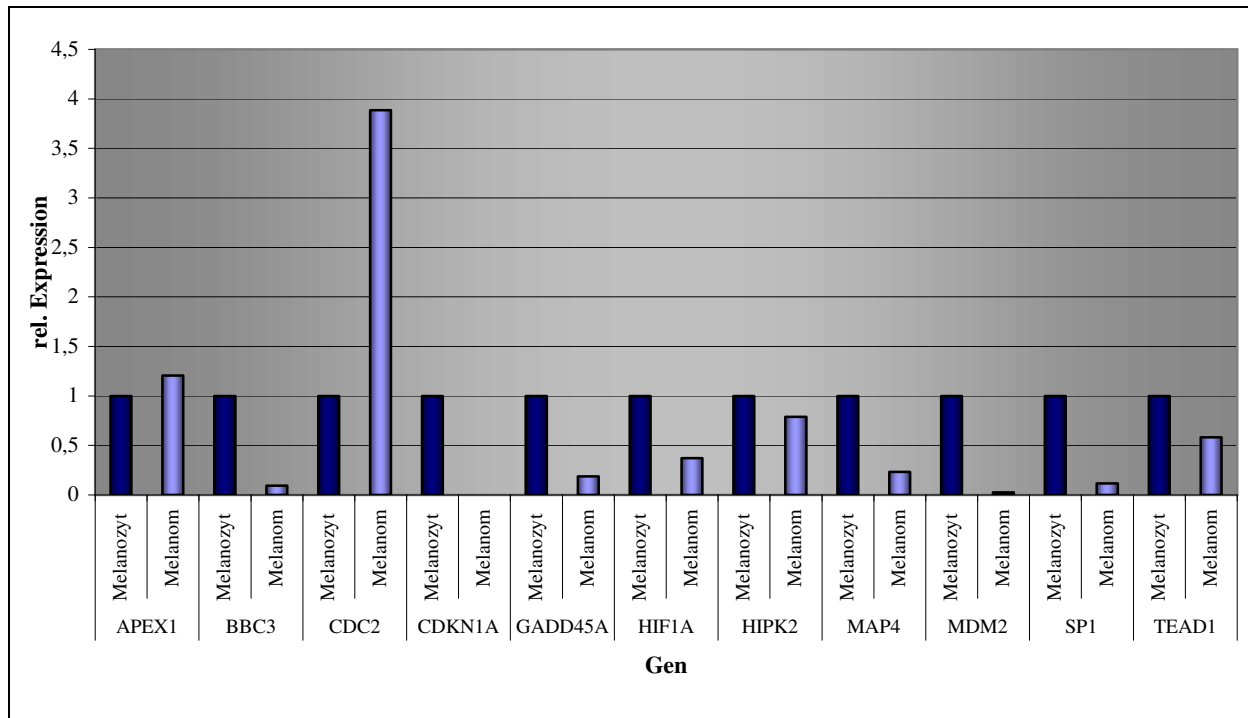


Abb. 28 qRT-PCR: Unterschiede in der Genexpression von Melanomen gegenüber Melanozyten. Die Expression der Melanozyten wurde als 1 gesetzt.

Unterschiede der konstitutionellen Genexpression in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus

Um die Abhängigkeit der Genexpression vom p53-Mutationsstatus zu untersuchen, wurden die Zelllinien zu drei Untergruppen zusammengefasst. Die erste Gruppe umfasste p53-Wildtyp-exprimierende Zellen (Melanozyten, SK-Mel 30, COLO-849, Mel-JUSO), die zweite Gruppe p53-Punktmutanten, mit konsekutivem Aminosäureaustausch (SK-Mel 1 und SK-Mel 3) und die dritte Gruppe die Melanomzelllinie mit einem p53-Abbruchprotein (IGR-37).

In den Makro-Arrays waren die Unterschiede der konstitutionellen Genexpression in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus gering. Lediglich BBC3 war in den p53-Mutanten-Linien signifikant schwächer exprimiert als bei p53-Wildtyp-Linien (p53-Punktmutanten: Faktor 0,28; p53-Abbruchmutante: Faktor 0,37). Ferner war MAP4 in p53-Punktmutanten schwächer exprimiert als bei den p53-Wildtyp-Zelllinien (Faktor 0,36). Beides konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden. CDKN1A war bei den p53-Punktmutanten signifikant stärker exprimiert als bei der p53-Abbruchmutante (Faktor 45,45). Auch dieses Ergebnis konnte in der qRT-PCR bestätigt werden. Die stärkste CDKN1A-Expression zeigten in der qRT-PCR aber die p53-Wildtyp-Zelllinien, was in den Makro-Arrays nicht nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte in der qRT-PCR nachgewiesen werden, dass GADD45A und MDM2 bei der p53-Abbruchmutante signifikant schwächer exprimiert waren als in beiden anderen Gruppen. HIPK2 zeigte bei den p53-Punktmutanten eine signifikant höhere

Expression gegenüber beiden anderen Gruppen. Demgegenüber war SP1 in der Gruppe der p53-Punktmutanten am schwächsten exprimiert (Abb. 29).

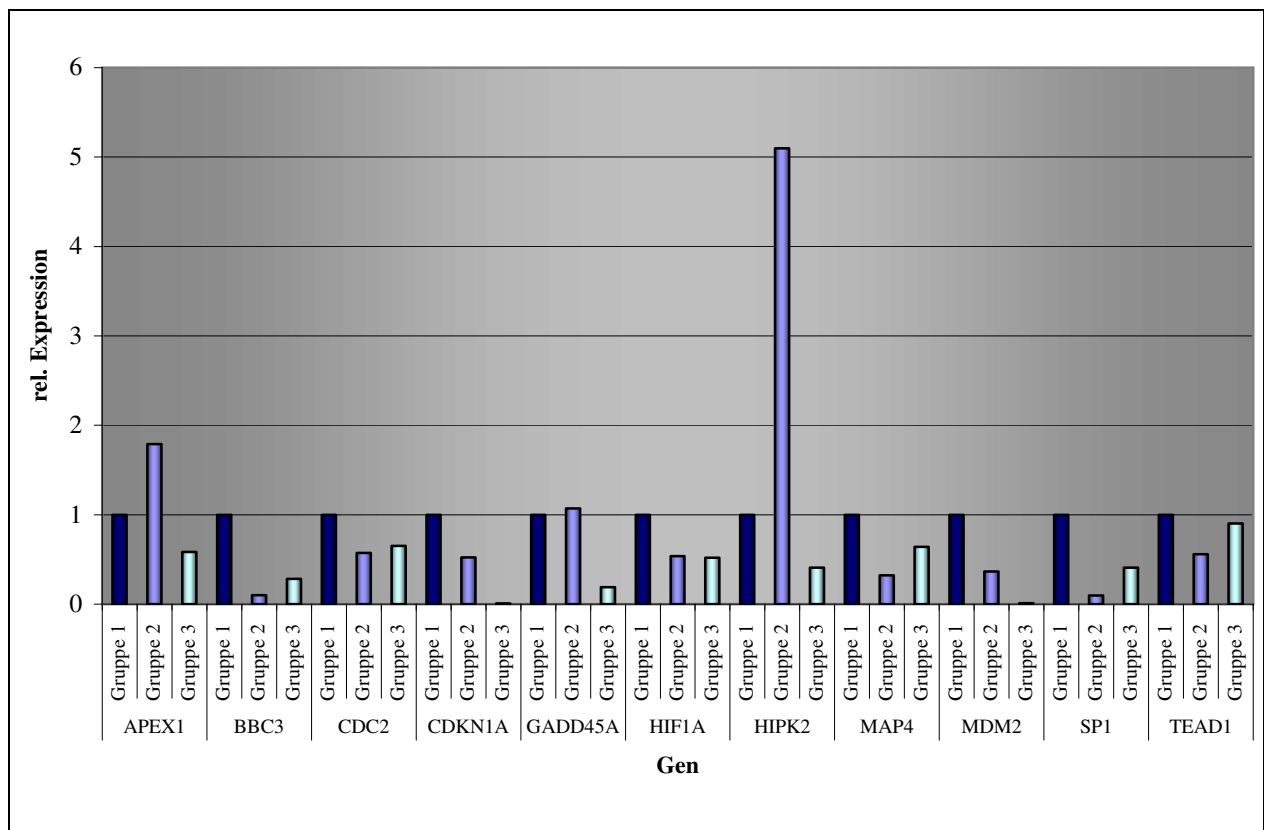


Abb. 29 qRT-PCR: Konstitutionelle Unterschiede der Genexpression in Abhängigkeit des Mutationsstatus. Gr. 1: p53-Wildtyp-Zelllinien; Gr. 2: p53-Punktmutanten; Gr. 3: p53-Proteinabbruch-Mutante. Die Expression der p53-Wildtyp-Zelllinien wurde als 1 gesetzt.

5.8. Genexpression nach UV-Bestrahlung

Insgesamt hatte die UV-B-Bestrahlung einen größeren Einfluss auf die Genregulation als die UV-C-Bestrahlung, wobei insbesondere eine Abregulation von Genen zu beobachten war. Für Melanozyten und SK-Mel 30 war die Zahl regulierter Gene auffällig gering bzw. es lag keine signifikante Regulation vor.

In den Makro-Array-Analysen konnte kein Regulationsmuster ermittelt werden, das allen vorliegenden Zelllinien nach Bestrahlung gemein war. Zwar wiesen die beiden Punktmutanten (SK-Mel 1 und 3) die größte Zahl gleichsinnig regulierter Gene auf, diese war jedoch nicht spezifisch für den Mutationsstatus, da einzelne dieser Gene auch in den übrigen Zelllinien entsprechend reguliert wurden. Ebenso wenig konnte eine wellenlängenspezifische Genregulation nachgewiesen werden.

Die qRT-PCR verifiziert 73% der in Makro-Arrays ermittelten Gen-Expressionen. Auch mit dieser Methode konnte keine Genregulation ermittelt werden, die wellenlängenspezifisch oder

typisch für einen Mutationsstatus war. In den beiden Verfahren wurden zum Teil widersprüchliche Gen-Expressionen für die Zelllinien ermittelt. Übereinstimmende Ergebnisse für beide Untersuchungsverfahren konnten für CDC2 ermittelt werden, dass bei COLO-849, SK-Mel 1 und IGR-37 strahlenbedingt aufreguliert wurde. Ferner wurde für SK-Mel 1 eine strahlenbedingte Mindereexpression von HIF1A und für Melanozyten vermindert exprimiertes SP1 nachgewiesen. Bei SK-Mel 3 und IGR-37 war HIPK2 infolge von UV-C-Bestrahlung, bei SK-Mel 1 und SK-Mel 3 nach UV-B-Bestrahlung abreguliert (Abb. 30).

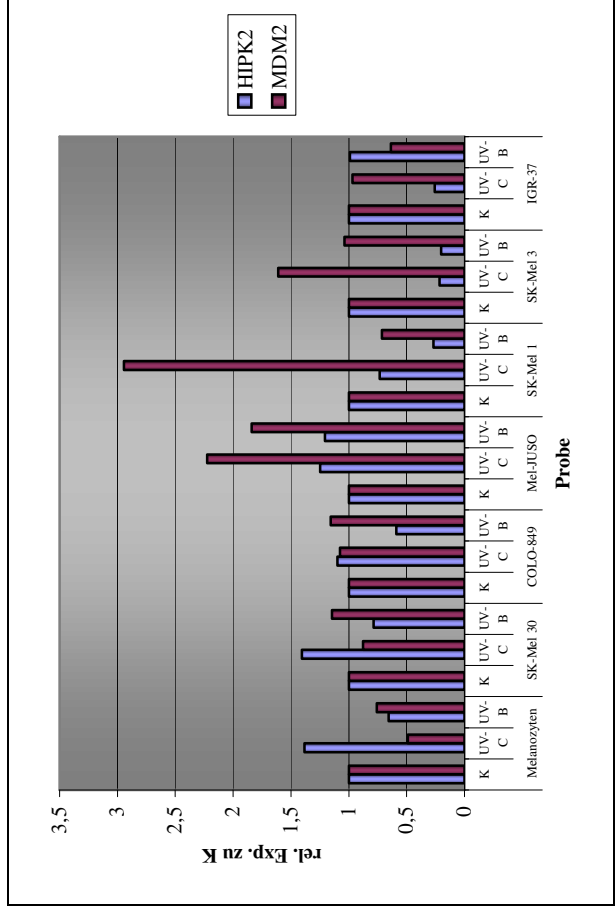
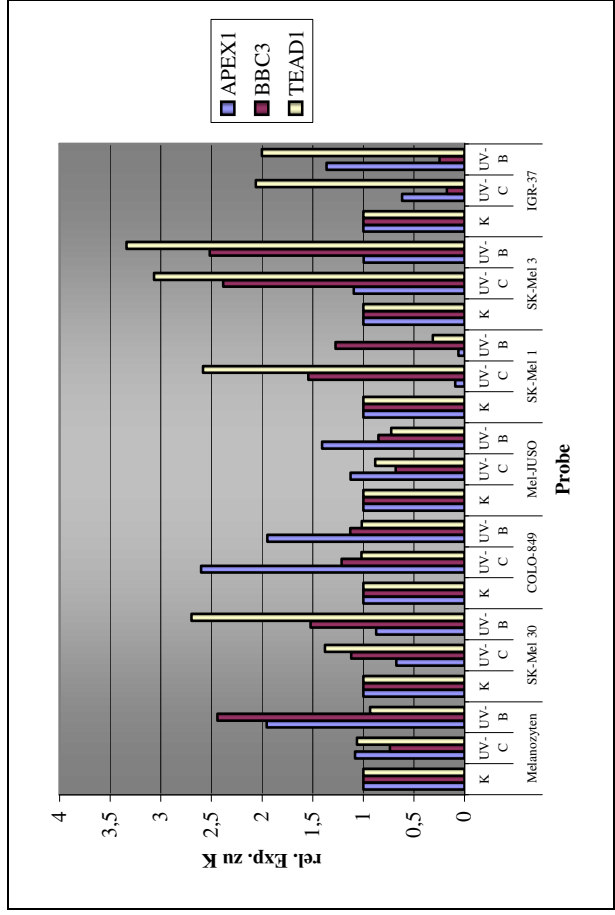
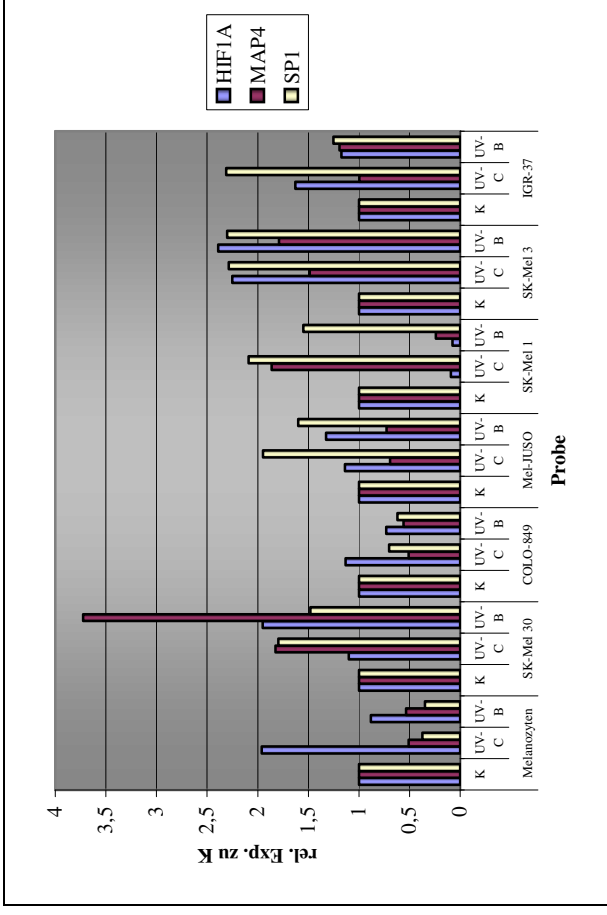
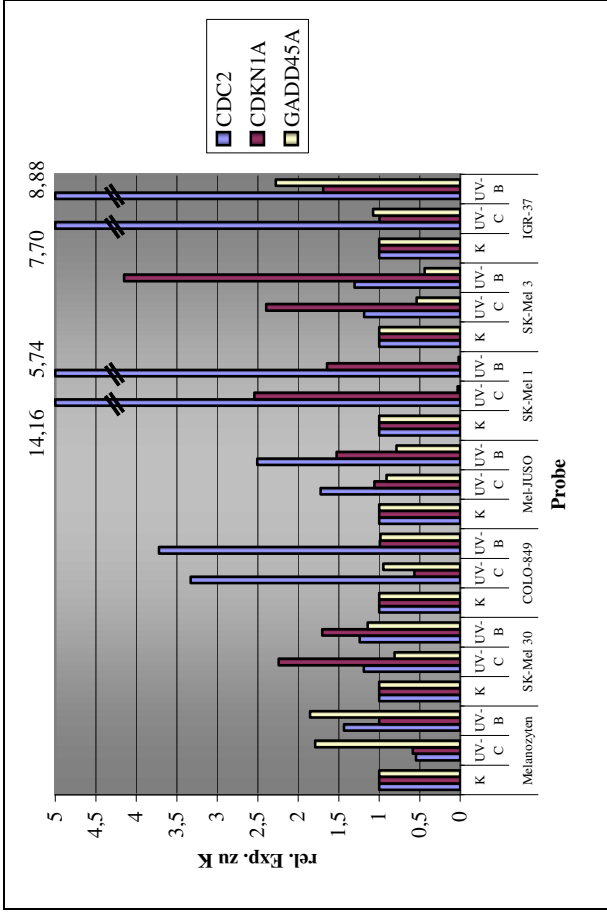


Abb. 30 qRT-PCR: Genregulation nach UV-Bestrahlung. K: unbehandelte Zellen

Unterschiede der Genexpression von Melanomen gegenüber Melanozyten nach UV- Bestrahlung

Bei dem Vergleich UV-C-bestrahlter Melanome gegen UV-C-bestrahlte primäre Melanozyten zeigte sich in Makro-Arrays ein Expressionsmuster, das in weiten Teilen jenem der Gegenüberstellung unbehandelter Zellen entsprach. CDKN1A, GADD45A und MDM2 waren auch nach UV-C-Bestrahlung in Melanomen schwächer exprimiert als in Melanozyten (Faktor 0,12, 0,19 bzw. 0,23). Der Expressionsunterschied war nach UV-C-Bestrahlung für CDKN1A und GADD45A stärker ausgeprägt als der Expressionsunterschied in den unbehandelten Zellen. Die stärkere Expression von MDM2 in Melanozyten war nach UV-C-Bestrahlung weniger ausgeprägt als in den Kontrollen.

Gene, die in der Gesamtheit der Melanome signifikant stärker exprimiert waren, konnten auch nach UV-C-Bestrahlung nicht nachgewiesen werden.

Nach UV-B Bestrahlung nahm die Zahl der für Melanome unterexprimierten Gene deutlich ab. CDKN1A und GADD45A blieben, verglichen mit Melanozyten, schwächer exprimiert (Faktor 0,11 bzw. 0,18). In der qRT-PCR waren nach Bestrahlung für beide Wellenlängen BBC3, CDKN1A, GADD45A und MDM2 in Melanomen schwächer exprimiert als in Melanozyten, wohingegen CDC2 eine stärkere Expression aufwies (Abb. 31a, b).

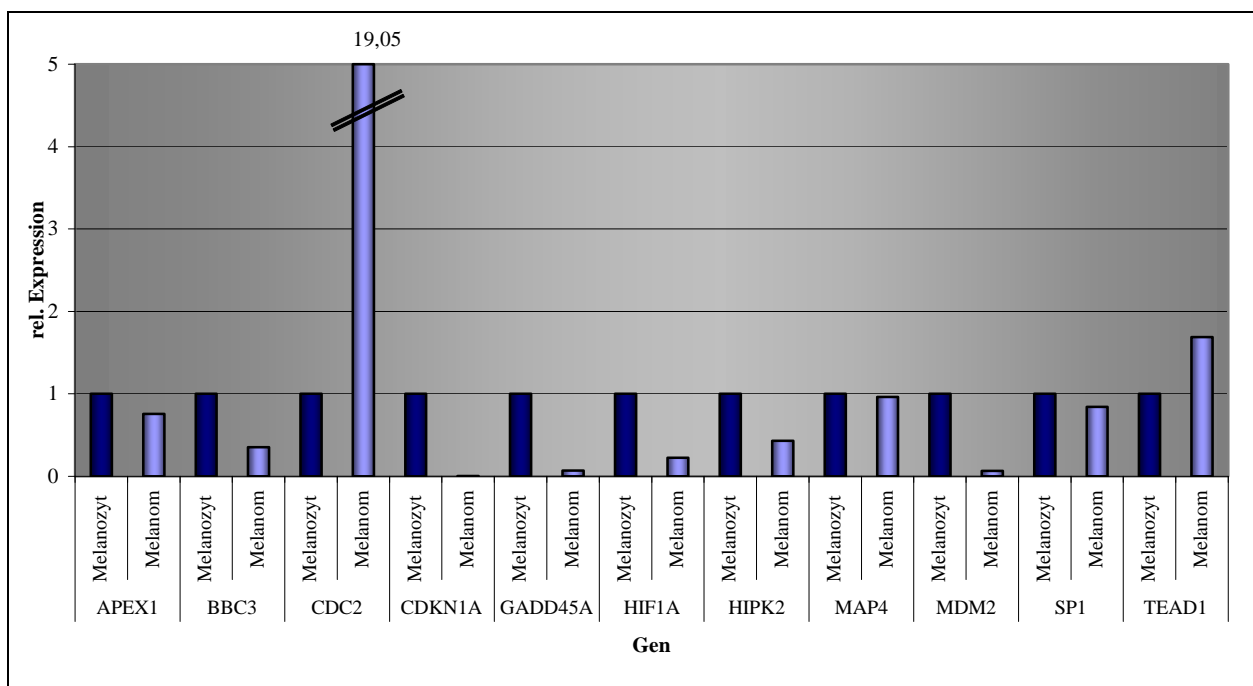


Abb. 31a qRT-PCR: Unterschiede der Genexpression von Melanomen gegenüber Melanozyten nach UV-C-Bestrahlung. Die Expression der Melanozyten wurde als 1 gesetzt.

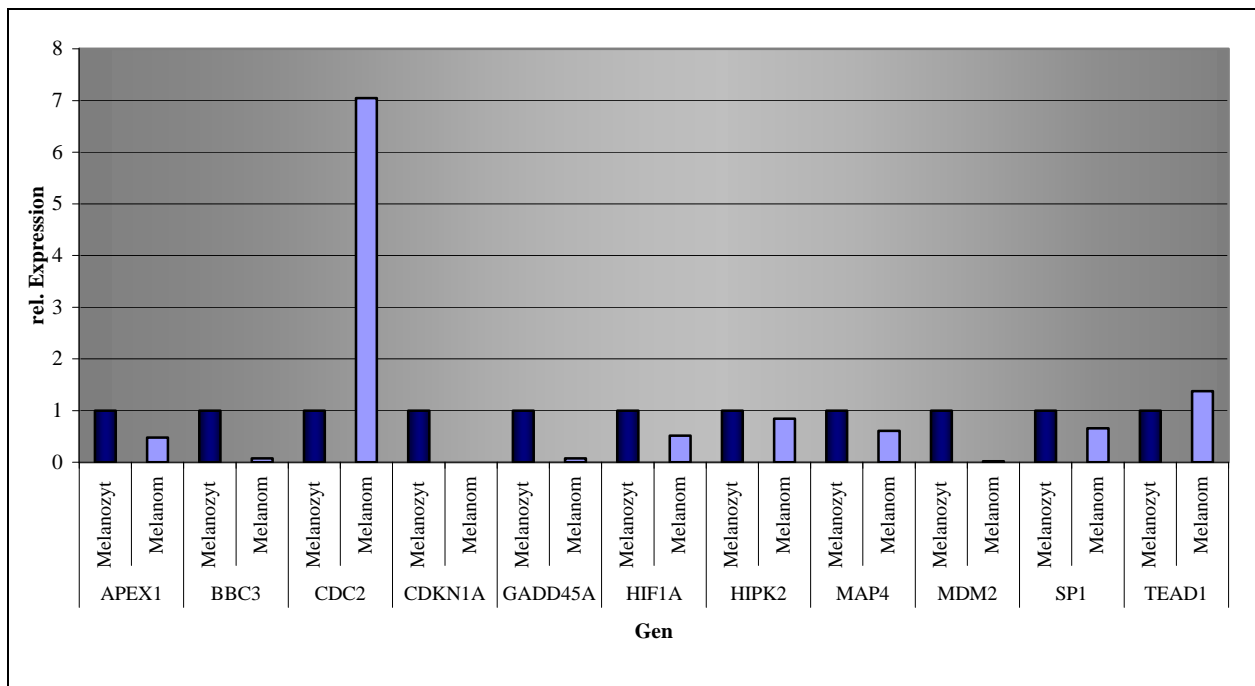


Abb. 31b qRT-PCR: Unterschiede der Genexpression von Melanomen gegenüber Melanozyten nach UV-B-Bestrahlung. Die Expression der Melanozyten wurde als 1 gesetzt.

Unterschiede der Genexpression nach UV-Bestrahlung in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus

Während nach der Gruppierung der Zelllinien entsprechend ihres Mutationsstatus für unbehandelte Kontrollen wenige konstitutionell differente Gene nachgewiesen werden konnten, wurden zahlreiche Unterschiede nach UV-C- bzw. UV-B-Bestrahlung gefunden. Nach UV-C-Bestrahlung überwog für die p53-Abbruchmutante gegenüber beiden anderen Gruppen die Zahl der stärker exprimierten Gene. Sowohl in den Makro-Arrays als auch in der qRT-PCR war CDC2 bei der p53-Abbruchmutante am stärksten exprimiert, dagegen zeigte BBC3 bei Zelllinien mit Wildtyp-p53 deutlich höhere Expressionswerte als bei der Abbruchmutante (Faktor 3,67). Für CDKN1A und GADD45A konnte eine sukzessive Abnahme der Expressionen von p53-Wildtyp-Zelllinien, über p53-Punktmutanten zur Abbruchmutante in der qRT-PCR nachgewiesen werden. Zudem waren HIPK2 und TEAD1 für Punktmutanten am stärksten exprimiert. MDM2 zeigte für die Abbruchmutante und SP1 für die p53-Punktmutanten die geringsten Expressionswerte (qRT-PCR, Abb. 32a). Weniger ausgeprägt waren die mutationsbedingten Expressionsunterschiede nach UV-B-Bestrahlung. In der qRT-PCR war nach UV-B-Bestrahlung, wie schon nach UV-C-Bestrahlung, BBC3 bei der p53-Abbruchmutante am schwächsten und CDC2 am stärksten exprimiert. Auch nach UV-B-Bestrahlung zeigten CDKN1A, GADD45A und MDM2 einen sukzessiven Abfall der

Expressionswerte von p53-Wildtyp-Zelllinien, über p53-Punktmutanten zur Abbruchmutante. SP1 zeigte in qRT-PCR und Makro-Arrays für die Punktmutanten die schwächsten Expressionswerte. HIF1A zeigte auch nach UV-B-Bestrahlung die höchsten Expressionswerte für Zelllinien mit Wildtyp-p53, HIPK2 für Punktmutanten (Abb. 32b)

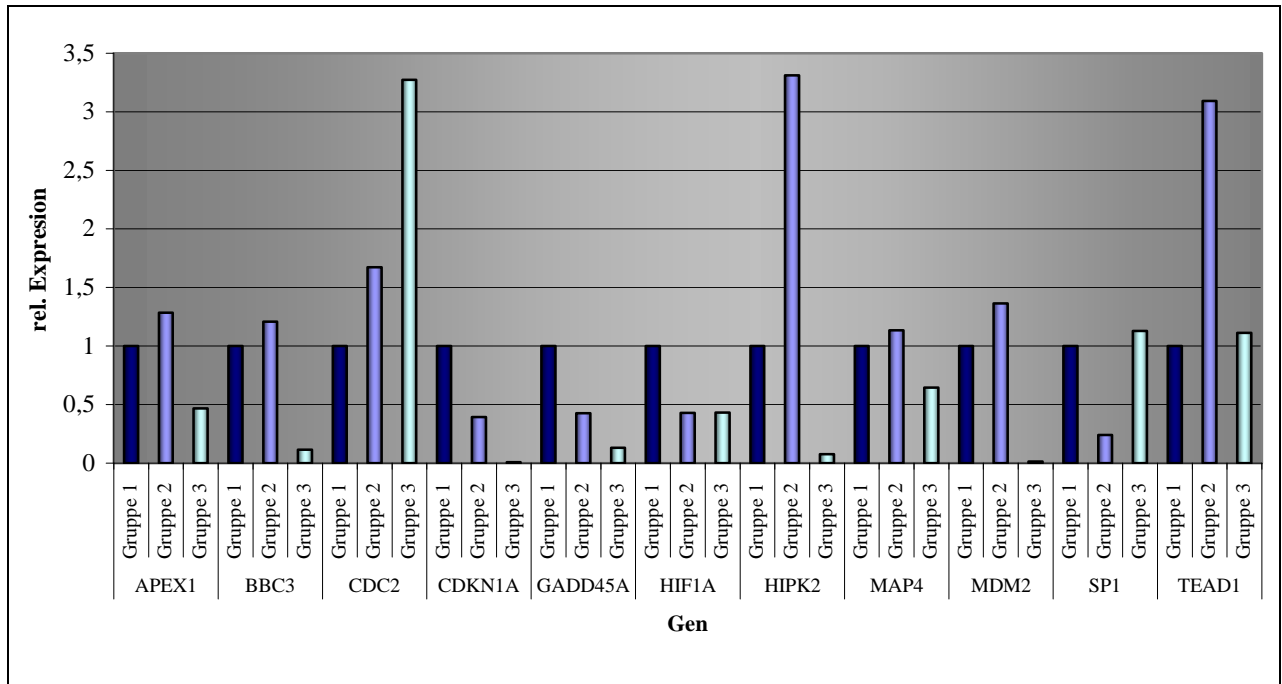


Abb. 32a qRT-PCR: Unterschiede der Genexpression nach UV-C-Bestrahlung in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus. Gr. 1: p53-Wildtyp-Zelllinien; Gr. 2: p53-Punktmutanten; Gr. 3: p53-Proteinabbruch-Mutante. Die Expression der p53-Wildtyp-Zelllinien wurde als 1 gesetzt.

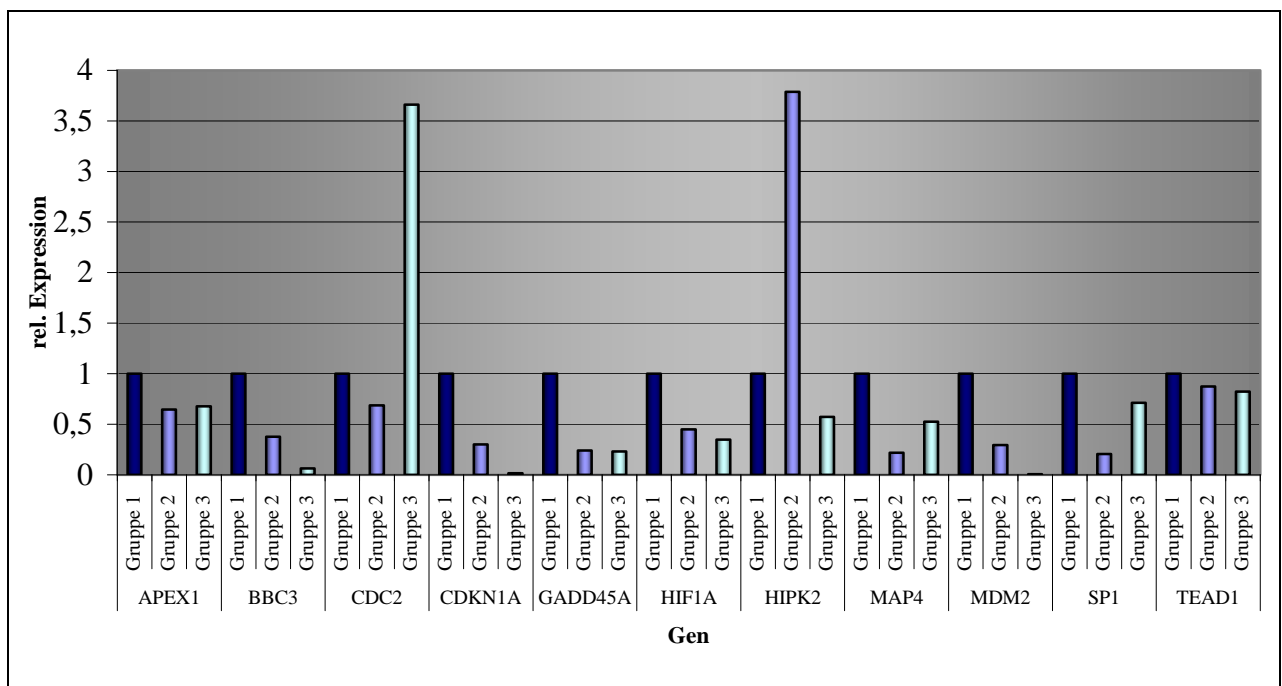


Abb. 32b qRT-PCR: Unterschiede der Genexpression nach UV-B-Bestrahlung in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus. Gr. 1: p53-Wildtyp-Zelllinien; Gr. 2: p53-Punktmutanten; Gr. 3: p53-Proteinabbruch-Mutante. Die Expression der p53-Wildtyp-Zelllinien wurde als 1 gesetzt.

5.9. Genexpression nach Behandlung mit Cisplatin

In den Makro-Arrays überwogen nach Behandlung mit Cisplatin bei Melanozyten, Mel-JUSO, SK-Mel 1 und SK-Mel 3 die Zahl der abregulierten Gene, bei COLO-849 hingegen die Zahl aufregulierter Gene. IGR-37 und SK-Mel 30 zeigten kaum eine Cisplatin-bedingte Genregulation. Wie nach UV-Bestrahlungen wurde HIPK2 auch nach Cisplatin-Behandlung abreguliert. CDC2, das strahlenbedingt in drei von sieben Zelllinien aufreguliert und bei SK-Mel 3 abreguliert wurde, zeigte nach Cisplatin-Gabe nur noch bei SK-Mel 3 eine Expressionsveränderung. SP1 wurde nach Cisplatin-Behandlung, wie bereits nach den UV-Bestrahlungen, bei Melanozyten abreguliert. Die auffälligste Genregulation nach Gabe von Cisplatin war eine verminderte Expression von MAP4 und TEAD1 sowie die erhöhte Expression von CDKN1A und GADD45A. Die Expression von GADD45A wurde in allen Zelllinien und CDKN1A in vier von sieben Zelllinien angeregt. TEAD1 war in sechs von sieben, MAP4 in fünf von sieben, HIPK2 in drei von sieben Zelllinien abreguliert. Für die einzelnen Zelllinien derart übereinstimmende Expressionsmuster traten ausschließlich nach Behandlung mit Cisplatin auf. Mit der gleichsinnigen Regulation von zwölf Genen, bestanden die größten Gemeinsamkeiten zwischen Melanozyten und SK-Mel 3. Die geringsten Gemeinsamkeiten bestanden zwischen IGR-37 und Melanozyten bzw. SK-Mel 30. Die übrigen Zelllinien wiesen eine übereinstimmende Regulation von drei bis sechs Genen auf. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Makro-Array-Analyse waren CDKN1A und GADD45A in der qRT-PCR in allen Melanom-Zelllinien aufreguliert. Im Gegensatz dazu wurde für Melanozyten in der qRT-PCR eine verminderte CDKN1A-Expression infolge von Cisplatin nachgewiesen. APEX1 war in beiden Untersuchungsverfahren ausschließlich bei Mel-JUSO aufreguliert. In der qRT-PCR konnten, entsprechend der Auffälligkeiten in den Makro-Arrays, für alle Zelllinien eine Minderexpression von MAP4 und TEAD1 gefunden werden. Als Ausnahme wurde für IGR-37 eine Cisplatin-bedingte Überexpression von TEAD1 festgestellt. Die Expression von MDM2 wurde bei allen Tumorzelllinien angeregt. Bei Melanozyten dagegen war MDM2 Cisplatin-bedingt abreguliert.

Mittels qRT-PCR konnte die verminderte Expression von SP1 nach Gabe von Cisplatin verifiziert werden. In der qRT-PCR fiel zudem die vermehrte Expression von BBC3 für Mel-JUSO und IGR-37 auf. Für Melanozyten, SK-Mel 30 und SK-Mel 3 wurde in beiden Untersuchungsverfahren eine Cisplatin-bedingte Minderexpression von HIPK2 detektiert (Abb. 3).

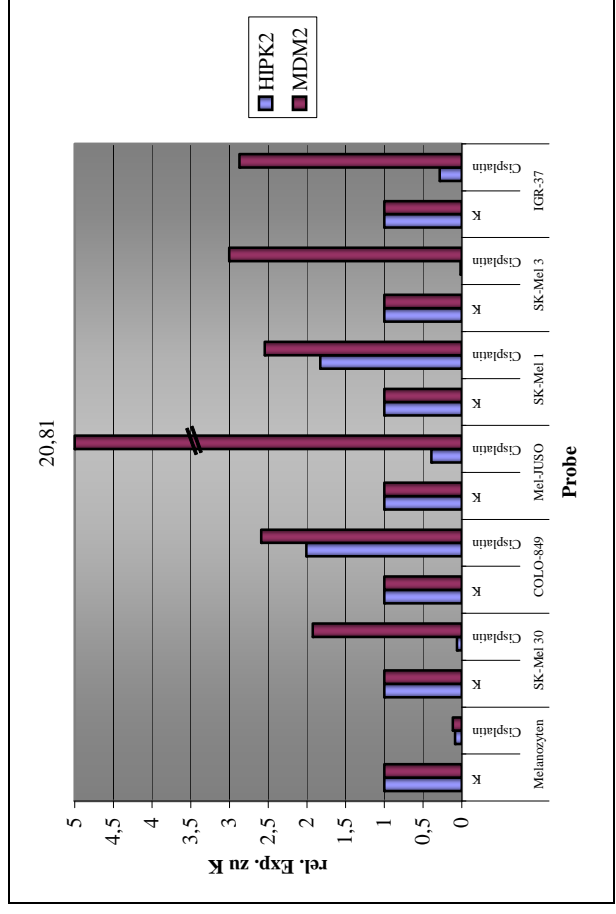
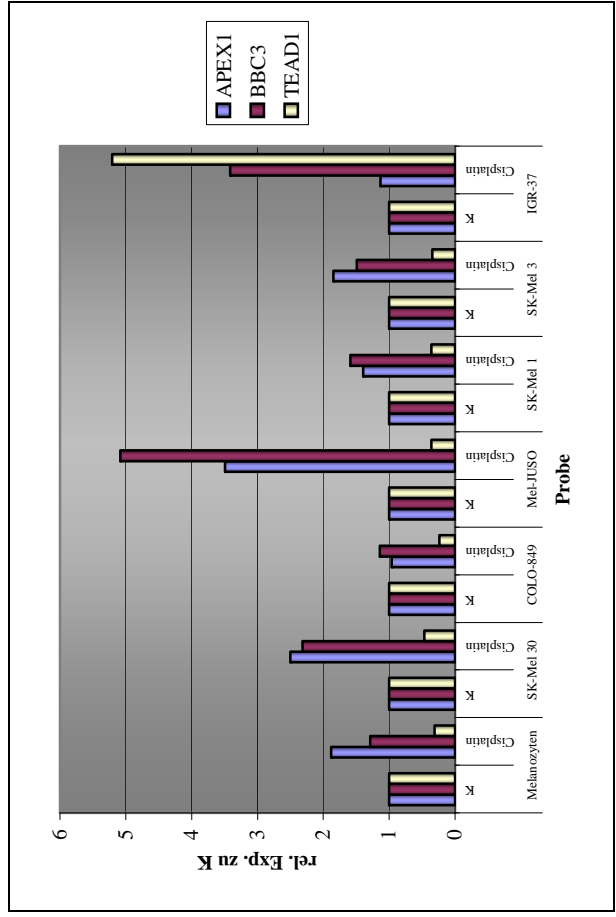
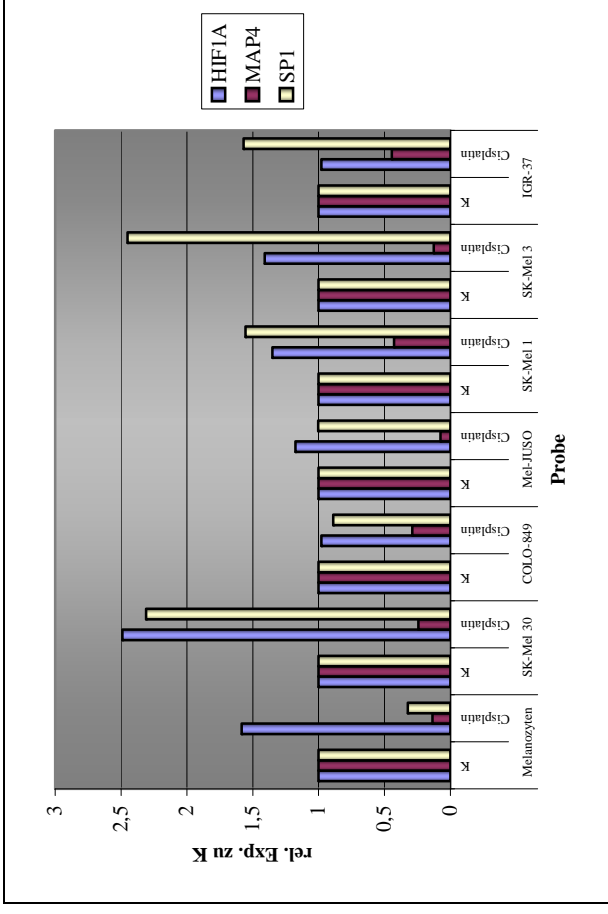
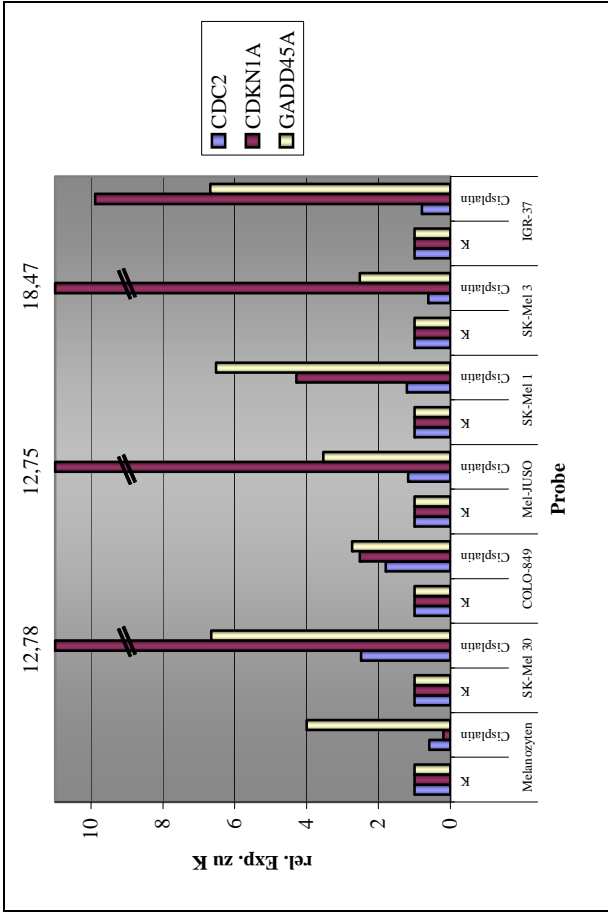


Abb. 33 qRT-PCR: Genexpression nach Cisplatin-Gabe. K: unbehandelte Zellen

Unterschiede der Genexpression von Melanomen gegenüber primären Melanozyten nach Cisplatin-Gabe

In der Gegenüberstellung Cisplatin-behandelter Melanom-Linien gegen primäre Melanozyten waren CDKN1A und GADD45A in Melanomen schwächer exprimiert (Faktor 0,22 bzw. 0,22). Diese schwächere Expression war bereits für die unbehandelten sowie für die bestrahlten Zellen zu beobachten. Der Expressionsunterschied war nach Cisplatin-Gabe größer als in den unbehandelten Zellen, aber weniger ausgeprägt als nach UV-Bestrahlungen. Die in den Makro-Arrays gefundenen Ergebnisse wurden durch die qRT-PCR verifiziert. In der qRT-PCR waren darüber hinaus BBC3, HIF1A und MAP4 für Melanome schwächer, CDC2 stärker exprimiert (Abb. 34).

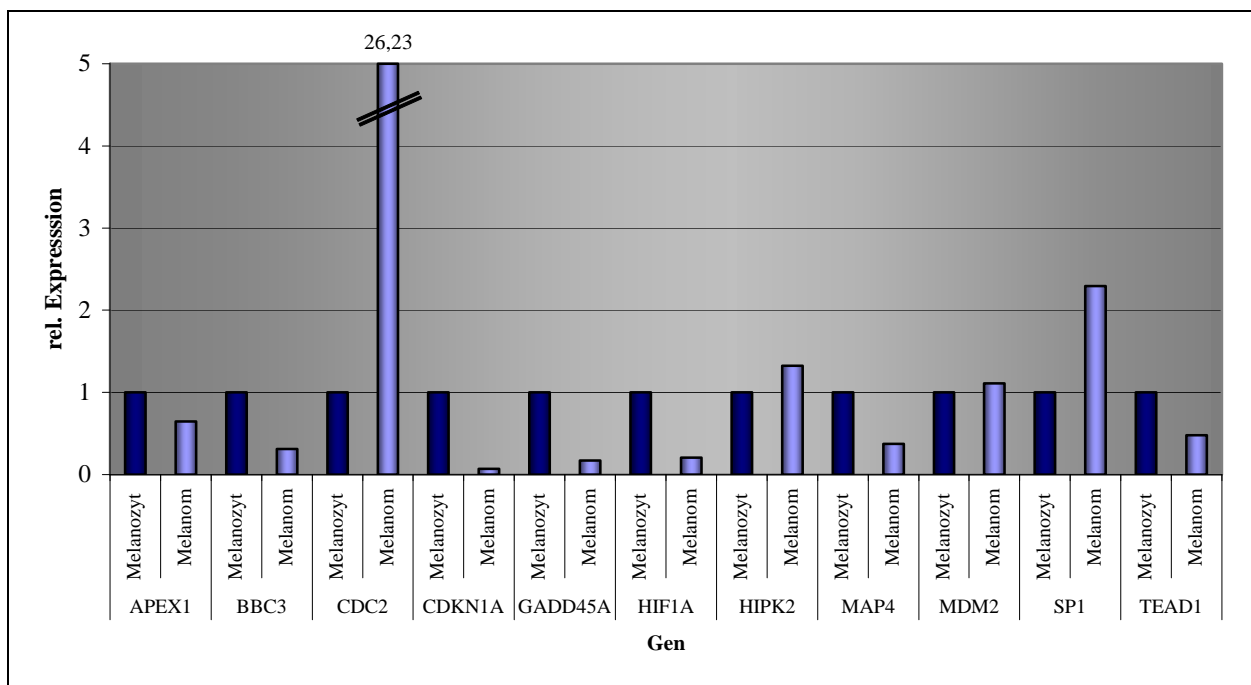


Abb. 34 qRT-PCR: Unterschiede der Genexpression von Melanomen gegenüber Melanozyten nach Cisplatin-Gabe. Die Expression der Melanozyten wurde als 1 gesetzt.

Unterschiede der Genexpression nach Cisplatin-Gabe in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus

Differenziell exprimierte Gene bei den p53-Punktmutanten gegenüber den p53-Wildtyp-Zelllinien beschränkten sich auf GADD45A und HIF1A (Faktor 0,38 bzw. 0,33). Zudem war APEX1 in der p53-Abbruchmutante schwächer exprimiert als in den p53-Wildtyp-Zelllinien, CDC2 und HIPK2 hingegen stärker (Faktor 0,21, 2,56 bzw. 8,33).

In der Gegenüberstellung von den p53-Punktmutanten zur p53-Abbruchmutante war CDKN1A bei p53-Punktmutanten stärker exprimiert, während HIPK2 und MAP4 schwächer exprimiert

waren (Faktor 40, 0,10 bzw. 0,36). Die in den Makro-Arrays ermittelten Expressionsverhältnisse wurden zum größten Teil durch qRT-PCR-Untersuchungen verifiziert (Abb. 35).

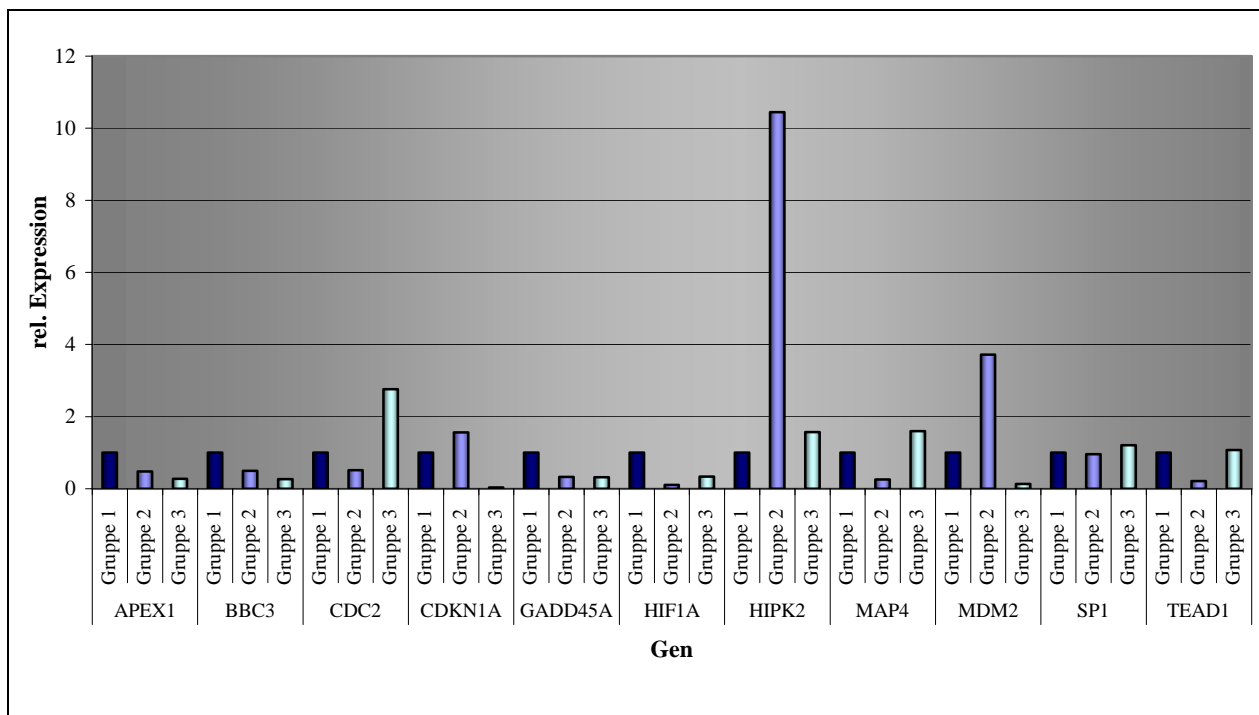


Abb. 35 qRT-PCR: Unterschiede der Genexpression nach Cisplatin-Gabe in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus. Gr. 1: p53-Wildtyp-Zelllinien; Gr. 2: p53-Punktmutanten; Gr. 3: p53-Proteinabbruch-Mutante. Die Expression der p53-Wildtyp-Zelllinien wurde als 1 gesetzt.

5.10. Genexpression nach Behandlung mit Dacarbazin

Die Gesamtzahl der in den Makro-Arrays nach Behandlung mit Dacarbazin regulierten Gene war auffällig gering. Die größten Übereinstimmungen lagen in der Aufregulation von GADD45A, die in vier von sieben Zelllinien nachgewiesen werden konnte. CDKN1A, MAP4 und TEAD1 wurden in jeweils zwei von sieben Zelllinien stärker exprimiert, CDC2 hingegen wurde in zwei von sieben Zelllinien abreguliert. Die qRT-PCR verifizierte die in den Makro-Arrays detektierten Expressionsunterschiede nur teilweise. Hier war am auffälligsten, dass CDKN1A, wie bereits nach Cisplatin-Gabe, in allen Tumorzelllinien auf- und bei Melanozyten abreguliert wurde. Darüber hinaus wurden BBC3 und GADD45A in drei von sieben Zelllinien aufreguliert. Im Gegensatz zur Behandlung mit Cisplatin war nach Dacarbazin-Gabe GADD45A bei Melanozyten ohne signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Zellen exprimiert. Darüber hinaus fanden sich kaum Gemeinsamkeiten in der Genregulation. Ähnlich wie bei der Expression unter Cisplatin wiesen Melanozyten und SK-Mel 3 die größten Gemeinsamkeiten auf, die vier Gene gleichsinnig regulierten (Abb. 36).

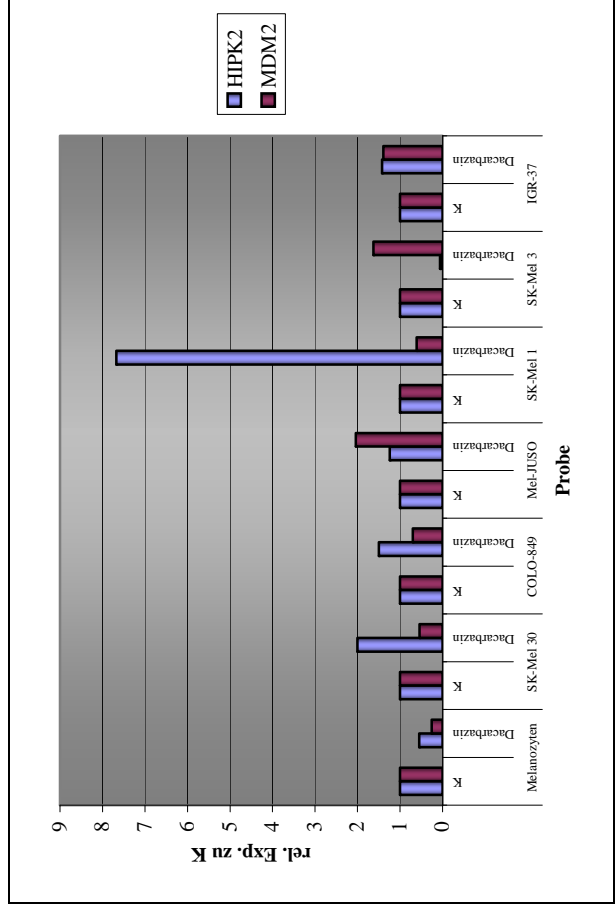
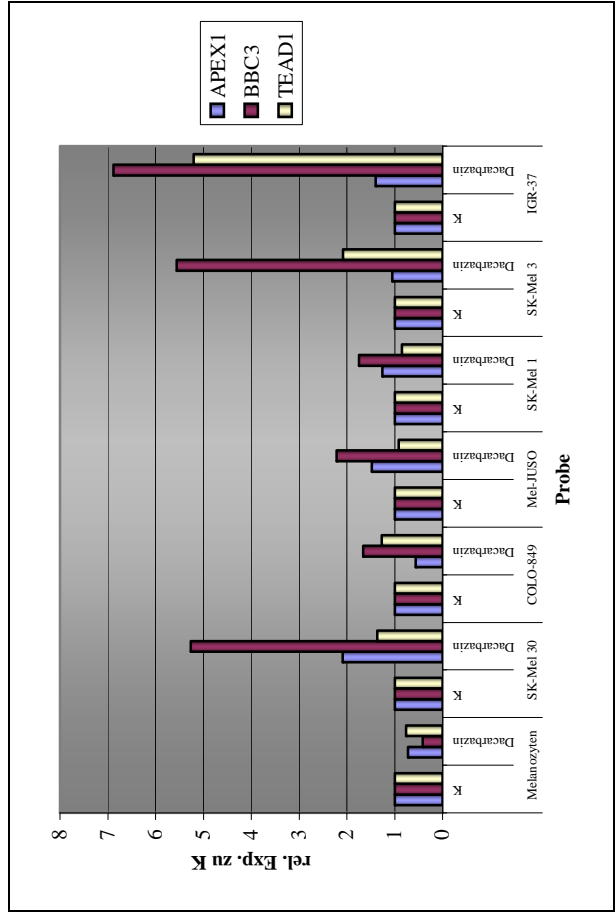
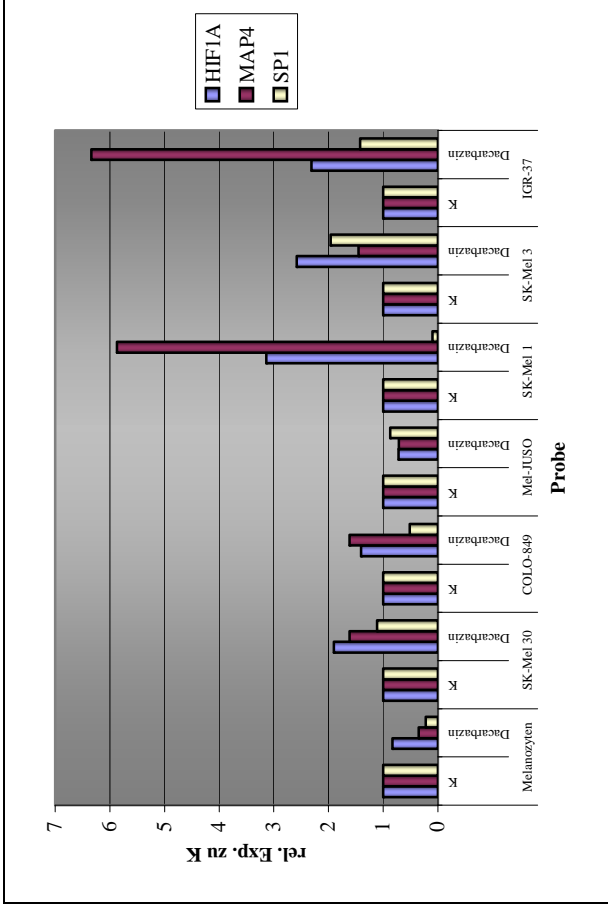
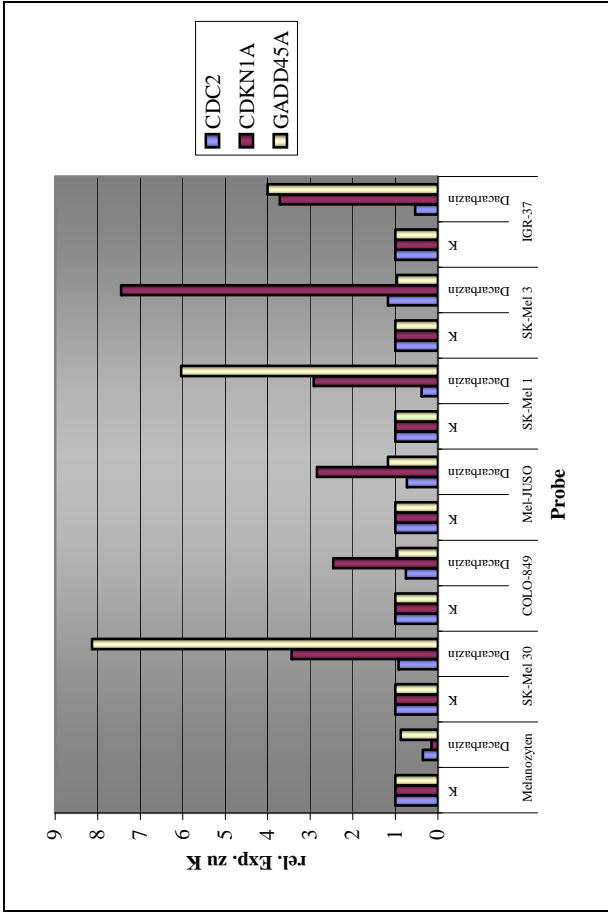


Abb. 36 qRT-PCR: Genexpression nach Dacarbazin-Gabe. K: unbehandelte Zellen

Unterschiede der Genexpression von Melanomen gegenüber Melanozyten nach Dacarbazin-Gabe

Nach Dacarbazin-Behandlung waren BBC3 und CDKN1A in Melanomen im Vergleich zu primären Melanozyten vermindert exprimiert (Faktor 0,26 bzw. 0,31).

CDKN1A war somit konstitutionell, nach Bestrahlungen, nach Cisplatin- und Dacarbazin-Gabe in Melanomen stets schwächer exprimiert als in Melanozyten. Eine verminderte Expression von BBC3 war für Melanome dagegen ausschließlich nach Dacarbazin-Gabe zu beobachten.

In der qRT-PCR waren CDKN1A und MDM2 in Melanomen schwächer, während BBC3 und CDC2 stärker exprimiert waren (Abb. 37).

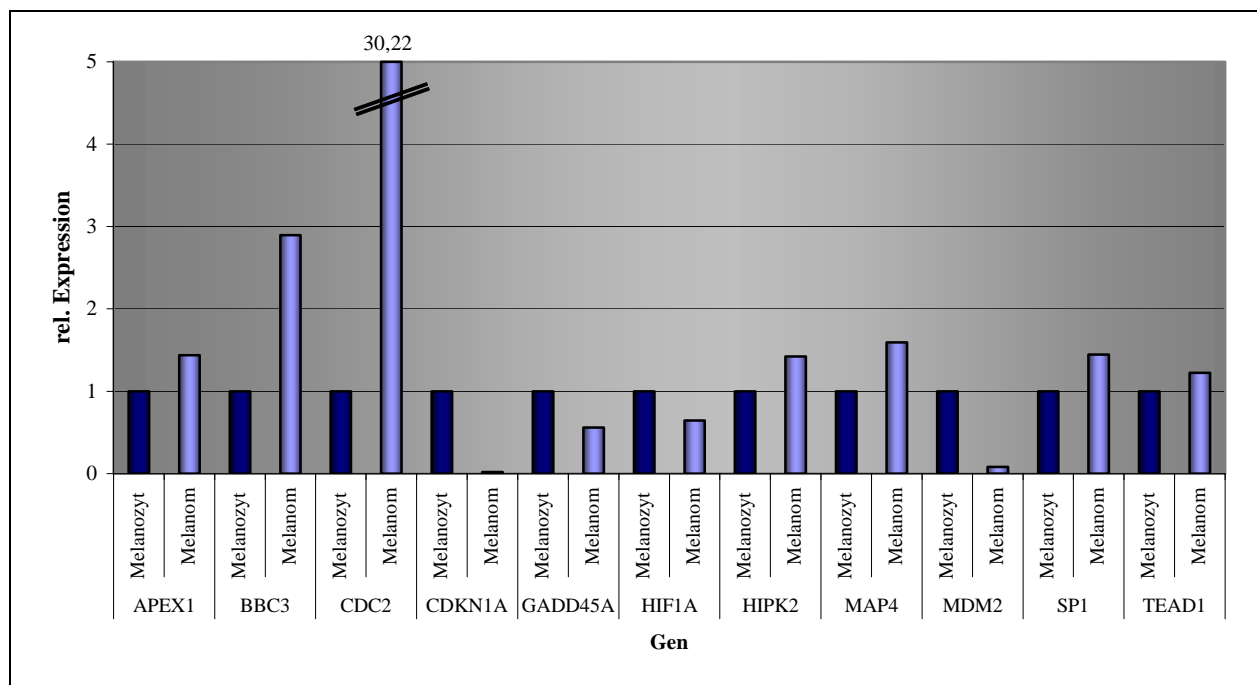


Abb. 37 qRT-PCR: Unterschiede der Genexpression von Melanomen gegenüber Melanozyten nach Dacarbazin-Gabe. Die Expression der Melanozyten wurde als 1 gesetzt.

Unterschiede der Genexpression nach Dacarbazin-Gabe in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus

Wurden die Zelllinien hinsichtlich ihres Mutationsstatus gruppiert, lagen kaum Unterschiede in der Gen-Expression der einzelnen Gruppen vor.

In der qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass, wie schon nach den UV-Bestrahlungen, auch nach Dacarbazin-Gabe CDC2 bei der p53-Abbruchmutante am stärksten exprimiert war. Demgegenüber war die Expression von CDKN1A und MDM2 hier am schwächsten. HIPK2 wies, wie unter den übrigen Versuchsbedingungen, auch nach Dacarbazin-Gabe für die

Punktmutanten die höchsten Expressionswerte auf. Entgegen den übrigen Versuchsbedingungen konnten nach Dacarbazin-Gabe die höchsten Expressionswerte an MAP4 und TEAD1 für die p53-Abbruchmutante gefunden werden (Abb. 38).

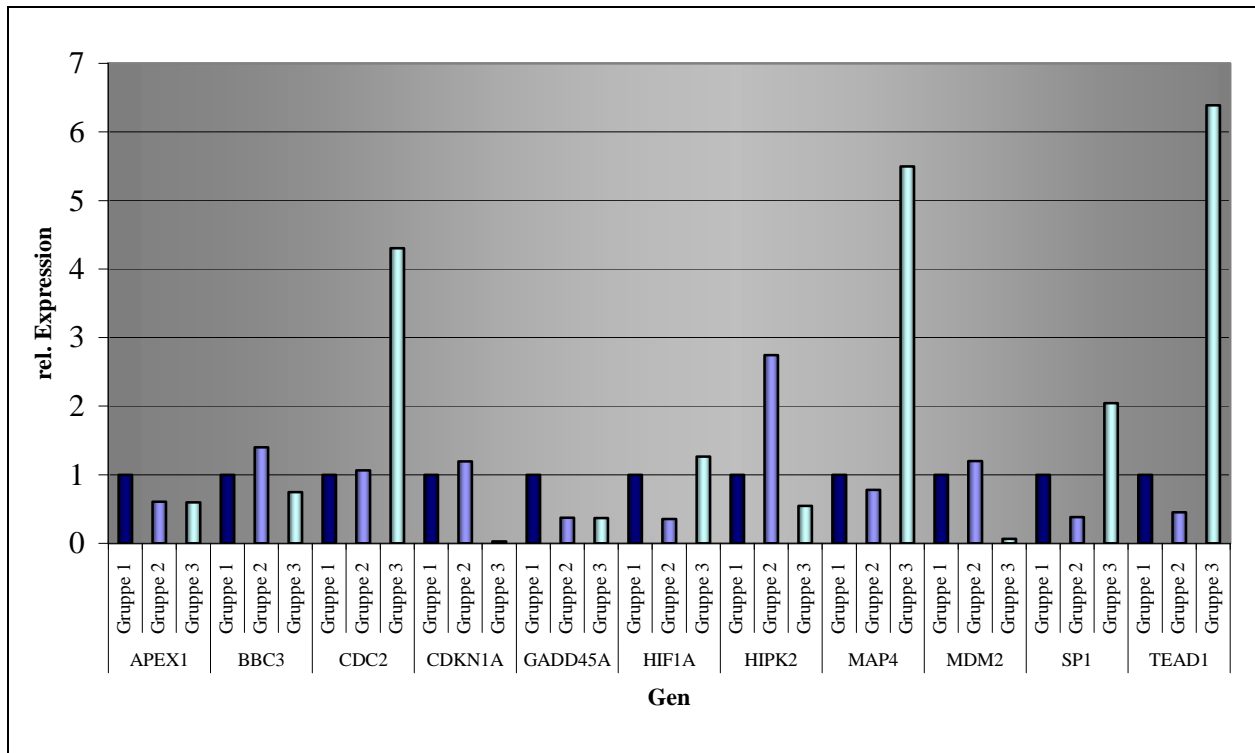


Abb. 38 qRT-PCR: Unterschiede der Genexpression nach Dacarbazin-Gabe in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus. Gr. 1: p53-Wildtyp-Zelllinien; Gr. 2: p53-Punktmutanten; Gr. 3: p53-Proteinabbruch-Mutante. Die Expression der p53-Wildtyp-Zelllinien wurde als 1 gesetzt.

5.11. P53-Proteinexpression in Bezug zu p53-regulierten und p53-regulierenden Genen

DNA-Schäden, hervorgerufen durch ionisierende Strahlen, UV-Strahlung oder DNA-schädigende Agenzien induzieren p53 und führen zur Akkumulation des p53-Proteins. Durch post-translationale Modifikation ist die Zelle in der Lage, umgehend auf zelluläre Schäden zu reagieren und die DNA-Reparatur bzw. den programmierten Zelltod einzuleiten. Dementsprechend konnten wir in Western-Blots nach UV-Bestrahlung und insbesondere nach Behandlung mit Cisplatin, einem potenten Induktor p53-abhängiger Apoptose, eine p53-Akkumulation nachweisen. Die Western-Blot Untersuchungen belegen, dass p53 in allen Zelllinien grundsätzlich induzierbar ist, sofern die Mutation, wie bei IGR-37, nicht zum Verlust nachweisbaren p53-Proteins führt. Die Stabilisierung des p53-Proteins erfolgt durch verschiedene ineinander greifende Mechanismen. Zwei wichtige Regulatoren sind MDM2 und HIPK2.

Bei MDM2 handelt es sich um eine Ubiquitinligase, die direkt an p53 bindet und dessen Degradierung an den Proteasomen fördert. Nach zellulärem Stress wird die Aktivität des MDM2 Proteins supprimiert, was zu einer vermehrten p53-Stabilisierung führt. Andererseits ist MDM2 ein Zielgen, das nach erfolgter p53-Aktivierung infolge von zellulärem Stress p53-abhängig vermehrt transkribiert wird, um nach Beseitigung des Zellschadens eine überschießende p53-Antwort zu verhindern. Insgesamt zeigten die Melanomlinien einen verminderten MDM2-Level im Vergleich zu den primären Melanozyten. Interessanterweise wurde für primäre Melanozyten eine gleich bleibende (UV-Bestrahlungen und Dacarbazin-Gabe) oder sogar verminderte MDM2-Transkription (Cisplatin-Gabe) beobachtet. Dagegen konnte für die Melanomlinien nach Cisplatin-Gabe unabhängig vom p53-Status eine erhöhte Expression festgestellt werden (Abb. 32). Diese Beobachtung legt nahe, dass Störungen in der MDM2-vermittelten Degradation des p53-Proteins bei Melanomen vorliegen. Hiermit könnte der konstitutionell erhöhte p53-Level in der Mehrzahl der Melanome erklärt werden.

Ebenso führen hohe Level an HIPK2, eine Ser/Thr-Proteinkinase, die p53 am Ser46 phosphoryliert, zur Stabilisierung des p53-Proteins.

Konstitutionell konnten keine Unterschiede in der HIPK2-Expression zwischen Melanomen und Melanozyten gefunden werden. Ebenso fehlt eine übereinstimmende Regulation der HIPK2-Transkription unter den einzelnen Versuchsbedingungen (Abb. 39). Allerdings wurde für alle Versuchsbedingungen für die p53-Punktmutanten eine erhöhte HIPK2-Expression detektiert (Abb. 40). Für diese Subpopulation an Melanomen könnte diese Beobachtung einen zusätzlichen Erklärungsansatz für erhöht exprimiertes p53-Protein darstellen.

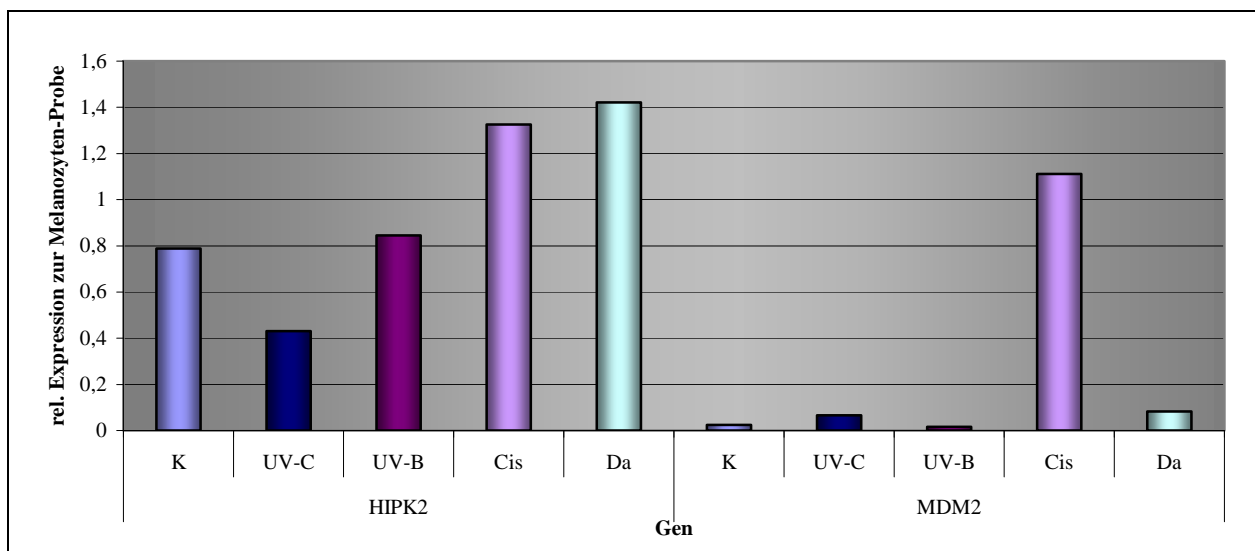


Abb. 39 qRT-PCR: Relative Expression von Genen, die die p53-Proteinstabilität regulieren, unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Expression für Melanome wurde mit primären Melanozyten verglichen. Die Expression der Melanozyten unter den einzelnen Versuchsbedingungen ist gleich 1 gesetzt. Die Melanozyten-Proben sind nicht abgebildet. K: Kontrolle, Cis: Cisplatin, Da: Dacarbazin.

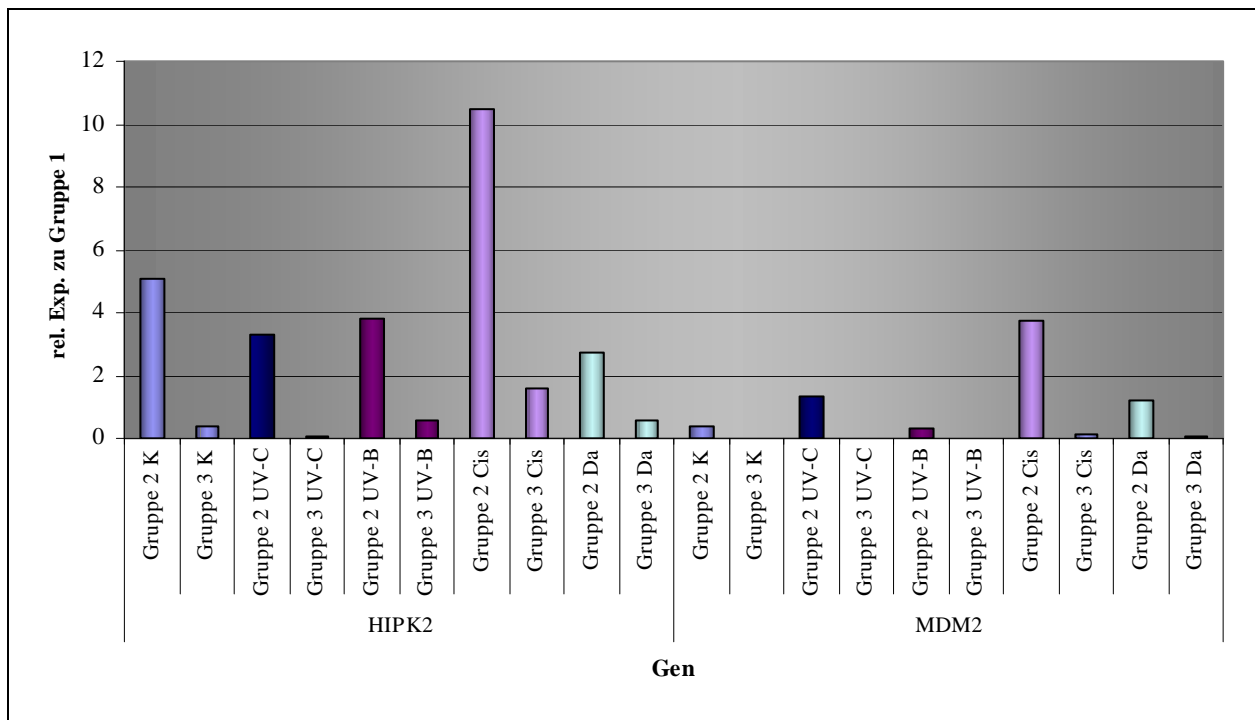


Abb. 40 qRT-PCR: Relative Expression von Genen, die die p53-Proteininstabilität regulieren, unter verschiedenen Versuchsbedingungen in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus. Die Expression der p53-Wildtyp-Zelllinien wurde als 1 gesetzt. Die Gruppe 1 ist nicht abgebildet. Gruppe 1: p53-Wildtyp-Zelllinien; Gruppe 2: p53-Punktmutanten; Gruppe 3: p53-Proteinabbruch-Mutante.

Um eine geschädigte Zelle in die DNA-Reparatur oder den programmierten Zelltod zu überführen, sind unter anderem Modifikationen des Zellzyklus erforderlich. Bei CDC2, CDKN1A, GADD45A, HIF1A, MAP4 und SP1 handelt es sich um Proteine, die an der Zellzyklus-Regulation und DNA-Reparatur beteiligt sind.

Nach Gabe von Cisplatin waren in den Zelllinien die größten Effekte auf Gene der Zellzyklus-Kontrolle zu beobachten. GADD45A wurde in allen untersuchten Zelllinien aufreguliert. Entsprechendes Verhalten wurde für CDKN1A beobachtet, wenngleich bei Melanozyten CDKN1A überraschenderweise Cisplatin-bedingt vermindert exprimiert wurde (Abb. 41). Beide Gene unterliegen normalerweise einer p53-abhängigen Regulation. Die Aufregulation dieser beiden Gene nach Behandlung mit den beiden Zytostatika Cisplatin und Dacarbazin für die Melanomlinie IGR-37, für die keine p53-Proteinexpression nachgewiesen werden konnte, lässt zumindest hier einen weiteren p53-unabhängigen Regulationsmechanismus annehmen.

MAP4 stellt ein weiteres p53-Effektorgen dar, das an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt ist. Es ist bekannt, dass p53 als Suppressor für den MAP4-Promoter fungiert. MAP4 kodiert für ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein. Da Mikrotubuli wesentliche Filamente der Mitose darstellen, die den Zellzyklus vorantreiben, erscheint zur Einleitung des Zellzyklus-Arrests

dessen Suppression erforderlich. Entsprechend dieser Hypothese konnte in allen Zelllinien eine verminderte MAP4-Expression infolge von Cisplatin-Gabe beobachtet werden (Abb. 41). SP1 kooperiert mit p53 in der Induktion von CDKN1A. Demzufolge wäre einer vermehrte Expression von SP1 infolge von zellulärem Stress plausibel. Eine signifikante SP1-Regulation lag nur bei Melanozyten vor. Hier kam es, wie schon für CDKN1A, zur verminderten Expression unter den jeweiligen Versuchsbedingungen (Abb. 41).

Nach Gegenüberstellung von Melanomen und Melanozyten fiel auf, dass CDKN1A und GADD45A unter nahezu allen Versuchsbedingungen in den Melanomlinien schwächer exprimiert war. Dagegen war umgekehrt CDC2 in den Melanomlinien stärker exprimiert (Abb. 42). Das CDC2-Gen kodiert für ein Protein der Ser/Thr Proteinkinase-Familie. CDC2 ist die katalytische Untereinheit von MPF (M-phase promoting factor), welcher essentiell für den G2/M-Übergang des Zellzyklus ist. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die p53-Abbruchmutante IGR-37 hohe CDC2- und niedrige CDKN1A-Expressionslevel aufweist (Abb. 43a, b). Insgesamt legen diese Ergebnisse für alle untersuchten Melanomlinien einen Defekt der funktionellen Integrität des akkumulierten p53-Proteins nahe, welches wesentliche Gene des Zellzyklus beeinflusst. Dies gilt offenbar nicht nur für solche Linien, die eine Aberration im p53 selbst aufweisen, sondern auch für die Melanome, die scheinbar ein intaktes p53 Protein exprimieren.

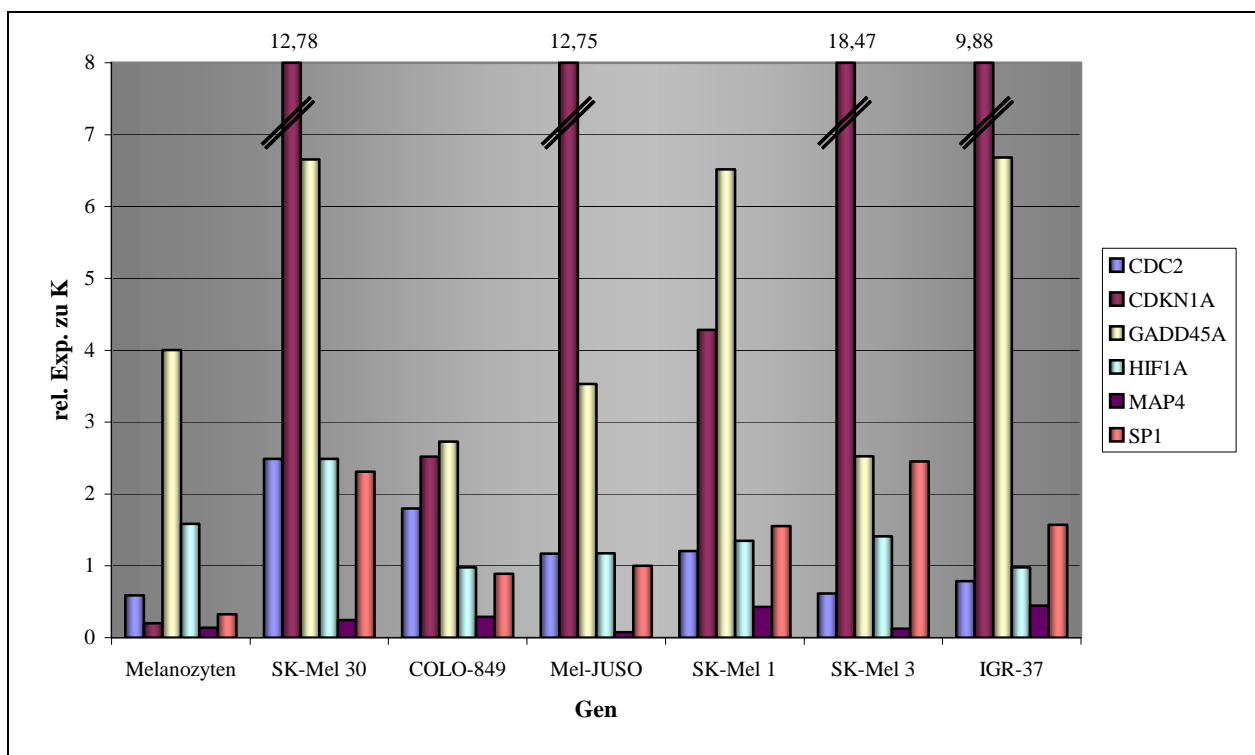


Abb. 41 qRT-PCR: Relative Expression von Genen, die den Zellzyklus und die DNA-Reparatur kontrollieren, nach Cisplatin-Gabe. Die Expression der Gene von unbehandelten Kontrollzellen wurde als 1 gesetzt. Die unbehandelten Kontrollzellen sind nicht abgebildet.

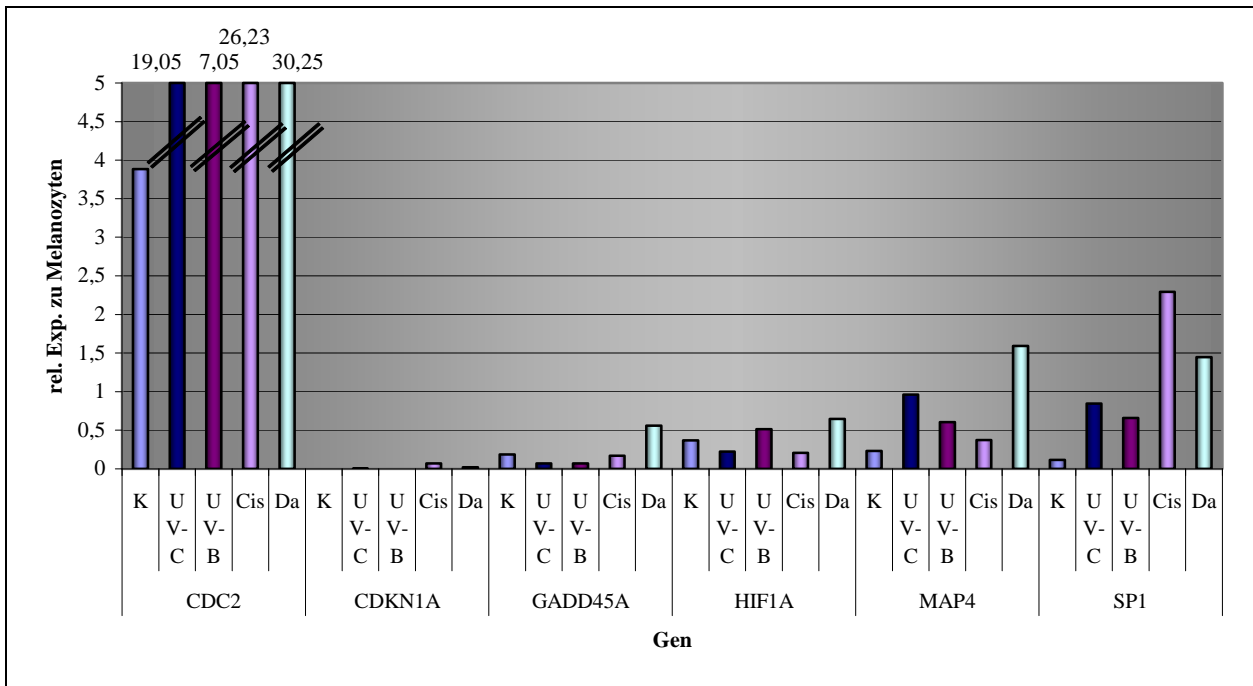


Abb. 42 qRT-PCR: Relative Expression von Genen, die den Zellzyklus und die DNA-Reparatur kontrollieren, unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Expression wurde für Melanome gegenüber Melanozyten verglichen. Die Expression der Melanozyten wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die Melanozyten-Proben sind nicht abgebildet. K: unbehandelte Zellen, Cis: Cisplatin, Da: Dacarbazin.

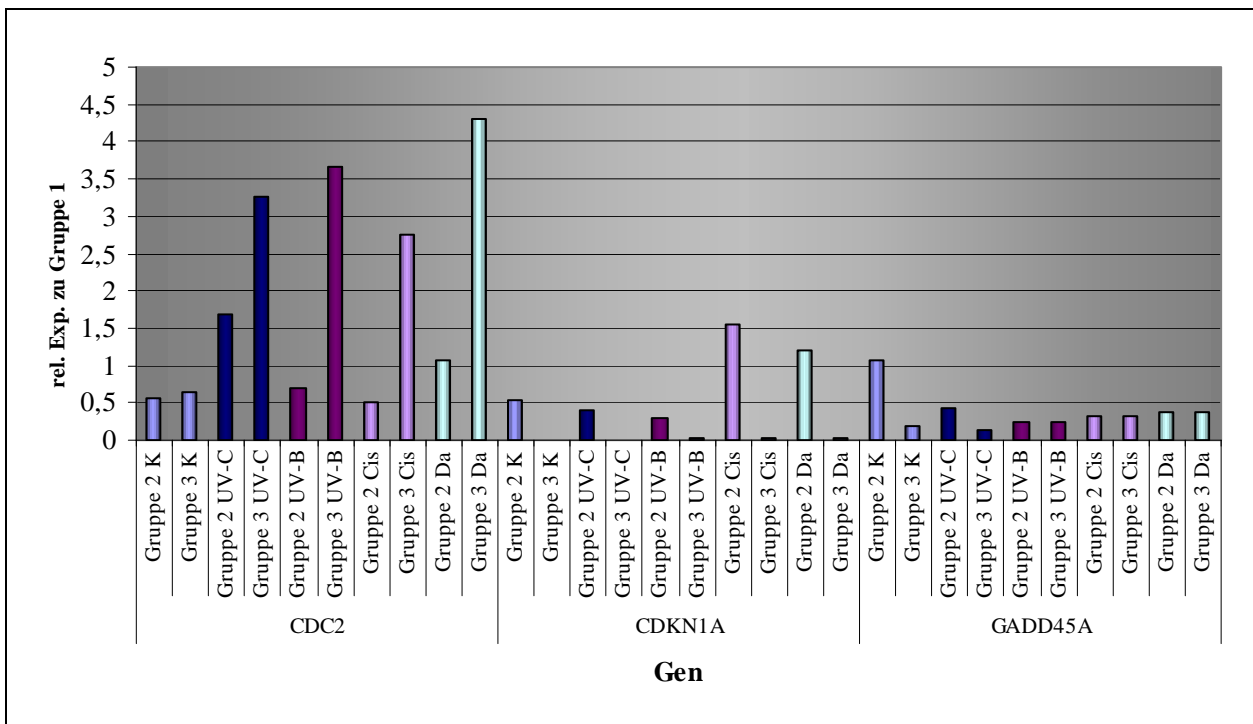


Abb. 43a qRT-PCR: Relative Expression von Genen, die den Zellzyklus und die DNA-Reparatur kontrollieren, unter verschiedenen Versuchsbedingungen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus. Die Expression von Gruppe 1 wurde als 1 gesetzt. Gruppe 1 ist nicht abgebildet. Gruppe 1: p53-Wildtyp-Zelllinien; Gruppe 2: p53-Punktmutanten; Gruppe 3: p53-Proteinabbruch-Mutante. Cis: Cisplatin, Da: Dacarbazin; K: unbehandelte Zellen.

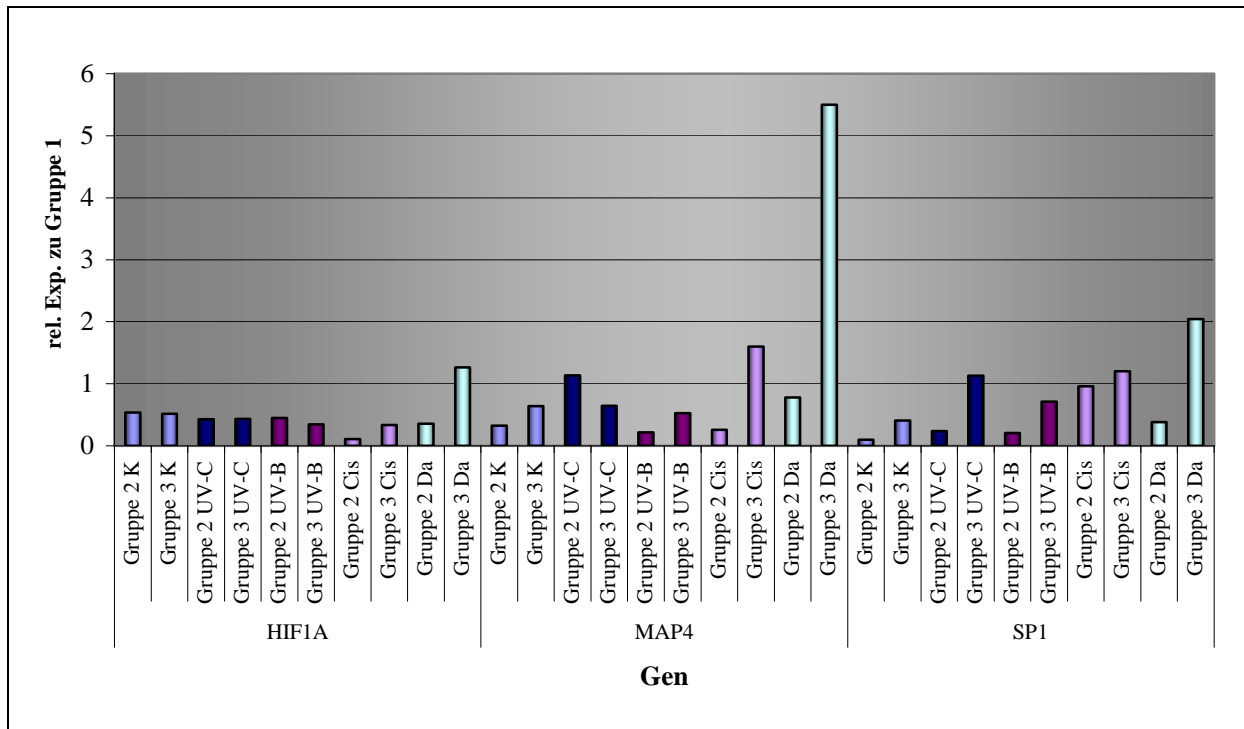


Abb. 43b qRT-PCR: Relative Expression von Genen, die den Zellzyklus und die DNA-Reparatur kontrollieren, unter verschiedenen Versuchsbedingungen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus. Die Expression von Gruppe 1 wurde als 1 gesetzt. Gruppe 1 ist nicht abgebildet. Gruppe 1: p53-Wildtyp-Zelllinien; Gruppe 2: p53-Punktmutanten; Gruppe 3: p53-Proteinabbruch-Mutante. Cis: Cisplatin, Da: Dacarbazin; K: unbehandelte Zellen.

6. Diskussion

6.1. Hintergrund der Arbeit

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor der Haut, der durch sein geringes Ansprechen auf eine Chemotherapie und die schlechte Prognose charakterisiert wird. Die molekularen Ursachen, die diesem biologisch aggressiven Verhalten zugrunde liegen, sind nicht ganz geklärt, wenngleich Störungen im Apoptose-Signalweg angenommen werden. Störungen der funktionellen Integrität des p53-Tumorsuppressorgens wurden für viele solide Tumoren nachgewiesen. Beim malignen Melanom wird häufig eine Akkumulation des p53-Proteins beobachtet, wenngleich Protein-stabilisierende Mutationen rar sind. Die Akkumulation des p53-Proteins impliziert eine Störung in dessen funktionellen Integrität. Diese Beobachtungen bilden die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Es wurden die RNA- und Proteinstabilität sowie die Expression p53-modifizierender Gene als Ursache eines stabilen p53-Proteins untersucht. Ferner wurde die grundsätzliche p53-Induzierbarkeit nach UV-Bestrahlung und Chemotherapie überprüft. Die funktionelle Integrität des akkumulierten Proteins wurde zusätzlich anhand von mehr als 90 Genen, die im Zusammenhang des p53-Signalwegs stehen, analysiert.

6.2. Regelrechte p53-Induktion in p53-exprimierenden Zelllinien

Unabhängig von der Ursache und des molekularen Ablaufs einer p53-Akkumulation, stellt sich die Frage nach der funktionellen Integrität des p53-Signalwegs. In der vorliegenden Arbeit wurde in Western-Blot-Experimenten die p53-Induzierbarkeit nach UV-C- bzw. UV-B-Bestrahlung sowie nach Cisplatin- bzw. Dacarbazin-Gabe untersucht. UV-Strahlung gilt als wichtigster exogener Faktor in der Karzinogenese des malignen Melanoms, wenngleich wenig über die molekularen Mechanismen der malignen Transformation bekannt ist. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte p53-Proteinexpression nach UV-B- bzw. UV-C-Bestrahlung für SK-Mel 1 und Mel-JUSO sowie tendenziell für SK-Mel 3, SK-Mel 30 und COLO-849 nachgewiesen werden. Ein Unterschied der p53-Induktion in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus konnte nicht ermittelt werden. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu früheren Untersuchungen, die eine p53-Induktion ausschließlich bei Wildtyp-p53-Melanomzelllinien nachwiesen (Pedeux et al., 2002; Zhang, 2006). Konsistent mit

Ergebnissen von Pedeux et al. (2002) hatte UV-B-Bestrahlung größeren Effekt auf die p53-Induktion als UV-C-Bestrahlung. Überraschender Weise konnte für Melanozyten keine vermehrte p53-Expression nach UV-Bestrahlung nachgewiesen werden, wie sie in der Literatur beschrieben wird (Bowen et al., 2003; Medrano et al., 1995). Vielmehr nahm die p53-Expression strahlenbedingt ab, für UV-B- stärker als für UV-C-Bestrahlung. Die eingesetzte Strahlenenergie und der damit verbundene Zellschaden stellt eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse dar. In der vorliegenden Arbeit wurde für UV-C-Bestrahlungen eine Energie von 40J/m², für UV-B-Bestrahlung eine Energie von 30J/m² eingesetzt. Demgegenüber setzten andere Arbeitsgruppen zum Teil deutlich höhere Bestrahlungsenergien ein (Pedeux et al. 2002; Medrano et al., 1995).

Neben Versuchen der p53-Induktion durch UV-Bestrahlung wurde die Wirkung von Cisplatin untersucht. Obwohl Cisplatin in der Behandlung des malignen Melanoms aufgrund relativ schlechter Ansprechraten von geringer Bedeutung ist, wurde es für die vorliegende Arbeit gewählt, da seine Wirkung in der Induktion der p53-abhängigen Apoptose weitreichend untersucht wurde (Siddik, 2003). Konsistent mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen ließ sich, unabhängig vom p53-Mutationsstatus, in allen p53-exprimierenden Melanomzelllinien und Melanozyten eine erhöhte p53-Proteinexpression nachweisen (Li et al., 1998). Unter allen durchgeführten Versuchsbedingungen war die p53-Induktion nach Gabe von Cisplatin am stärksten ausgeprägt. Dementsprechend kann von einer regelgerechten p53-Induktion ausgegangen werden.

Zudem wurde die Wirkung von Dacarbazin, dem Standard-Chemotherapeutikum in der Behandlung des malignen Melanoms, untersucht. Keine Zelllinie zeigte eine signifikant veränderte p53-Proteinexpression gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Ebenso konnten Li et al. (1998) keine p53-abhängige Apoptose nach Gabe von Dacarbazin für Melanome nachweisen, so dass p53-unabhängige Wirkmechanismen diskutiert werden müssen.

6.3. Nukleäre Kompartimentierung als Folge der p53-Induktion

Um Informationen über das Kompartimentierungsverhalten nach p53-Induktion zu erhalten, wurden immunhistochemische Präparate aller Zelllinien nach Cisplatin-Behandlung angefertigt. Nach Cisplatin-Behandlung konnte in allen Melanomen mit Wildtyp-p53 und 1/3 der Melanome mit mutiertem p53 das Protein vermehrt nachgewiesen werden. Unabhängig

vom p53-Mutationsstatus verlief die Induktion in 75% der Fälle über eine nukleäre Anreicherung. Melanozyten zeigten nach Cisplatin-Gabe eine deutliche zytoplasmatische und nukleäre Anreicherung. Bis auf Mel-JUSO und der p53-Abbruch-Mutante IGR-37 konnte in allen Melanomzelllinien zytoplasmatisches p53 nachgewiesen werden. Somit konnte sowohl in Western-Blot Experimenten als auch immunhistochemisch der Nachweis einer p53-Induktion durch Cisplatin erbracht und der Nukleus als vorrangiges Kompartiment bestimmt werden. Da p53 seine Aktivität als Transkriptionsfaktor im Kern verwirklicht, war die nukleäre Anreicherung des induzierten p53-Proteins zu erwarten (Shaulsky et al., 1990). Zudem kann p53 transkriptionsunabhängig im Zytoplasma durch direkte Interaktion mit dem pro-apoptotischen Protein BAX zur Apoptoseinduktion führen (Mihara et al., 2003). Eine p53-Anreicherung im Zytoplasma könnte darauf hindeuten, dass dieser Signalweg für Melanozyten bzw. daraus entartete Melanome eine entscheidende Bedeutung hat.

6.4. Die Genexpression in Makro-Arrays und qRT-PCR

Zur Überprüfung der Integrität des p53-Signalwegs wurde in der vorliegenden Arbeit die Makro-Array-Technologie eingesetzt. Hiermit war es möglich, eine Vielzahl von Genen in einem einzigen Versuchansatz zu analysieren. Es wurde so die Expression von Genen untersucht, die die p53-Expression und -Stabilität beeinflussen, die p53 modifizieren, die mit p53 interagieren oder die als Effektor-Gene die Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose-Regulation, DNA-Reparatur, Angiogenese und Metastasierung beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit reichten 5µg Gesamt-RNA pro Makro-Array aus, um genspezifische Hybridisierungen nachzuweisen. Damit weist dieses Verfahren eine hohe Sensitivität auf. Demgegenüber ist die Spezifität dieses Verfahrens insbesondere durch unspezifische Hybridisierungen eingeschränkt (Wang et al., 2006 b). Darüber hinaus sind die Ergebnisse der Makro-Array-Analysen, trotz Software-gestützter Korrekturen, nur bedingt reproduzierbar, da sowohl die Chemolumineszenz-Reaktion als auch die Belichtungskinetik der Röntgenfilme keiner linearen Abhängigkeit folgen (Tropix Inc., Massachusetts, USA). Daher waren die in Makro-Arrays detektierten Gen-Expressionen durch ein zweites Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität zu validieren. Hierzu wurden qRT-PCR-Untersuchungen durchgeführt.

Aufgrund der hohen Detektions-Sensitivität und Sequenz-Spezifität sowie der hohen Präzision reproduzierbarer Ergebnisse gilt die qRT-PCR als „Gold-Standard“ in der quantitativen Bestimmung von Genexpressionen (Wang et al, 2006 b).

Es ist jedoch für die vorliegende Arbeit zu berücksichtigen, dass sowohl die auf den Makro-Arrays aufgespotteten cDNA-Fragmente, als auch die eingesetzten Proben- und Primer-Sequenzen für die qRT-PCR Experimente für CDC2, CDKN1A, GADD45A, GAPDH, MDM2 und p53 durch den Vertreiber (Superarray bzw. Qiagen) geschützt sind, so dass möglicherweise unterschiedliche Bereiche oder sogar unterschiedliche Spleißvarianten der Gene detektiert werden. Dies kann unter Umständen zu abweichenden oder sogar gegensätzlichen Resultaten führen.

6.5. Ursachen konstitutioneller und induzierter p53-Expression

Post-translationale Modifikationen

Störungen der regelgerechten p53-Funktion werden als zentraler Schritt in der Karzinogenese vieler menschlicher Tumore angesehen (Hollstein et al., 1991). P53 weist in normalen, adulten Zellen eine Halbwertszeit von weniger als 35 Minuten auf, so dass es sich einem immunhistochemischen Nachweis entzieht (Maltzman & Czyzyk, 1984). Beim malignen Melanom wurde eine Akkumulation des p53-Proteins in bis zu 97% der untersuchten Tumore beobachtet, was eine Störung der funktionellen Integrität des Proteins impliziert. In fortgeschrittenen Tumorstadien war p53 signifikant häufiger angefärbt, so dass einige Autoren die p53-Überexpression als späte Erscheinung in der Melanom-Progression ansehen (Akshen & Morkve, 1992; Cristofolini et al., 1993; Lassam et al., 1993; Stretch et al., 1991). Dementsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit eine Akkumulation des p53-Proteins bei vier von sechs Melanom-Zelllinien (67%) nachgewiesen werden. P53 ließ sich in allen Metastasen-Zelllinien, ausgenommen der p53-Abbruch-Mutante IGR-37, anfärben. Eine konstitutive p53-Proteinexpression fehlte bei Mel-JUSO, der Zelllinie eines Primarius. In nativen Melanozyten konnte kein p53-Protein angefärbt werden. Die molekularen Mechanismen, die zur Stabilisierung des p53-Proteins in Melanomen führen, sind unklar. Für viele solide Tumore werden proteinstabilisierende p53-Mutationen konstatiert, während diese beim malignen Melanom selten sind (Albino et al., 1994; Florenes et al., 1994; Gwosdz et al., 2006; Iggo et al., 1990; Sparrow et al., 1995; Ziegler et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit

konnte eine Akkumulation unabhängig vom p53-Mutationsstatus in zwei Melanomzelllinien mit mutiertem p53 und zwei Melanomzelllinien mit Wildtyp-p53 beobachtet werden. Dies stützt die These, dass proteinstabilisierende Mutationen beim Melanom eine untergeordnete Rolle für die p53-Akkumulation spielen. Neben proteinstabilisierenden Mutationen werden eine gesteigerte Transkription und/oder Translation, post-translationale Phosphorylierung oder Acetylierung, Komplexbildung mit viralen oder zellulären Proteinen sowie gestörte Proteinabbaukaskaden als Ursache vermehrter p53-Expression diskutiert (Agarwal et al., 2001; Colombo et al., 2005; Finlay et al., 1988; Maltzman & Czyzyk, 1984; Meek, 1998; Minamoto et al., 2001; Mosner et al., 1995; Noda et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit lag bei den Melanom-Linien mit mutiertem p53 die Akkumulation sämtlich im Zytoplasma vor, während Melanome mit Wildtyp-p53 keine Präferenz für ein Zellkompartiment zeigten. Demgegenüber wurde in früheren Untersuchungen vor allem der nukleäre bzw. kombiniert nukleäre und zytoplasmatische p53-Nachweis erbracht (Gwosdz et al., 2006; Lassam et al., 1993; Stretch et al., 1991). Einige Autoren erklären die unterschiedliche p53-Kompartimentierung durch differentes Komplexierungsverhalten mit zellulären Proteinen in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus (Halevy et al., 1989; Hinds et al., 1987; Shaulsky et al., 1990; Stürzbecher et al., 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Protein- und RNA-Stabilität als mögliche Ursachen einer immunhistochemisch detektierbaren p53-Expression überprüft. In den Untersuchungen zur RNA-Stabilität der Replikations- und Transkriptionshemmer Actinomycin D, in den Untersuchungen zur Proteinstabilität wurde der Translationshemmer Cycloheximid eingesetzt.

Die Proteinstabilität der Melanomzelllinien wurde unter zwei verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Zellen wurden mit Cisplatin behandelt, einem potenten Induktor der p53-abhängigen Apoptose, der seine zytotoxische Aktivität durch die Interaktion mit der DNA vermittelt (Li et al., 1998; Siddik, 2003). Cisplatin-behandelte Zellen wurden mit FCS-behandelten Zellen verglichen, um einen möglichen p53-induzierenden Effekt durch FCS auszuschließen (Copeta et al., 2000). Unter allen durchgeführten Versuchsbedingungen zeigten die Melanomzelllinien eine stabile p53-Proteinexpression. Untersuchungen der RNA-Stabilität wurden für unstimulierte Zellen und nach p53-Induktion durch Cisplatin durchgeführt. Unabhängig vom p53-Mutationsstatus zeigten die nicht mit Cisplatin vorinkubierten Zelllinien SK-Mel 30 und SK-Mel 1 ein stabiles p53-Transkript.

Nach 24-stündiger Inkubation mit Cisplatin konnte dies ebenfalls für die Linien COLO-849, SK-Mel 1 und SK-Mel 30 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war bei den Melanomen

SK-Mel 3, Mel-JUSO und IGR-37 eine signifikante Abnahme der p53-Transkriptmenge zu finden. Die primären Melanozyten zeigten keine Abnahme in der p53-Transkriptmenge während des Beobachtungszeitraums von 240min. Dieses Ergebnis ist konsistent mit früheren Berichten, die ebenfalls eine transiente p53-Induktion nach massiver DNA-Schädigung beobachteten (Kastan et al., 1991; Maltzman & Czyzyk, 1984; Noda et al., 2000). Da trotz Blockierung der Transkription bzw. Translation eine stabile RNA- bzw. Proteinexpression ermittelt werden konnte, erscheinen Modifikationen in diesen beiden Schritten der Proteinbiosynthese als Ursache einer konstitutiven p53-Anreicherung als unwahrscheinlich. Kastan et al. (1991) und Mosner et al. (1995) konstatieren post-transkriptionale/-translationale Modifikationen als Ursache einer p53-Akkumulation nach DNA-Schädigung, wobei das akkumulierte p53-Protein negativ auf die eigene Transkription, respektive Proteinbiosynthese rückkoppelt. Eine Phosphorylierungs-Acetylierungskaskade unter Beteiligung der p53-Koaktivatoren p300/CBP und PCAF vermittelt die p53-Transkriptionsaktivität sowie Protein-Stabilität (Sakaguchi et al., 1998). Ferner wirken Histon-Deacetylasen (HDACs) der p53-Stabilisierung entgegen (Ito et al., 2002; Juan et al., 2000; Langley et al., 2002).

Post-transkriptionale/-translationale Modifikationen erscheinen überaus sinnvoll, da eine aufwendige Proteinbiosynthese überbrückt wird. Des Weiteren verhindern negative Rückkopplungsmechanismen die Konsolidierung evtl. geschädigter DNA. Diese Ergebnisse können zum Teil auf das maligne Melanom übertragen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte in den Makro-Array-Untersuchungen für keine der untersuchten Zelllinien eine Cisplatin-bedingte Mehrexpression an p53-mRNA nachgewiesen werden. Zudem wurde nach Behandlung mit Cisplatin eine stabile p53-Proteinexpression in Anwesenheit des Translationshemmers Cycloheximid nachgewiesen. Somit sind post-translationale Modifikationen plausibel. Entgegen den Ergebnissen der Arbeitsgruppen von Kastan (1991) und Mosner (1995), die ausschließlich Wildtyp-p53 zur Autoregulation befähigt sehen, verlief die Cisplatin-bedingte Mehrexpression des p53-Proteins in der vorliegenden Arbeit unabhängig vom p53-Mutationsstatus. Während vermehrte p53-Expressionen infolge DNA-Schaden für Melanozyten und Melanome gleichermaßen durch post-translationale Modifikationen erklärt werden können, bleibt offen, wie es beim malignen Melanom ohne p53-Induktion zur Stabilisierung des Proteins kommt. Da jedoch auch für die unbehandelten Zelllinien eine stabile RNA- und Proteinexpression nachgewiesen werden konnte, sind auch hier post-translationale Mechanismen als Ursache der erhöhten p53-Proteinstabilität wahrscheinlich.

Aberrante HIPK2- und MDM2-Expression

Ein zentraler Regulator von p53 ist MDM2 (mouse double minute-2) bzw. sein humanes Homolog HDM2. MDM2 ist als Zielgen des p53 Signalwegs Bestandteil eines negativen Rückkopplungsmechanismus. MDM2 bindet direkt an den NH₂-Terminus von p53 und behindert so die Interaktion mit p53-Zielgenen. Darüber hinaus fördert MDM2 den p53-Export vom Nukleus ins Zytoplasma und fungiert als eine p53-spezifische Ubiquitinligase. Durch Bindung mehrerer Ubiquitin-Peptide an p53 wird das Protein für den Abbau durch die Proteasomen markiert. Die p53-Degradation erfolgt ausschließlich durch zytoplasmatische Proteasomen, so dass der nukleäre Export zwingend erforderlich ist. In einigen Zelltypen wird P300/CBP als MDM2-Co-Faktor benötigt. Dieser Rückkopplungsmechanismus dient nativen Zellen der p53-Feinregulation (Harms et al., 2004; Vousden & Lu, 2002).

Eine MDM2-Überexpression wurde in vielen soliden Tumoren beobachtet und für eine verstärkte Tumorprogression verantwortlich gemacht (Bond et al., 2004; van der Borgh et al., 2006). Nach zellulärem Stress wird MDM2 supprimiert, was zu einer vermehrten p53-Stabilisierung führt. Hieran beteiligt ist p14ARF, welches ein Produkt der Exone 1 β , 2 und 3 des CDKN2A-Locus auf 9p21 ist. P14ARF bindet direkt an MDM2 und führt es der Degradation zu, was unmittelbar zur p53-Stabilisierung führt (Lakin & Jackson, 1999). Eine Inaktivierung von p14ARF kann daher zu einem vermehrten Abbau von p53 führen und dadurch die Tumorprogression unterhalten (Sharpless, 2005). Ferner kommt es nach DNA-Schäden zur p53-Phosphorylierung an Ser15 und Ser20, was die p53-MDM2-Interaktion reduziert (Lakin & Jackson, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde die MDM2-Expression nach UV-B- und UV-C-Bestrahlung sowie nach Behandlung mit Cisplatin bzw. Dacarbazin an primären Melanozyten und Melanomzelllinien untersucht. Nach beiden Bestrahlungen blieb in den Melanozyten und den Melanomen eine Regulation aus. Lediglich SK-Mel 1 zeigte UV-C-bedingt vermehrt exprimiertes MDM2.

Diese Ergebnisse widersprechen Untersuchungen von Haapajärvi et al. (1999), die in Melanomzelllinien mit Wildtyp- und mutiertem p53 erhöhte MDM2-Expressionswerte 24h nach UV-Bestrahlung nachwiesen. Wu und Levine (1997) zeigten an Myelomzellen, dass die MDM2-Regulation (Protein und mRNA) in Abhängigkeit der UV-Dosis erfolgt. Dabei führten hohe UV-Dosen zu einem frühen, p53-unabhängigen Abfall der MDM2-Expression, gefolgt von einem späten, p53-abhängigen Anstieg der MDM2-Expression. Auch Pedoux et al. (2002) wiesen eine vermehrte MDM2 Expression in Melanomen und Melanozyten 16h nach UV-Bestrahlung nach (UV-B: 150 J/m², UV-C: 50 J/m²). Eine mögliche Erklärung

dieser diskrepanten Ergebnisse könnten die deutlich höheren Bestrahlungsenergien sein, die Pedeux et al. einsetzten. In der vorliegenden Arbeit wurden physiologischere Strahlungsenergien von 30J/m² für UV-B und von 40J/m² für UV-C eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden die Melanozyten allen vorliegenden Melanomzelllinien gegenübergestellt. Konstitutionell wie nach beiden Bestrahlungsarten war MDM2 in den Melanomzelllinien um ein Vielfaches schwächer exprimiert als in Melanozyten. Damit fehlt ein wichtiger Regulator zum Abbau des p53-Proteins. Diese Beobachtung stellt eine mögliche Erklärung für konstitutionell nachweisbares p53-Protein für Melanome dar.

Konsistent mit Ergebnissen der Literatur war für p53-Wildtyp-Zelllinien die MDM2-Expression konstitutionell sowie infolge von Bestrahlung am stärksten (Haapajarvi et al. 1999). Lediglich nach UV-C-Bestrahlung bestand kein signifikanter Unterschied zu p53-exprimierenden Melanomen mit mutiertem p53. Für die p53-Abbruch-Zelllinie war die MDM2-Expression am geringsten.

Die Zelllinien wurden des Weiteren mit Cisplatin inkubiert. Interessanterweise kam es daraufhin bei Melanozyten zu einer verminderten MDM2-Expression, während alle Melanomzelllinien MDM2 verstärkt exprimierten. Insbesondere p53-exprimierende Melanome mit mutiertem p53 zeigten eine deutliche MDM2-Aufregulation. Dieses gegensätzliche Verhalten führt zu einer Angleichung der MDM2-Expression zwischen den nativen Zellen und der Tumorzellen. In der Literatur liegen keine Untersuchungen vor, die die MDM2-Expression bei Melanozyten bzw. Melanomzelllinien infolge von Cisplatin-Gabe untersuchen. Bei Ovarial- und Teratokarzinomzelllinien wurde eine MDM2-Mehrexpression infolge von Cisplatin-Gabe beobachtet (Siemer et al., 1999; Wetzel & Berberich, 1998).

Die Cisplatin-bedingte MDM2-Überexpression ist überraschend, da in Western-Blot-Analysen die Gabe von Cisplatin zur stärksten Expression des p53-Proteins führte, MDM2 jedoch die p53-Degradierung fördert. Darüber hinaus stellt die diskrepante MDM2-Regulation in Melanozyten und Melanomzelllinien, die p53-Abhängigkeit der MDM2-Regulation in den vorliegenden Melanomzelllinien in Frage. Eine p53-unabhängige Komponente in der MDM2-Regulation wurde in der Literatur auch für andere Malignome mehrfach beschrieben (Phelps et al., 2003).

Die Gabe von Dacarbazin hatte auf die MDM2-Expression für die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien keinen Einfluss. Wie bereits für unbehandelte Zellen war MDM2 bei Melanomen deutlich schwächer exprimiert als bei Melanozyten, insbesondere die p53-Abbruch-Zelllinie IGR-37 zeigte um ein Vielfaches schwächere Expressionswerte.

HIPK2 (homodomain-interacting protein kinase-2) ist neben HIPK1 und HIPK3 Mitglied einer Familie von Co-Repressoren, die die Wirkung von Transkriptionsfaktoren wie NK-1, NK-3, Nkx-1.2 und Nkx 2.5 inhibieren (Kim et al., 1998). Neben dieser Funktion besitzt HIPK2 eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität. Nach UV-Bestrahlung wie Behandlung mit Cisplatin kommt es zur HIPK2-Induktion, was zu einer vermehrten Interaktion zwischen HIPK2, p53 und CBP innerhalb der PML (Promyelozyten Leukämie)-Kern-Körper und zur p53-Phosphorylierung an Ser46 führt. Die Phosphorylierung an Ser46 erleichtert die CBP-vermittelte Acetylierung von p53. Dieses p53 besitzt eine erhöhte Stabilität und ist in der Lage die p53-abhängige Transkription und Apoptose zu aktivieren (Di Stefano et al., 2004; D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002). Zudem reguliert HIPK2 die p53-Stabilität, indem es MDM2 inhibiert und damit die MDM2-abhängige Degradation unterbindet (Wang et al., 2001).

Für die vorliegenden Zelllinien konnte kein Unterschied der HIPK2-Expression zwischen Melanozyten und Melanomen ermittelt werden. Demgegenüber bestanden signifikante Unterschiede in Hinblick auf den Mutationsstatus. Während zwischen der p53-Abbruch-Linie IGR-37 und Wildtyp-p53-Zelllinien, ausgenommen nach UV-C-Bestrahlung, kein signifikanter Unterschied in der HIPK2-mRNA-Expression bestand, war das HIPK2-Transkript bei p53-exprimierenden Zelllinien mit mutiertem p53 deutlich stärker exprimiert als in beiden anderen Gruppen. Da HIPK2 unmittelbar an der Stabilisierung des p53-Proteins beteiligt ist, könnte eine erhöhte HIPK2-mRNA-Expression eine mögliche Ursache der erhöhten konstitutiven p53-Expression für Melanome mit mutiertem p53 sein. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Untersuchungen von Wang et al. (2001), die eine vermehrte p53-Protein-Expression und Stabilisierung infolge einer HIPK2-Überexpression beschreiben. Die Untersuchungen ergaben ferner, dass die Stabilisierung nicht durch einen veränderten p53-Phosphorylierungsstatus, sondern durch die MDM2-Degradation vermittelt wird. Wang et al. (2001) wiesen nach, dass die HIPK2-vermittelte Inhibition von MDM2 auf Proteinebene vollzogen wird. Dies ist konsistent mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, worin eine veränderte MDM2-mRNA-Expression keinen Effekt auf die p53-Expression hatte. Während die erhöhte HIPK2-mRNA-Expression eine mögliche Erklärung detektierbaren p53-Proteins bei p53-exprimierenden Zelllinien mit mutiertem p53 ist, scheint HIPK2 keine Rolle in der Stabilisierung des p53-Proteins bei Wildtyp-p53-Melanomen zu spielen.

Interessanterweise kommt es nach Bestrahlung beider Wellenlängen zu einer verminderten mRNA-Expression von HIPK2 bei SK-Mel 3 sowie bei IGR-37 infolge von UV-C- und bei

SK-Mel 1 infolge von UV-B-Bestrahlung. In den übrigen Zelllinien liegt keine strahlenbedingte HIPK2-Regulation vor.

Melanozyten, SK-Mel 30, SK-Mel 3, Mel-JUSO und IGR-37 regulierten die Transkription von HIPK2 nach Gabe von Cisplatin ab. Nach Behandlung mit Dacarbazin regulierten COLO-849 HIPK2 auf, SK-Mel 3 ab. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die in der Literatur beschriebene gesteigerte HIPK2-Protein-Expression infolge von UV-Bestrahlung und Cisplatin-Gabe nicht auf eine veränderte mRNA-Expression zurückzuführen ist (Di Stefano et al., 2004; D`Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002).

6.6. Dysregulation der Zellzyklus-Kontrolle bei Erhalt des p53-Signalwegs

In Western-Blot-Analysen konnte die Induzierbarkeit des p53-Proteins nachgewiesen werden, was jedoch keine Rückschlüsse auf die funktionelle Integrität des p53-Proteins zulässt. Zur Überprüfung der p53-Funktion wurden Makro-Array-Experimente durchgeführt. Mit diesen Makro-Arrays wurden Gene, die die p53-Expression und Stabilität beeinflussen, p53 modifizieren oder mit p53 interagieren sowie p53-Effektor-Gene der Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose-Regulation, DNA-Reparatur sowie Angiogenese- und Metastase-Steuerung hinsichtlich ihrer RNA-Expression untersucht. Als Ausgangsmaterial diente die RNA aller vorliegenden Zelllinien, unbehandelt, nach UV-B- bzw. C-Bestrahlung sowie nach Behandlung mit Cisplatin bzw. Dacarbazin. Die in den Makro-Arrays ermittelte Expression wurde beispielhaft für APEX1, BBC3, CDC2, CDKN1A, GADD45A, HIF1A, HIPK2, MAP4, MDM2, SP1 und TEAD1 in qRT-PCR-Untersuchungen validiert.

Wildtyp-p53 induziert nach DNA-Schaden die Transkription von CDKN1A (p21), das für einen Inhibitor der G1 Cyclin abhängigen Kinase Cdk-4 kodiert und auf diese Weise zu einem Zellzyklusarrest im G1/S Stadium führt (el-Deiry et al., 1993). Diese Funktion wird über die Blockierung der Rb-Phosphorylierung vermittelt. Hypophosphoryliertes Rb bindet den Transkriptionsfaktor E2F, hemmt dessen Aktivität und führt so zum Zellzyklusarrest (Li et al., 2006 a). GADD45A ist ebenfalls durch Aktivierung des p38/JNK-Signalwegs über die MTK1/MEKK4-Kinase an der Regulation des Zellzyklusarrestes nach DNA-Schädigung beteiligt (Kastan et al., 1992, Tront et al., 2006).

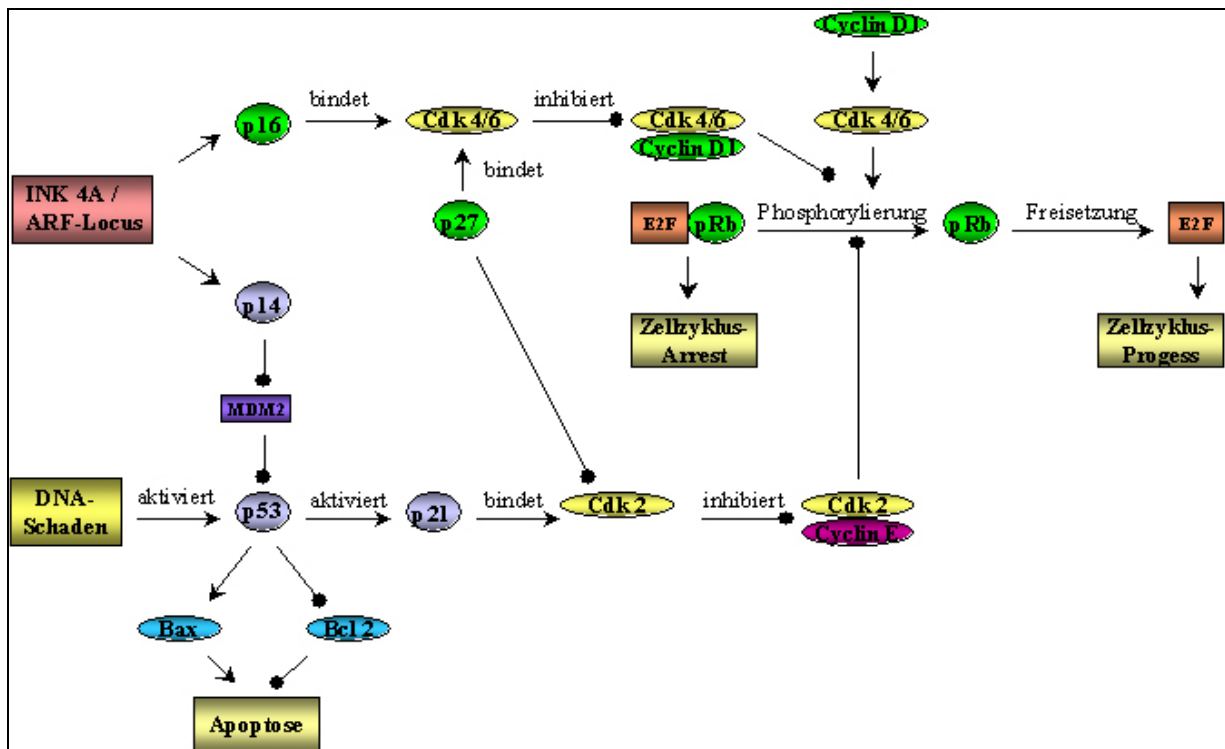


Abb. 44 p53 und Rb Signalweg zur Regulation von Zellzyklus und Apoptose; modifiziert nach Li et al., 2006 a

Die primären Melanozyten sowie alle Melanomlinien, mit Ausnahme der p53-Abbruchmutante IGR-37, zeigten eine hohe p53-Proteinexpression. Eine hohe p53-Proteinexpression impliziert eine Induktion der nachgeschalteten Gene, sofern das akkumulierte Protein funktionell integer ist. In der vorliegenden Arbeit war p21 unter allen durchgeführten Versuchsbedingungen in primären Melanozyten signifikant stärker exprimiert als in Melanomen. Ebenso war GADD45A in den Melanozyten bei unbehandelten Kontrollen, nach beiden Bestrahlungen und Cisplatin-Gabe stärker exprimiert. Nach Dacarbazin-Gabe bestand kein signifikanter Unterschied zu unbehandelten Kontrollen. Dementsprechend ist von einer reduzierten Funktionalität sowohl des in Melanomen konstitutionell überexprimierten, als auch des induzierten p53-Proteins auszugehen.

Es erscheint plausibel, die verminderte p21- und GADD45A-Expression für eine vermehrte Proliferation in Tumorzellen verantwortlich zu machen. Es liegen aktuell nur wenige Studien vor, die eine konstitutionelle GADD45A-Expression vergleichend für verschiedene Melanomstadien untersuchen. In diesen Studien wird eine Assoziation zwischen einer niedrigen GADD45A-Expression und einer Melanomprogression beschrieben (Korabiowska et al., 1997). Überraschenderweise konnten nur wenige Studien den vermeintlichen Zusammenhang zwischen Tumorprogression und niedrigen p21-Leveln nachweisen. Paradoxerweise wiesen die meisten Studien eine erhöhte p21-Protein-Expression in fortgeschrittenen Melanomen nach (Li et al., 2006 a; Mouriaux et al., 2000; Sparrow et al.,

1998; Trotter et al., 1997). Da Mutationen im p21-Gen selten sind, werden weitere Mechanismen diskutiert, die eine Störung der p21-Expression hervorrufen (Soto et al., 2005). Trotter et al. (1997) führen Mutationen in Cyclinen oder Cdks, Überexpression von Cyclinen oder einen p16- oder Rb-Funktionsverlust als mögliche Ursachen verminderter p21-Wirkung bei erhaltener p21-Funktion an. Ferner wird eine erhöhte p21-Stabilität als Ursache für die erhöhte Proteinexpression vorgeschlagen.

Die in der Literatur beschriebene p21-Überexpression lässt sich nur bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichen. Frühere Studien wiesen insbesondere eine vermehrte Expression des p21-Proteins nach, während hier die p21-Expression auf mRNA-Ebene untersucht wurde. In der vorliegenden Arbeit wiesen primäre Melanozyten unter allen Versuchsbedingungen eine höhere p21-Expression als Melanome auf. Dies deutet darauf hin, dass, ähnlich wie im Fall von p53, post-transkriptionelle Mechanismen für die beschriebene p21-Protein-Überexpression verantwortlich sind.

Um die grundsätzliche Induzierbarkeit p53-abhängiger Gene zu überprüfen, wurden die Zelllinien mit UV-B bzw. UV-C bestrahlt sowie mit Cisplatin bzw. Dacarbazin behandelt. Nach p53-Induktion durch UV-B- bzw. UV-C-Bestrahlung unterlagen p21 und GADD45A nur bei SK-Mel 1 und SK-Mel 3 einer Regulation. P21 war bei SK-Mel 1 UV-C-bedingt, bei SK-Mel 3 UV-B-bedingt aufreguliert, GADD45A bei SK-Mel 1 nach Bestrahlung beider Wellenlängen abreguliert. Melanozyten zeigten keine signifikante Regulation. Somit war die strahlenbedingte Induktion von p21 und GADD45A überaus schwach ausgeprägt, verlief unabhängig vom Mutationsstatus und für beide Wellenlängen vergleichbar. Im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen wiesen Pedeux et al. (2002) eine gesteigerte Expression von GADD45A-mRNA nach UV-B- bzw. UV-C-Bestrahlung nach, wobei die UV-B-Bestrahlung stärkeren Einfluss auf die mRNA-Expression hatte. Wie bereits für die p53-Expression diskutiert, könnte auch hier die Diskrepanz in den höheren Bestrahlungsenergien begründet sein, die einen ausgeprägteren Zellschaden zur Folge hätten und somit zu einer stärkeren Induktion des p53-Signalwegs führten.

Ein einheitliches Regulationsmuster ergab sich nach Cisplatin-Gabe. GADD45A war in allen vorliegenden Zelllinien verstärkt exprimiert, p21 in allen Melanomen. Allerdings erreichten die hochregulierten mRNA-Level nicht die in Melanozyten bereits konstitutiv exprimierten Mengen. Unerwarteter Weise wurde bei Melanozyten p21 abreguliert. Hieraus ist zu folgern, dass in Melanomen, unabhängig vom Mutationsstatus, eine grundsätzliche p21- und GADD45A-Induzierbarkeit besteht, die dabei gebildete Menge an mRNA jedoch gering ist.

Dies legt eine Einschränkung der funktionellen Integrität des akkumulierten p53-Proteins nahe.

Konsistent mit den vorliegenden Ergebnissen konstatieren Pedoux et al. (2002) eine GADD45A-Induktion unabhängig vom Mutationsstatus, wobei die Induktion für Wildtyp-p53-Zelllinien deutlich höher war als für Zelllinien mit mutiertem p53. Damit existieren für GADD45A sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige Aktivierungsmechanismen. Für p21 wird hingegen ausschließlich eine p53-abhängige Aktivierung postuliert (el-Deiry et al., 1993). Im Gegensatz dazu verlief die p21-Induktion in den vorliegenden Zelllinien unabhängig vom Mutationsstatus.

Um die Frage nach Unterschieden der GADD45A- und p21-Induktion in Abhängigkeit vom Mutationsstatus zu klären, wurden die Zelllinien entsprechend ihres Mutationsstatus in Gruppen zusammengefasst. Es zeigte sich, dass kein signifikanter p21-Expressionsunterschied zwischen Wildtyp-p53-Zelllinien und p53-exprimierenden Melanomen mit mutiertem p53 bestand. Davon ausgenommen war ein tendenzieller Expressionsunterschied nach UV-B-Bestrahlung zugunsten der Wildtyp-p53-Zelllinien. Demgegenüber war p21 sowohl in Wildtyp-p53-Zelllinien als auch in p53-exprimierenden Melanomen mit mutiertem p53 um ein Vielfaches höher exprimiert als bei der p53-Abbruchmutante IGR-37.

GADD45A war in der Gegenüberstellung der Gruppen hinsichtlich ihres Mutationsstatus für alle untersuchten Bedingungen in Wildtyp-p53 Zelllinien stärker exprimiert als bei IGR-37. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass GADD45A nach UV-B-Bestrahlung und Cisplatin-Gabe sowie tendenziell nach Gabe von Dacarbazin bei Wildtyp-p53-Zelllinien stärker exprimiert war als in p53-exprimierenden Melanomen mit mutiertem p53. Die Überlegenheit von Melanomen mit Wildtyp-p53 in der UV-B-bedingten Induktion von GADD45A ist konsistent mit Ergebnissen von Pedoux et al. (2002).

Die Abbruchmutante IGR-37 zeigte unter allen untersuchten Bedingungen eine p21- und GADD45A- Expression, die um ein Vielfaches niedriger war als in den übrigen Zelllinien. Dabei verlief die beobachtete p21- und GADD45A-Induktion ohne messbare p53-mRNA- oder Proteinexpression. Es bleibt offen, ob die konstitutive p21- und GADD45A-Expression einer p53-Restfunktion unterliegt, oder ob p53-unabhängige Induktions-Mechanismen eine Rolle spielen (Ohtani-Fujita et al., 1998; Peled et al., 1996; Sato et al., 2002). Die streng parallelen Verläufe der p53-Protein- und p21- bzw. GADD45A-mRNA-Expression, sowohl nach Bestrahlungen, als auch nach Cisplatin-Gabe, sprechen für eine p53-abhängige Induktion.

Interessanter Weise kommt es zwischen IGR-37 und den übrigen Zelllinien zu einer übereinstimmenden Expressionsveränderung weiterer Gene des p53-Signalwegs. Es ist möglich, dass p53-unabhängige Mechanismen ein „funktionelles p53-Mimikry“ für dieses Subset an Genen vollziehen.

Hierbei könnten die p53-Homologe p63 und p73 eine entscheidende Rolle spielen. Beide p53-Homologe werden infolge zellulären Stresses aktiviert und sind in der Lage einige der p53-Zielgene zu induzieren. Während p53 hauptsächlich in einer Isoform vorliegt, werden sowohl p63 als auch p73 in einer Vielzahl von Isoformen exprimiert, die teils gleich gesinnte, teils aber auch konträre Eigenschaften besitzen (DeYoung & Ellisen, 2007; Harms et al., 2004). Die Expression von p63 und p73 in Melanomen ist nicht so gut untersucht wie die p53 Expression. Kulesz-Martin et al. (2005) beschrieben die Expression zweier p63-Isoformen. Zudem gibt es Anhaltspunkte, dass Transkriptions-inhibierende p73-Isoformen in Melanomen überexprimiert werden (Tuve et al., 2004).

Während Cisplatin in der Induktion p53-abhängiger Apoptose etabliert ist, sind die molekularen Mechanismen nach Dacarbazin-Gabe, insbesondere in Bezug auf den p53-Signalweg, nicht hinreichend geklärt. Alkylierende Agenzien wie Dacarbazin oder das oral verfügbare Temozolomid führen zur Bildung von O⁶-Methylguaninen in der DNA. Das Mismatch Repair System erkennt und korrigiert derartige Replikationsfehler (Karran et al., 1993). Bei Persistenz der O⁶-Methylguanine in der DNA kommt es zur Induktion der Apoptose (Tentori et al., 1997). D'Atri et al. (1998) wiesen an lymphoblastoiden Zelllinien nach, dass die Apoptose-Induktion durch O⁶-Methylguanine nach Behandlung mit Temozolomid eines intakten Mismatch Repair Systems bedarf. Hierbei kam es zu einer p53- und konsekutiven p21-Induktion. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass Störungen im Mismatch Repair System zu einer eingeschränkten Induktion des p53-Signalwegs führen, was sich in fehlender bzw. mangelnder p21-Induktion ausdrückt (Anthony et al., 1996). Konsistent mit diesen Studien konnte in der vorliegenden Arbeit eine p21-Induktion nach Gabe von Dacarbazin in sechs von sieben untersuchten Zelllinien beobachtet werden. Ferner war eine Induktion von GADD45A in drei von sieben Zelllinien zu beobachten. Während die Induktion von p21 und GADD45A nach Cisplatin-Gabe mit gestiegenen Leveln an p53-Protein vergesellschaftet war, konnte nach Dacarbazin-Gabe weder auf mRNA-, noch auf Proteinebene der Nachweis einer p53-Akkumulation erbracht werden. Während die Zelllinien nach Bestrahlung und Cisplatin-Gabe in zahlreichen Genen eine übereinstimmende Regulation zeigten, war die Regulation p53-abhängiger Gene infolge Dacarbazin-Gabe überaus uneinheitlich. Eine gemeinsame Genregulation, neben jener von GADD45A und p21,

lag nur vereinzelt zwischen wenigen Zelllinien vor. P53-unabhängige Mechanismen der Apoptose-Induktion, die unter Umständen in Interaktion mit dem p53-Signalweg stehen, könnten diese Beobachtungen erklären (Peled et al, 1996).

Neben p21 und GADD45A wurde in der vorliegenden Arbeit auch das an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligte SP1-Gen untersucht. Die Bindung von p53 an den Transkriptionsfaktor SP1 führt zur Aktivierung zahlreicher Gene (Borellini & Glazer 1993; Gualberto & Baldwin, 1995; Ohlsson et al., 1998; Torgeman et al., 2001). So kooperiert p53 mit SP1 in der p21-Induktion. Diese Kooperation führt zu einer Regulation der antagonistischen Wirkungen von Histon-Deacetylasen (HDACs) und deren Inhibitoren. HDACs wirken der p21-Induktion entgegen, während einige HDAC-Inhibitoren die p21-Induktion fördern (Han et al., 2000; Lagger et al., 2003; Sambucetti et al., 1999; Sowa et al., 1997). Die transkriptionale p21-Aktivierung durch HDAC-Inhibitoren erfolgt über ein Chromatin-Remodeling, dem eine Acetylierung der Histone H3 und H4 innerhalb der p21-Promotorregion folgt (Sambucetti et al., 1999). Die p21-Promotorregion weist Bindungsstellen für SP1 auf, die Teilabschnitte enthalten, die für die p21-Aktivierung durch HDAC-Inhibitoren essentiell sind (Huang et al., 2000). Lagger et al. (2003) wiesen nach, dass p53 mit HDAC1 um die gleiche Bindungsstelle an SP1 konkurriert. Nach p53-Induktion kommt es zur vermehrten Bindung von p53 an den COOH-Terminus von SP1, was zur Histon-Acetylierung am p21-Promotor und einer damit verbundenen p21-Induktion führt. Somit stellt p53 einen direkten Antagonisten von HDAC1 dar. Es ist jedoch hinzuzufügen, dass ferner Interaktionen zwischen p53 mit dem Sin3/HDAC1-Repressor-Komplex bestehen, was zur Repression von Genen führt, wie es für MAP4 nachfolgend beschrieben wird.

In der vorliegenden Arbeit war SP1 in Melanozyten konstitutionell stärker exprimiert als in Melanomen. Demgegenüber bestand weder nach Bestrahlungen, noch nach Chemotherapie ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Somit fällt eine verminderte SP1-mRNA-Expression als Ursache der oben beschriebenen Defizienz der p53-Effektorgene (p21 und GADD45A) aus. Bereits 1979 konnten Engvall und Yonemoto nachweisen, dass in Tumoren eine veränderte Expression des SP1-Proteins rar ist.

Es liegen wenige Studien vor, die die funktionellen Abläufe der SP1-Regulation untersuchen. Zeng et al. (2005) wiesen an Kulturen von Zellen der Adenohypophyse des Schweins gesteigerte SP1-RNA-Level nach Gabe von Gonadotropin-Releasing-Hormonen (GnRH) nach. Shin et al. (1992) ermittelten an der Melanomzelllinie HA-A eine zunehmende SP1-Aktivität nach Gabe von 5-Azacytidin, ohne dass es zu einer signifikanten Veränderung des

SP1-mRNA- oder Protein-Levels kam. In der vorliegenden Arbeit kam es bei Melanozyten unter allen Versuchsbedingungen zu einer verminderten SP1-mRNA-Expression verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Nach Dacarbazin-Gabe kam es auch bei der Melanom-Linie SK-Mel 1 zu einer Abregulation.

Nach Gliederung der Zelllinien entsprechend ihres Mutationsstatus, bestand zwischen der p53-Abbruch-Zelllinie IGR-37 und den Wildtyp-p53-Zelllinien kein signifikanter Unterschied der SP1-Expression. IGR-37 und Wildtyp-p53-Zelllinien exprimierten SP1 unter allen Bedingungen, ausgenommen nach Cisplatin-Behandlung, stärker als p53-exprimierende Melanome mit mutiertem p53. Es wurde bereits ausgeführt, dass die p21-Expression bei IGR-37 einen Bruchteil der p21-Expression bei Wildtyp-p53-Zelllinien ausmacht. Ursächlich hierfür wurde die mangelnde p53-Proteinexpression bei IGR-37 angenommen. Sofern die SP1-mRNA einer p53-abhängigen Regulation unterliegt, wäre ein Expressionsverhältnis ähnlich jenem für p21 zu erwarten gewesen. Demgegenüber war die SP1-Expression bei IGR-37 und Wildtyp-p53-Zelllinien vergleichbar. Demzufolge dürfte die ermittelte SP1-Regulation p53-unabhängig ablaufen bzw. einer komplexen Regulation mit p53-Beteiligung unterliegen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in den vorliegenden Zelllinien eine Störung des Transkriptionsfaktors SP1 als unmittelbare Ursache einer p21-Dysregulation ausfällt und SP1 keiner direkten p53-Regulation zu unterliegen scheint.

In der vorliegenden Arbeit wurden des weiteren CDC2 und MAP4 in qRT-PCR-Untersuchungen überprüft. Beide Gene sind an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt. Das CDC2-Gen (CDK1-Gen) kodiert für ein Protein der Ser/Thr Protein-Kinase-Familie. Das Protein stellt die katalytische Untereinheit von MPF (M-phase promoting factor) dar, welcher essentiell für den G2/M-Übergang des Zellzyklus ist. Die Bindung von Cyclin B und die Phosphorylierung an Thr¹⁶¹ durch CAK (CDK aktivierende Kinase) sind für die CDC2-Funktion unerlässlich. Während der G2-Phase bleibt der CDC2/Cyclin B-Komplex durch Phosphorylierungen an Tyr¹⁵ und Thr¹⁴ durch WEE1 und MYT1 inaktiv. Tyr¹⁵ und Thr¹⁴ werden mit Beginn der Mitose durch CDC25 dephosphoryliert. Im Sinne einer positiven Rückkopplung kommt es zur Phosphorylierung von CDC25 durch den aktivierten CDC2/Cyclin B-Komplex. Infolge von DNA-Schädigung wird CDC2 p53-unabhängig und p53-abhängig inhibiert. ATM und ATR werden nach DNA-Schaden p53-unabhängig stimuliert und führen ihrerseits zur Aktivierung von CHK1 und CHK2. CHK1 und CHK2 phosphorylieren CDC25, was die Bindung an 14-3-3-Proteine erleichtert, die CDC25 in das

Zytoplasma exportieren und hier gebunden halten, wo es CDC2 nicht aktivieren kann. Ferner wird ATM und ATR die Fähigkeit der p53-Induktion infolge zellulären Stresses zugeschrieben. In die p53-abhängige Inaktivierung von CDC2 sind p21, 14-3-3 σ und GADD45A eingebunden. P21 inhibiert durch direkte Bindung an CDC2 bzw. Cyclin B. 14-3-3 σ bindet CDC2 im Zytoplasma, so dass es zur Mitose-Induktion unfähig ist. GADD45A führt zur Dissoziation des CDC2/Cyclin B-Komplexes (Taylor & Stark, 2001). Eine direkte Repression der CDC2-Transkription durch p53 wurde ebenfalls beschrieben (Imbriano et al., 2005).

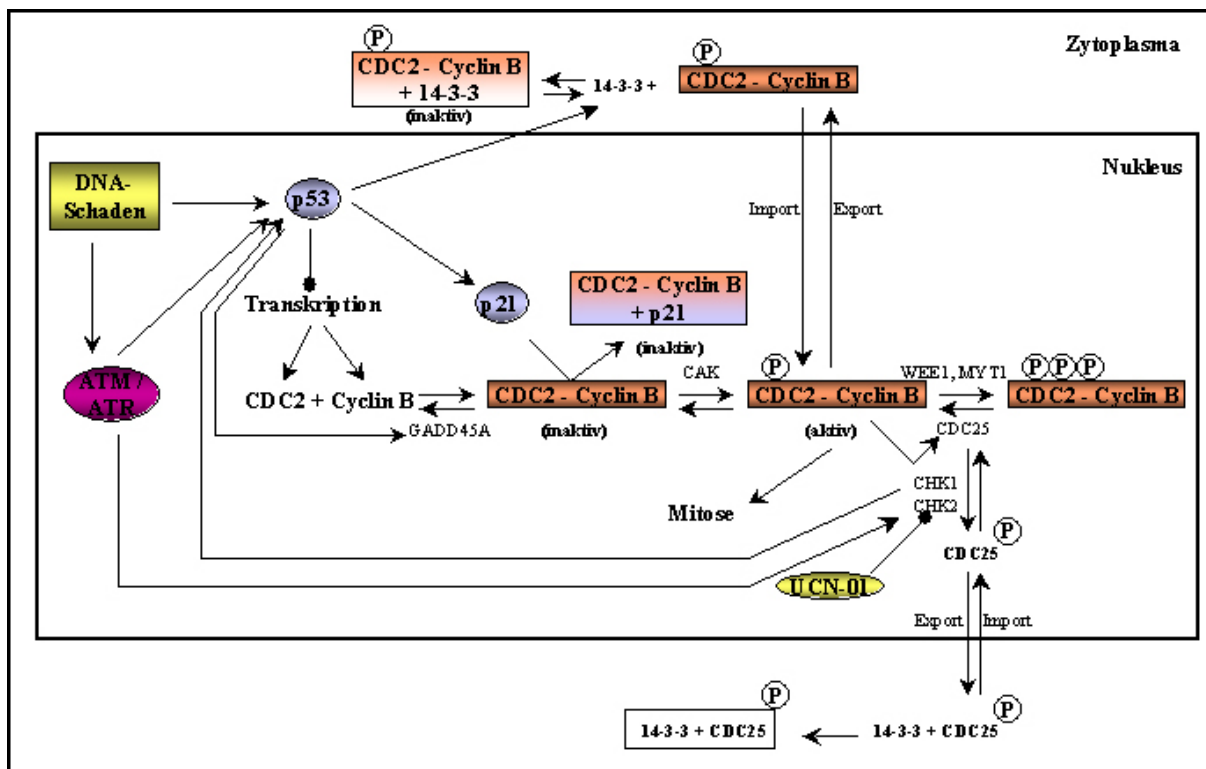


Abb. 45 p53-abhängige und unabhängige Regulation von CDC2 nach DNA-Schaden; modifiziert nach Taylor & Stark, 2001

In der vorliegenden Arbeit war die CDC2-mRNA-Expression unter allen durchgeführten Versuchsbedingungen in Melanomen stärker ausgeprägt als in Melanozyten. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Untersuchungen von Tran et al. (1998) bzw. Seykora et al. (2003), die eine erhöhte CDC2-Proteinexpression, respektive mRNA-Expression, in Melanomen verglichen mit benignen Nävi nachwiesen. Da p53 in der Lage ist, die CDC2-Transkription zu reprimieren, erklärt eine Störung der funktionellen p53-Integrität erhöhte CDC2-mRNA-Level. Demgegenüber ist es kaum möglich, die geringere p21- und GADD45A-mRNA-Expression der vorliegenden Melanomzelllinien für die erhöhte CDC2-mRNA-Expression

verantwortlich zu machen. Zwar konnten einige Autoren nachweisen, dass eine Überexpression an p21 zu einer reduzierten CDC2-Promotor-Aktivität und damit zu geringeren mRNA-Konzentrationen führt, allerdings wird die wesentliche inhibitorische Wirkung von p21 und GADD45A auf Proteinebene vermittelt (Chang et al., 2000; Taylor et al., 2001; Taylor und Stark, 2001).

Nach UV-C- sowie UV-B-Bestrahlung zeigten COLO-849, SK-Mel 1 und IGR-37 eine strahlenbedingte Aufregulation von CDC2. Melanozyten, SK-Mel 3, SK-Mel 30 und Mel-JUSO zeigten keine signifikante Regulation von CDC2 infolge von Bestrahlung.

Es liegen nur vereinzelt Studien vor, die Veränderungen der CDC2-mRNA-Expression infolge von Bestrahlung, Cisplatin oder Dacarbazin-Behandlung untersuchten. Petrocelli und Slingerland (2000) wiesen an der Melanomzelllinie WM35 nach, dass die CDC2-Protein-Expression infolge UV-B-Bestrahlung unverändert blieb. Demgegenüber fiel die CDC2-Expression nur minimal ab, was mit einer deutlich zunehmenden Assoziation zu 14-3-3 verbunden war. Der sinkende Gehalt an CDC25 sowie die vermehrte Assoziation mit 14-3-3 wurden als Ursache einer gesunkenen Aktivität des Cyclin B1/CDC2-Komplexes interpretiert. Dieses Ergebnis ist nur in soweit mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Einklang zu bringen, als dass eine unveränderte CDC2-Proteinexpression keine massiven Veränderungen der Transkription vermuten lässt.

CDC2 unterlag nach Behandlung mit Cisplatin bei keiner der untersuchten Zelllinien einer Regulation, nach Dacarbazin-Behandlung war CDC2 bei Melanozyten und SK-Mel 1 vermindert exprimiert. Während die p53-Induktion durch Cisplatin zu einer deutlich vermehrten p21/GADD45A-Expression bei allen vorliegenden Zelllinien führte, war bei keiner Zelllinie die erwartete verminderte CDC2-Expression zu ermitteln. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Untersuchungen von Doi et al. (2002), die an Teratokarzinom-Zellen der Maus zeigten, dass es unter Behandlung mit Cisplatin zur Reduktion der CDC2-Proteinexpression bei gleich bleibendem CDC2-mRNA-Level kommt. Dies unterstreicht die These, dass die CDC2-Regulation im Wesentlichen auf Proteinebene vermittelt wird. Die CDC2-Regulation durch p53-abhängige Modulation der Transkription ist von untergeordneter Bedeutung (Chang et al., 2000; Taylor & Stark, 2001).

Nach Einteilung der Zelllinien entsprechend ihres Mutationsstatus bestand zwischen den Gruppen keine konstitutionell differente CDC2-Expression. Demgegenüber war CDC2 bei IGR-37 nach UV-Bestrahlungen wie Chemotherapie gegenüber p53-exprimierenden Zelllinien stärker exprimiert. Da IGR-37 keine detektierbaren p53-Mengen exprimiert und

damit die Promotoraktivität von CDC2 vermutlich nicht reprimiert wird, ist die vermehrte CDC2-mRNA-Expression bei IGR-37 plausibel.

MAP4 stellt ein weiteres p53-Effektorgen dar, das an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt ist. MAP4 kodiert für ein nicht-neurales Mikrotubuli-assoziiertes Protein. Mikrotubuli sind an der Mitose, Zellmotilität und dem intrazellulären Vesikel-Transport beteiligt. In in-vitro-Untersuchungen wurden MAP2, MAPT und MAP4 modulierende Eigenschaften auf die Mikrotubuli-Funktion zugesprochen (Bulinski & Borisy, 1980; Cleveland et al., 1977; Murphy & Borisy, 1975). Während für MAP2 und MAPT auch in-vivo eine Mikrotubuli-stabilisierende Wirkung nachgewiesen werden konnte, liegen für MAP4 widersprüchliche Ergebnisse vor (Barlow et al., 1994; Kanai et al., 1989; Nguyen et al., 1997). Nguyen et al. (1997) konnten nachweisen, dass eine MAP4-Überexpression zu einer Verlangsamung der G1-Phase des Zellzyklus führt, ohne dabei die Apoptose oder einen Zellzyklusarrest zu induzieren. MAP4 selbst stellt ein Zielgen der p53-abhängigen Apoptose dar. Die Induktion von Wildtyp-p53 reprimiert die MAP4-Expression und erhöht so die Empfindlichkeit gegenüber Vinkaalkaloiden, einem Vertreter der Spindelgifte (Bash-Babula et al., 2002; Murphy et al., 1996). Dies impliziert, dass eine MAP4-Überexpression zu einer gestörten Apoptose führt (Murphy et al., 1996). Die genauen molekularen Mechanismen, die zur MAP4-Repression führen, sind unklar. Murphy et al. (1999) postulieren eine Inhibition der MAP4-Transkription durch Wildtyp-p53 in Zusammenarbeit mit dem Co-Repressor SIN3A und HDAC (Histon-Deacetylase).

Die MAP4-Regulation infolge von Bestrahlung war bei den vorliegenden Zelllinien von untergeordneter Bedeutung. Bei SK-Mel 30 war MAP4 nach UV-B-Bestrahlung stärker exprimiert als in der Kontrolle, bei SK-Mel 1 schwächer. Eine verallgemeinernde Interpretation dieses Ergebnisses ist nicht möglich, da die übrigen Zelllinien keine MAP4-Regulation aufwiesen. Eine repressive Wirkung von Wildtyp-p53 auf die MAP4-Expression, wie von Chao et al. (2000) beobachtet, konnte nicht nachgewiesen werden.

Nach Behandlung mit Cisplatin zeigten alle Zelllinien eine MAP4-Abregulation, wenngleich diese Regulation in zwei der sechs Zelllinien kein signifikantes Niveau erreichte. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen konnte dies für alle Zelllinien unabhängig vom Mutationsstatus nachgewiesen werden (Bash-Babula et al., 2002; Murphy et al., 1996 u. 1999; Ookata et al., 1995). Dabei kam es bei p53-exprimierenden Zelllinien mit mutiertem p53 sowohl nach UV-B-Bestrahlung als auch Behandlung mit Cisplatin zur stärksten

Expressionsveränderung. Nach Behandlung mit Dacarbazin kam es zu einer uneinheitlichen MAP4-Regulation.

Da Mikrotubuli wesentliche Filamente der Mitose darstellen, ist es nicht verwunderlich, dass eine Assoziation zwischen MAP4 und CDC2, das den G2/M-Übergang unterhält, besteht. CDC2 phosphoryliert MAP4, was zwar keine Auswirkung auf die Bindung von MAP4 zu den Mikrotubuli hat, jedoch die Mikrotubuli-stabilisierende Wirkung von MAP4 deutlich einschränkt (Ookata et al., 1995). Die repressive Wirkung von CDC2 auf MAP4 ist naheliegend, da die MAP4-bedingte Verzögerung des Zellzyklus dem G2/M-Übergang entgegenwirkt. P53 inhibiert die Wirkung von CDC2, was konsekutiv die Wirkung von MAP4 verstärken würde. Dies hätte zur Folge, dass es zur Verlangsamung der G1-Phase des Zellzyklus käme, ohne dabei zur Apoptose oder zum Zellzyklusarrest zu führen. Um einen regelgerechten Ablauf des Zellzyklus-Arrests, respektive der Apoptose zu gewährleisten, ist die von Murphy et al. (1999) postulierte direkte MAP4-Inhibition durch p53 erklärbar.

Im Gegensatz zu p21, GADD45A und CDC2 waren in der vorliegenden Arbeit Unterschiede der MAP4-Expression zwischen Melanozyten und Melanomen gering ausgeprägt. MAP4 war konstitutionell sowie nach Behandlung mit Cisplatin bei Melanozyten nur tendenziell stärker exprimiert als bei Melanomen.

Zusammenfassend ist anhand der untersuchten Gene der Zellzyklus-Kontrolle davon auszugehen, dass der p53-Signalweg in Hinblick auf die Zellzyklus-Kontrolle grundsätzlich erhalten ist. Es bestehen jedoch signifikante Unterschiede zwischen Melanozyten und Melanomen. In Melanozyten sind p21 und GADD45A signifikant stärker und CDC2 schwächer exprimiert als in Melanomen. Aberrante SP1- und MAP4-Expression sind bei den untersuchten Zelllinien von untergeordneter Bedeutung. Störungen der regelrechten Zellzyklus-Kontrolle stellen einen Erklärungsansatz für die mangelnde Apoptose-Induktion infolge von DNA-Schäden dar. Eine Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus scheint allerdings nicht zu bestehen.

6.7. Verminderte BBC3-Induktion als Ursache beschriebener Apoptose-Resistenz

BBC3 (PUMA = p53 upregulated modulator of apoptosis) ist ein Mitglied der BCL-2 Superfamilie mit pro-apoptotischen Eigenschaften. Nach p53-Induktion durch DNA-Schaden kommt es zur schnellen Aufregulation der BBC3-mRNA, mit konsekutiv erhöhten Leveln der

Proteine PUMA- α und PUMA- β . Dies führt schließlich zur Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK, was die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 fördert (Nakano & Vousden, 2001; Vousden, 2005). Die pro-apoptotische Funktion von BBC3 fußt dabei auf zwei unterschiedlichen Mechanismen (Chittenden, 2002). Zum einen bindet PUMA an pro-apoptotische Proteine der BCL-2-Superfamilie, z.B. BAX und BAK1 und aktiviert diese direkt. Zum anderen bindet PUMA an die anti-apoptotischen Proteine BCL2 oder BCL-xL. Hierdurch werden BAX und BAK1 von ihrer Interaktion aus den Komplexen gelöst, was im Weiteren zur Apoptose-Aktivierung führt (Vousden, 2005). Neben der Fähigkeit zur transkriptionalen Aktivierung von BBC3 ist p53 in der Lage direkte Bindungen mit anti-apoptotischen Proteinen wie BCL2 und BCL-xL einzugehen (Erster & Moll, 2005). Die hierbei freigesetzten BAX und BAK1 können dann die Apoptose einleiten (Chipuk et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit war BBC3 unter allen Bedingungen, ausgenommen nach Behandlung mit Dacarbazin, bei Melanozyten stärker exprimiert als bei Melanomen. Die deutlichsten Expressionsunterschiede waren konstitutionell und nach UV-B-Bestrahlung zu beobachten. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Untersuchungen von Karst et al. (2005, 2006), die eine sukzessive Abnahme der BBC3-Expression von dysplastischen Nävi, über primäre Melanome, hin zu metastasierten Melanomen nachwiesen. Mit der sukzessiven Abnahme der BBC3-Expression korrelierte eine sich verschlechternde Patientenprognose.

Nach Gruppierung der Zelllinien entsprechend ihres Mutationsstatus bestand zwischen Zelllinien mit Wildtyp-p53 und p53-exprimierenden Melanomen mit mutiertem p53 eine ausschließlich konstitutionell differente BBC3-Expression zugunsten der Wildtyp-Zelllinien. Unter allen Versuchsbedingungen, ausgenommen nach Behandlung mit Dacarbazin, war BBC3 bei IGR-37 am schwächsten exprimiert.

Dieses Ergebnis verdeutlicht die Abhängigkeit der BBC3-mRNA-Expression von der p53-Proteinexpression. Die trotz fehlender p53-Expression nachgewiesene BBC3-mRNA bei IGR-37 zeigt zudem, dass zusätzlich p53-unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen, die aber offenbar nicht zu einem adäquaten BBC3-mRNA-Level führen können.

Eine geringe BBC3-Regulation infolge von Cisplatin-Gabe beschrieben Wang et al. (2006 a) an Zelllinien humaner Colon-Karzinome. Demgegenüber führte die Behandlung mit Oxaliplatin zur BBC3-Induktion. Oxaliplatin führt zwar zu den gleichen Intrastrang-Quervernetzung wie Cisplatin, unterscheidet sich jedoch von jenem hinsichtlich seines Aktivitätsspektrums und Wirkmechanismus (Springler et al., 2001). Wang et al. (2006 a) konstatieren eine p53-unabhängige BBC3-Induktion durch Oxaliplatin. Da die Apoptose-

Induktion durch Cisplatin eng an die regelrechte p53-Funktion gekoppelt ist, dürfte die mangelnde BBC3-Aktivierung in den vorliegenden Melanomzelllinien in einer gestörten p53-Funktion begründet sein (Li et al. 1998; Siddik, 2003). Die gestörte p53-Funktion erklärt ebenfalls die mangelnde BBC3-Induktion nach Bestrahlung. Die vermehrte BBC3-Expression bei Mel-JUSO und IGR-37 nach Behandlung mit Cisplatin könnte Ausdruck einer p53-Restwirkung oder p53-unabhängiger Signalwege sein.

Es ist erstaunlich, dass native Melanozyten insbesondere nach Gabe von Cisplatin keine signifikante BBC3-Induktion zeigten. Es ist jedoch denkbar, dass Melanozyten unter den gewählten Versuchsbedingungen vermehrt den Zellzyklus-Arrest anstelle der von BBC3 vermittelten Apoptose einleiten. Hierfür spricht, dass die Melanozyten eine deutlich höhere Expression der Zellzyklus-Regulatoren p21 und GADD45A aufwiesen als Melanome. Die Expression dieser Gene wurde nach Gabe von Dacarbazin bzw. Cisplatin sogar gesteigert. Iyer et al. (2004) postulieren, dass u.a. die p21/BBC3-Relation entscheidend ist, welche Signalkaskade eingeleitet wird. An der Entscheidung, ob der programmierte Zelltod oder der Zellzyklus-Arrest einem DNA-Schaden folgen, sind zahlreiche Faktoren beteiligt, deren Balance maßgeblich ist. Die genauen Mechanismen, die das Schicksal einer Zelle entscheiden, sind dabei nicht hinreichend geklärt.

6.8. Keine Störung der Transkription Hypoxie-assoziiierter Gene

HIF1 (Hypoxia-inducible factor-1) ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus den HIF1A- und HIF1B- Untereinheiten besteht. Während die HIF1B eine Untereinheit diverser Transkriptionskomplexe ist, kommt HIF1A ausschließlich als Untereinheit des HIF-Komplexes vor (Wang et al., 1995). Die Expression von HIF1A wird streng durch den vorliegenden Sauerstoffgehalt reguliert. Unter normoxischen Bedingungen ist HIF1A durch spezifische Prolyl-Hydroxylasen an Pro402 und Pro564 hydroxyliert. Prolyl-hydroxyliertes HIF1A bindet an VHL (von Hippel-Lindau Protein), einer E3-Ubiquitin-Ligase, die zur HIF1A-Degradation führt (Ivan et al., 2001). Des Weiteren wird die HIF1A-Aktivität durch die sauerstoffabhängige Hydroxylierung von Asn803 herabgesetzt. Hierdurch wird die Bindung von HIF1A an die Co-Aktivatoren p300 und/oder CBP (CREB-binding protein) reguliert (Lando et al., 2002). Unter hypoxischen Bedingungen bleibt die VHL-vermittelte Degradation aus bzw. es kommt zur Bindung an p300/CBP, was zu einer Transkription von Genen führt, die die Sauerstoffabgabe fördern oder zu einer metabolischen Adaptation führen.

Hierzu zählen Gene, die für Erythropoetin, Glucosetransporter, glykolytische Enzyme und VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) kodieren (Semenza, 2003).

Unter hypoxischen Bedingungen besteht neben adaptiven Prozessen auch die Möglichkeit der Einleitung der p53-abhängigen Apoptose.

HIF1A selbst besitzt pro-apoptotische Eigenschaften. Unter physiologischen Bedingungen führt MDM2 zur p53-Degradation (Haupt et al. 1997). Nach DNA-Schädigung wie auch Hypoxie kommt es zu post-translationalen Modifikationen, die zur MDM2-p53 Dissoziation führen. P53 interagiert in der Folge mit p300/CBP, was die transkriptionale Aktivierung der Apoptose-Maschinerie zur Folge hat (Graeber et al., 1996; Vousden & Lu, 2002). Chen et al. (2003) wiesen direkte Interaktionen zwischen HIF1A und MDM2 nach, welches eine p53-Stabilisierung nach sich zog. HIF1A-p53-Interaktionen wurden ausschließlich für das p53-Wildtyp-Protein nachgewiesen (Ravi et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit der pro-apoptotischen Wirkung von HIF1A fußt auf der Beobachtung, dass HIF1A-defiziente Zellen niedrige BNIP3-Level aufweisen, was mit einer verminderten Apoptosebereitschaft verbunden ist (Kothari et al., 2003). Die inhibitorische Wirkung von BNIP3 wird über Interaktion mit dem anti-apoptotischen BCL2 vermittelt (Boyd et al., 1994).

Demgegenüber lässt sich in zahlreichen soliden Tumoren eine HIF1A-Überexpression beobachten, was z.T. mit einer Apoptoseresistenz, schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie oder einer schlechteren Patientenprognose vergesellschaftet ist (Akakura et al., 2001, Song et al., 2006; Zhong et al., 1999). Song et al. (2006) konnten an Zelllinien nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome ein verbessertes Ansprechen auf Cisplatin nach Suppression der HIF1A-Gen-Aktivität nachweisen. Somit scheint HIF1A eine Rolle in der Apoptose-Induktion zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte für fünf von sechs Melanom-Zelllinien und für Melanozyten keine signifikante HIF1A-Regulation unter den jeweiligen Versuchsbedingungen nachgewiesen werden. Lediglich SK-Mel 1 zeigte eine verminderte Expression nach Bestrahlung sowie eine vermehrte Expression nach Gabe von Dacarbazin. Die fehlende HIF1A-mRNA-Regulation nach Bestrahlung ist konsistent mit Ergebnissen von Li et al. (2006 b), die an Keratinozyten strahlenbedingt vermehrt exprimiertes HIF1A-Protein bei gleich bleibender mRNA-Expression nachwiesen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei Melanozyten und Melanomen keine grundsätzlich differente HIF1A-mRNA-Expression vorliegt. Der Unterschied in der konstitutionell exprimierten mRNA zwischen Melanozyten und Melanomen war marginal. Nach Einteilung der Zelllinien hinsichtlich ihres Mutationsstatus zeigte sich, dass Wildtyp-

p53-Zelllinien im Vergleich zu p53-exprimierenden Zelllinien mit mutiertem p53 nach Cisplatin-Behandlung erhöhte HIF1A-mRNA-Level exprimierten. Abschließend lässt sich festhalten, dass die HIF1A-mRNA keiner Regulation unterliegt. Ferner bestehen weder zwischen Melanozyten und Melanomen, noch abhängig vom p53-Mutationsstatus größere Differenzen in der HIF1A-Expression. Dieses Ergebnis erscheint nicht verwunderlich, da HIF1A offenbar auf Proteinebene reguliert wird (Li et al., 2006 b; Ravi et al., 2000). Giatromanolaki et al. (2003) wiesen an Präparaten maligner Melanome eine vermehrte HIF1A-Proteinexpression in 28% der Fälle nach. Hier wurden allerdings keine Untersuchungen bezüglich der mRNA-Expression durchgeführt. Außerdem war HIF2A, ein weiterer Vertreter der HIF-Familie, in 68% der Fälle überexprimiert. Der HIF2A-Signalweg wird insbesondere von Endothelien präferiert (Wiesener et al., 1998). Es wird in Zukunft zu untersuchen sein, ob eine Überexpression des HIF1A-Proteins beim malignen Melanom überhaupt von ähnlich großer Bedeutung ist, wie bei vielen anderen soliden Tumoren. Zudem sollte die Bedeutung einer möglichen Bevorzugung des HIF2A-Signalwegs evaluiert werden, wie es Untersuchungen von Giatromanolaki et al. (2003) nahe legen.

6.9. Keine Unterschiede in der APEX1-Expression bei den vorliegenden Zelllinien

APEX1 (Ref-1) kodiert für ein ubiquitäres, bifunktionales Enzym mit einer Thiol-Reduktase- und Apurin/Apyrimidin (AP)-Endonuklease-Aktivität (Hirota et al., 1997; Xanthoudakis et al., 1994). Nach DNA-Schädigung kann p53 die BER (Basen Exzisions Reparatur) aktivieren, wobei es zu Interaktionen von p53 mit APEX1 und der DNA-Polymerase β kommt (Zhou et al., 2001). In einem ersten Schritt der BER werden geschädigte Basen durch DNA-Glykosylasen unter Bildung von AP-Stellen eliminiert. Im Folgeschritt wird die nicht mehr besetzte Desoxyribose durch eine AP-Endonuklease entfernt. Bei kleinen DNA-Schäden synthetisiert die DNA-Polymerase β ein bis zwei Nukleotide, bevor spezifische DNA-Ligasen die neue Base im DNA-Strang verankern. Defekte von drei bis acht Basen führen zur Synthese komplementärer Nukleotide durch die DNA-Polymerasen β , δ oder ϵ (Fritz et al., 2003). APEX1 erhöht die DNA-Bindungskapazität von p53 durch zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen bindet APEX1 direkt an den COOH-Terminus von p53, zum anderen erhöht die Thiol-Reduktase-Aktivität von APEX1 die DNA-Bindungskapazität von p53 ohne einen stabilen Komplex einzugehen (Gaiddon et al., 1999; Jayaraman et al., 1997). Niedrige APEX1-Level führen zu einer Abnahme der p53-Level in ruhenden Zellen. Damit

verbunden ist eine vermehrte p53-Komplexierung mit MDM2, ohne dass der MDM2-Gesamtgehalt erhöht ist (Seemann & Hainaut, 2005). Die modifizierende Wirkung von APEX1 auf p53 scheint nicht auf die BER beschränkt zu sein. Eine vermehrte APEX1-Expression führt zur vermehrten mRNA-Expression von BAX, p21, GADD45A oder Cyclin G und umgekehrt führen niedrige APEX1-Level zu einer niedrigen p21-mRNA-Expression. Verminderte APEX1-Level haben eine limitierte, p53-abhängige Apoptose zur unmittelbaren Folge (Gaiddon et al., 1999; Jayaraman et al., 1997). Neben der Beteiligung an der BER und der Funktion als Transkriptionsfaktor wurde eine repressive Wirkung von APEX1 auf die Transkription des eigenen Gens nachgewiesen (Izumi et al., 1996). Es ist nicht hinreichend geklärt, wie diese unterschiedlichen Funktionen vermittelt werden, post-translationale Phosphorylierungen könnten jedoch eine Rolle spielen (Hsieh et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede der APEX1-mRNA-Expression zwischen Melanozyten und Melanomen ermittelt werden. Auch nach Einteilung der Zelllinien entsprechend ihres Mutationsstatus bestand kein signifikanter Unterschied. Dementsprechend konnten Störungen der APEX1-mRNA-Expression als Ursache der unterschiedlichen p21 und GADD45A Expression zwischen Melanozyten und Melanomen bzw. zwischen den einzelnen p53-Mutationsstatus ausgeschlossen werden.

Die APEX1-Induktion wird im Wesentlichen auf eine gesteigerte Transkription des Gens zurückgeführt (Ramana et al., 1998). Basierend auf dieser These stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Widerspruch zu Untersuchungen von Yang et al. (2005), die signifikant höhere APEX1-Protein-Level bei Melanomen verglichen mit Melanozyten nachwiesen. Ein möglicher Erklärungsansatz sind post-translationale Modifikationen, die die APEX1-Aktivität/Stabilität erhöhen, ohne auf eine vermehrte Transkription angewiesen zu sein (Hsieh et al., 2001).

Eine Regulation von APEX1 nach Bestrahlungen bzw. Chemotherapie konnte nur vereinzelt nachgewiesen werden. APEX1 wurde bei COLO-849 nach UV-C-Bestrahlung und bei Mel-JUSO nach Gabe von Cisplatin aufreguliert, wohingegen APEX1 bei SK-Mel 1 strahlenbedingt vermindert exprimiert wurde. Demgegenüber blieb bei den übrigen Versuchsbedingungen bzw. Zelllinien eine Regulation aus. Es lag weder zwischen Melanozyten und Melanomen, noch in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus eine differente Expression vor. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Untersuchungen von Ramana et al. (1998), die eine selektive Induktion menschlicher APEX1-mRNA mit konsekutiv erhöhten Protein-Konzentrationen durch erhöhte Mengen an radikalen Sauerstoff-Spezies (ROS) beobachteten. Demgegenüber hatten die UV-Bestrahlung und alkylierende Agenzien keinen Effekt auf die

APEX1-mRNA-Expression. Über die Auswirkungen einer erhöhten APEX1-Expression auf die p53-abhängige Apoptose infolge von UV-Bestrahlung liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Während Yang et al. (2005) eine Resistenz gegenüber UV-induzierter Apoptose beschreiben, konnten Arbeitsgruppen von Ramana (1998) und Walker (1994) keinen Effekt auf das Zellüberleben nach UV-Bestrahlung ermitteln. Ferner wurden Resistenzen gegenüber H₂O₂, Cisplatin, Temozolomid, Bleomycin u.a. berichtet. Hohe Level an APEX1, konstitutionell oder infolge vermehrter Reparatur zytotoxischer DNA-Schäden, führen zu einem adaptiven Prozess, der die Apoptose durch nachfolgende DNA-Schäden limitiert (Ramana et al., 1998; Silber et al., 2002; Yang et al., 2005). In den vorliegenden Zelllinien kam es zu keiner signifikanten Veränderung der APEX1-mRNA-Expression.

6.10. Vermehrte TEAD1-Expressionen nach Gabe von Cisplatin – mögliche Interaktionen der p38- und p53-Signalwege

TEAD1 (TEA domain family member 1, SV 40 transcriptional enhancer factor) kodiert für den Transkriptions Enhancer Faktor 1 (TEF-1). Bisher wurden vier TEFs (TEF-1, -3, -4 und -5) beim Menschen identifiziert, denen die NH₂-terminale DNA-Bindungs-Domäne gemein ist (Burglin, 1991; Jacquemin et al., 1996). Früh wurde TEF-1 als Transkriptions-Enhancer von Genen des Simian Virus 40 (SV40) erkannt (Davidson et al., 1988). Auch die Onkogene E6 und E7 des humanen Papilloma Virus 16 werden zum Teil durch TEF-1 reguliert (Ishiji et al., 1992). TEF-1 ist ferner an der Entwicklung verschiedener Muskulaturtypen beteiligt und eine Beteiligung im Rahmen der Embryogenese wird vermutet (Farrance & Ordahl, 1996; Jacquemin et al., 1996; Walker et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit bestand kein signifikanter Unterschied in der TEAD1-mRNA-Expression zwischen Melanozyten und Melanomen. Auch nach Einteilung der Zelllinien entsprechend ihres Mutationsstatus waren die Unterschiede gering. P53-exprimierende Melanome mit mutiertem p53 exprimierten TEAD1 nach UV-C-Bestrahlung am stärksten, jedoch nach Gabe von Cisplatin am schwächsten. Nach Gabe von Dacarbazin war TEAD1 bei IGR-37 am stärksten exprimiert. Eine Regulation, die dem Mutationsstatus folgte, lag nicht vor.

Die Zelllinien regulierten TEAD1 nach Bestrahlung und Dacarbazin-Behandlung nur vereinzelt und zeigten dabei kein einheitliches Muster. Demgegenüber regulierten fünf Melanomlinien und die Melanozyten TEAD1 infolge von Cisplatin-Gabe ab. Eine TEAD1-Abregulation nach Gabe von Cisplatin, dem stärksten Induktor der p53-abhängigen Apoptose

in der vorliegenden Arbeit, impliziert eine Interaktion von TEAD1 mit Genen des p53-Signalwegs. Direkte Interaktionen von TEAD1 mit p53 oder mit zentralen Genen des p53-Signalwegs werden in der Literatur nicht beschrieben. Der p38-MAP-Kinase-Signalweg könnte eine mögliche Brücke zwischen TEAD1 und dem p53-Signalweg schlagen. Frühere Studien konnten nachweisen, dass eine Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalwegs zur Induktion der p53-abhängigen Apoptose führt (Bulavin & Fornace, 2004). Die Fähigkeit zur Aktivierung pro-apoptotischer Gene des p53-Signalwegs wurde auf die direkte p53-Phosphorylierung an Ser33 und Ser46 durch die p38-MAP-Kinase zurückgeführt, wenngleich eine jüngst veröffentlichte Studie p38-abhängige p53-Co-Aktivatoren (p18^{Hamlet}) beschreiben (Bulavin et al., 1999; Cuadrado et al., 2007). Die Induktion des p38-MAP-Kinase-Signalweges mit konsekutiver p18^{Hamlet}-Überexpression wurde u.a. durch DNA-Schäden infolge von UV-Bestrahlung und Cisplatin-Gabe hervorgerufen. Eine Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalwegs führt zur TEAD1-Inhibition (Thompson et al., 2002). Eine verminderte TEAD1-Expression im Rahmen einer aktivierten Apoptose-Kaskade erscheint plausibel, wird doch eine Beteiligung von TEAD1 in der Zellentwicklung und Differenzierung postuliert (Kaneko & DePamphilis, 1998). Dieses Modell würde die Cisplatin-bedingt verminderte TEAD1-Expression in der vorliegenden Arbeit erklären.

7. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein aggressiver Tumor der Haut, der durch seine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie schlechte Prognose gekennzeichnet ist. Die hierfür verantwortlichen molekularen Mechanismen sind zwar erst ansatzweise geklärt, allerdings werden Störungen zentraler Signalwege der Apoptose als Schlüsselereignisse gesehen. So konnte für viele solide Tumore eine Fehlfunktion des Tumorsuppressors p53, ein wichtiger Regulator der Apoptose, nachgewiesen werden. Eine aberrante Akkumulation des p53-Proteins wird auch häufig beim malignen Melanom beobachtet, wenngleich Protein-stabilisierende Mutationen eher selten sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von p53 in primären Melanozyten und sechs Zelllinien maligner Melanome detailliert untersucht. Konsistent mit Ergebnissen der Literatur konnte in der vorliegenden Arbeit in immunhistochemischen Untersuchungen und Western Blot Analysen für 2/3 der untersuchten Melanomlinien eine konstitutionelle p53-Akkumulation nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die p53-Akkumulation unabhängig vom Mutationsstatus erfolgt, solange dieser nicht grundsätzlichen

Einfluss auf die p53-Proteinexpression nimmt. Schließlich ergaben die durchgeführten Western Blot Analysen zur UV- und Chemoinduktion die Aufrechterhaltung der p53-Induktion in Melanomen. Hierbei konnte einerseits Cisplatin als stärkster p53-Induktor und andererseits der Zellkern immunhistochemisch als vorrangiger Ort der Aktivierung identifiziert werden. Mit der nukleären Kompartimentierung wird p53 seiner Rolle als Transkriptionsfaktor gerecht.

Um die molekularen Mechanismen der konstitutiven und induzierten p53-Proteinexpression zu untersuchen, wurden mRNA- und Proteinstabilitätstests durchgeführt sowie die Expression der p53-modifizierenden Gene MDM2 und HIPK2 bestimmt. Bei den eingesetzten Melanomzelllinien konnte sowohl die konstitutionelle, als auch die Stress-induzierte p53-Akkumulation auf post-translationale Modifikationen zurückgeführt werden. Während eine post-translationale p53-Acetylierung und -Phosphorylierung zu einer physiologischen Stabilisierung des p53-Proteins nach DNA-Schädigung führt, kommt eine gestörte Acetylierung/Phosphorylierung ebenfalls als Ursache einer konstitutionell erhöhten p53-Expression in Melanomen in Betracht. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass MDM2 konstitutionell, nach UV-Bestrahlungen und Behandlung mit Dacarbazin in Melanozyten um ein Vielfaches höher exprimiert war als in Melanomen, was eine gestörte p53-Degradation nahelegt. Darüber hinaus wurde für p53-exprimierende Melanome mit mutiertem p53 eine erhöhte HIPK2-Expression beobachtet, die ebenfalls zu einer Stabilisierung des p53-Proteins in dieser Subpopulation beitragen dürfte.

Die beobachtete konstitutive Akkumulation des p53-Proteins impliziert eine Störung seiner funktionellen Integrität. Deshalb wurde die Expression von mehr als 90 Genen, die in engem Bezug zum p53-Signalweg stehen, unter den verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf Gene der Zellzykluskontrolle gelegt. In den Melanomen sind mit CDC2, p21 und GADD45A zentrale Gene der Zellzyklussteuerung dysreguliert. Während p21 und GADD45A in Melanozyten deutlich stärker exprimiert sind als in Melanomen, lässt sich ein umgekehrtes Verhältnis für CDC2 beschreiben. Eine Abhängigkeit vom Mutationsstatus liegt nicht vor, sofern die p53-Mutation nicht auf die p53-Proteinexpression Einfluss nimmt. Der Signalweg, der zur Induktion der p53-nachgeschalteten Gene führt, ist dabei grundsätzlich erhalten. Auf welcher Ebene die funktionelle p53-Defizienz vermittelt wird, ist noch unklar. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Störung des Transkriptionsfaktors SP1 ebenso wenig eine Rolle spielt wie die Dysregulation von HIF1A oder MAP4.

Eine gestörte Zellzyklus-Kontrolle führt mittelbar zur Defizienz der Apoptose-Induktion und bildet somit eine wesentliche Voraussetzung für das schlechte Therapieansprechen. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Stress-Induktion des pro-apoptischen BBC3 nachgewiesen werden, was die Defizienz im Signalweg des programmierten Zelltods für die untersuchten Melanomlinien unterstreicht.

Die molekularen Ursachen der postulierten Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika sind vielfältig und insbesondere für das maligne Melanom nicht hinreichend geklärt. Die komplexen Vernetzungen des p53-Signalwegs in der zellulären Homöostase werden in der vorliegenden Arbeit durch die differente TEAD1-Expression nach Cisplatin-Gabe zwischen Melanozyten und Melanomlinien verdeutlicht. TEAD1, das bis dato nicht mit dem malignen Melanom in Verbindung gebracht worden ist, schlägt eine Brücke zum p38-MAPK-Signalweg, für den Überschneidungen mit dem p53-Signalweg bekannt sind.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung des p53-Tumorsuppressorgens für das maligne Melanom und betont zugleich die Notwendigkeit, weitere Signalwege einzubeziehen, um die detaillierten molekularen Veränderungen zu verstehen, die den aggressiven und therapieresistenten Phänotyp des malignen Melanoms unterhalten.

8. Literatur

- Agarwal M.L., Ramana C.V., Hamilton M., Taylor W.R., DePrimo S.E., Bean L.J., Agarwal A., Agarwal M.K., Wolfman A., Stark G.R. Regulation of p53 expression by the RAS-MAP kinase pathway. *Oncogene*. 20 (2001) 2527-36
- Akakura N., Kobayashi M., Horiuchi I., Suzuki A., Wang J., Chen J., Niizeki H., Kawamura K., Hosokawa M., Asaka M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res*. 61 (2001) 6548-54
- Akslen L.A., Morkve O. Expression of p53 protein in cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 52 (1992) 13-6
- Alanko T., Rosenberg M., Saksela O. FGF expression allows nevus cells to survive in three-dimensional collagen gel under conditions that induce apoptosis in normal human melanocytes. *J Invest Dermatol*. 113 (1999) 111-6
- Albino A.P., Vidal M.J., McNutt N.S., Shea C.R., Prieto V.G., Nanus D.M., Palmer M., Hayward N.K. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res*. 4 (1994) 35-45
- Anthony D.A., McIlwrath A.J., Gallagher W.M., Edlin A.R., Brown R. Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res*. 56 (1996) 1374-81
- Armstrong B.K., Kricger A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res*. 3 (1993) 395-401
- Armstrong B.K., Kricger A. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv*. 19-20 (1994) 19-40
- Balch C.M., Soong S.J., Murad T.M., Ingalls A.L., Maddox W.A. A multifactorial analysis of melanoma: III. Prognostic factors in melanoma patients with lymph node metastases (stage II). *Ann Surg*. 193 (1981) 377-88
- Balch C.M., Soong S.J., Murad T.M., Smith J.W., Maddox W.A., Durant J.R. A multifactorial analysis of melanoma. IV. Prognostic factors in 200 melanoma patients with distant metastases (stage III). *J Clin Oncol*. 1 (1983) 126-34
- Balch C.M., Urist M.M., Karakousis C.P., Smith T.J., Temple W.J., Drzewiecki K., Jewell W.R., Bartolucci A.A., Mihm M.C. Jr, Barnhill R. Efficacy of 2-cm surgical margins for intermediate-thickness melanomas (1 to 4 mm). Results of a multi-institutional randomized surgical trial. *Ann Surg*. 218 (1993) 262-7
- Balch C.M., Soong S.J., Gershenwald J.E., Thompson J.F., Reintgen D.S., Cascinelli N., Urist M., McMasters K.M., Ross M.I., Kirkwood J.M., Atkins M.B., Thompson J.A., Coit D.G., Byrd D., Desmond R., Zhang Y., Liu P.Y., Lyman G.H., Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*. 19 (2001) 3622-34
- Ballo M.T., Strom E.A.; Zagars G.K.; Bedikian A.Y.; Prieto V.G., Mansfield P.F., Lee J.E., Gershenwald J.E., Ross M.I. Adjuvant irradiation for axillary metastases from malignant melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52 (2002) 964-72
- Barak Y., Juven T., Haffner R., Oren M. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J*. 12 (1993) 461-8
- Barlow S., Gonzalez-Garay M.L., West R.R., Olmsted J.B., Cabral F. Stable expression of heterologous microtubule-associated proteins (MAPs) in Chinese hamster ovary cells: evidence for differing roles of MAPs in microtubule organization. *J Cell Biol*. 126 (1994) 1017-29
- Bash-Babula J., Toppmeyer D., Labassi M., Reidy J., Orlick M., Senzon R., Alli E., Kearney T., August D., Shih W., Yang J.M., Hait W.N. A Phase I/pilot study of sequential doxorubicin/vinorelbine: effects on p53 and microtubule-associated protein 4. *Clin Cancer Res*. 8 (2002) 1057-64
- Beiteke U., Ruppert P., Garbe C., Oxenfarth R., Kastl I., Turker T., Tronnier H., Frosch P.J. Adjuvante Therapie des primären malignen Melanoms mit natürlichem humanem Interferon beta. *Hautarzt* 44 (1993) 365-371

- Bentham G., Aase A. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1989: associations with solar ultraviolet radiation, income and holidays abroad. *Int J Epidemiol.* 25 (1996) 1132-8
- Bliss J.M., Ford D., Swerdlow A.J., Armstrong B.K., Cristofolini M., Elwood M., Green A., Holly E.A., Mack T., MacKie R.M. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer.* 62 (1995) 367-76
- Bond G.L., Hu W., Bond E.E., Robins H., Lutzker S.G., Arva N.C., Bargonetti J., Bartel F., Taubert H., Wuerl P., Onel K., Yip L., Hwang S.J., Strong L.C., Lozano G., Levine A.J. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell.* 119 (2004) 591-602
- Borellini F., Glazer R.I. Induction of Sp1-p53 DNA-binding heterocomplexes during granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1. *J Biol Chem.* 268 (1993) 7923-8
- Bouffler S.D., Kemp C.J., Balmain A., Cox R. Spontaneous and ionizing radiation-induced chromosomal abnormalities in p53-deficient mice. *Cancer Res.* 55 (1995) 3883-9
- Bowen A.R., Hanks A.N., Allen S.M., Alexander A., Diedrich M.J., Grossman D. Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *J Invest Dermatol.* 120 (2003) 48-55
- Boyd J.M., Malstrom S., Subramanian T., Venkatesh L.K., Schaeper U., Elangovan B., D'Sa-Eipper C., Chinnadurai G. Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell.* 79 (1994) 341-51
- Brash D.E., Rudolph J.A., Simon J.A., Lin A., McKenna G.J., Baden H.P., Halperin A.J., Ponten J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (1991) 10124-8
- Breuninger H., Schlagenhauff B., Stroebel W., Schaumburg L.G., Rassner G. Patterns of local horizontal spread of melanomas: consequences for surgery and histopathologic investigation. *Am J Surg Pathol* 23 (1999) 1493-8
- Brochez L., Naeyaert J.M. Understanding the trends in melanoma incidence and mortality: where do we stand? *Eur J Dermatol.* 10 (2000) 71-5
- Bulavin D.V., Fornace A.J. Jr. P38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res.* 92 (2004) 95-118
- Bulavin D.V., Saito S., Hollander M.C., Sakaguchi K., Anderson C.W., Appella E., Fornace A.J. Jr. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.* 18 (1999) 6845-54
- Bulinski J.C., Borisy G.G. Microtubule-associated proteins from cultured HeLa cells. Analysis of molecular properties and effects on microtubule polymerization. *J Biol Chem.* 255 (1980) 11570-6
- Burglin T.R. The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell.* 66 (1991) 11-2
- Burmeister B.H., Smithers B.M., Poulsen M., McLeod G.R., Bryant G., Tripcony L., Thorpe C. Radiation therapy for nodal disease in malignant melanoma. *World J Surg* 19 (1995) 369-71
- Cameron D.A., Cornbleet M.C., MacKie R.M., Hunter J.A., Gore M., Hancock B., Smyth J.F. Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma - the Scottish study. *Br J Cancer* 84 (2001) 1146-9
- Chang B.D., Broude E.V., Fang J., Kalinichenko T.V., Abdryashitov R., Poole J.C., Roninson I.B. P21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene.* 19 (2000) 2165-70
- Chao C., Saito S., Kang J., Anderson C.W., Appella E., Xu Y. P53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J.* 19 (2000) 4967-75

- Chen D., Li M., Luo J., Gu W. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem.* 278 (2003) 13595-8
- Chipuk J.E., Bouchier-Hayes L., Kuwana T., Newmeyer D.D., Green D.R. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science.* 309 (2005) 1732-5
- Chittenden T. BH3 domains: intracellular death-ligands critical for initiating apoptosis. *Cancer Cell.* 2 (2002) 165-6
- Cirielli C., Riccioni T., Yang C., Pili R., Gloe T., Chang J., Inyaku K., Passaniti A., Capogrossi M.C. Adenovirus-mediated gene transfer of wild-type p53 results in melanoma cell apoptosis in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 63 (1995) 673-9
- Cleveland D.W., Hwo S.Y., Kirschner M.W. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol.* 116 (1977) 227-47
- Coit D.G., Rogatko A., Brennan M.F. Prognostic factors in patients with melanoma metastatic to axillary or inguinal lymph nodes. A multivariate analysis. *Ann Surg* 214 (1991) 627-36
- Coleman M.P., Esteve J., Damiecki P., Arslan A., Renard H. Trends in cancer incidence and mortality. *IARC Sci Publ.* 121 (1993) 1-806
- Colombo E., Bonetti P., Lazzerini Denchi E., Martinelli P., Zamponi R., Marine J.C., Helin K., Falini B., Pelicci P.G. Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol.* 25 (2005) 8874-86
- Copeta A., Tavian D., Marchina E., De Petro G., Barlati S. Gene response of human skin fibroblasts to urokinase- and tissue-type plasminogen activators. *Growth Factors.* 17 (2000) 249-68
- Creagan E.T., Cupps R.E., Ivins J.C., Pritchard D.J., Sim F.H., Soule E.H., O'Fallon J.R. Adjuvant radiation therapy for regional nodal metastases from malignant melanoma: a randomized, prospective study. *Cancer.* 42 (1978) 2206-10
- Cristofolini M., Boi S., Girlando S., Zumiani G., Cristofolini P., Dalla Palma P., Doglioni C., Barbareschi M. P53 Protein expression in nevi and melanomas. *Arch Dermatol.* 129 (1993) 739-43
- Cuadrado A., Lafarga V., Cheung P.C., Dolado I., Llanos S., Cohen P., Nebreda A.R. A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* 26 (2007) 2115-26
- Czajkowski R., Placek W., Drewa G., Czajkowska A., Uchanska G. FAMMM syndrome: pathogenesis and anagement. *Dermatol Surg.* 30 (2004) 291-6
- D'Atri S., Tentori L., Lacal P.M., Graziani G., Pagani E., Benincasa E., Zambruno G., Bonmassar E., Jiricny J. Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Mol Pharmacol.* 4 (1998) 334-41
- Davidson I., Xiao J.H., Rosales R., Staub A., Chambon P. The HeLa cell protein TEF-1 binds specifically and cooperatively to two SV40 enhancer motifs of unrelated sequence. *Cell.* 54 (1988) 931-42
- Daya-Grosjean L., Dumaz N., Sarasin A. The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J Photochem Photobiol B.* 28 (1995) 115-24
- de Gruijl FR. Photobiology of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 63 (1996) 372-5
- de Vries E., Bray F.I., Coebergh J.W., Parkin D.M. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer.* 107 (2003) 119-26
- DeYoung M.P., Ellisen L.W. P63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* 26 (2007) 5169-83
- Di Stefano V., Blandino G., Sacchi A., Soddu S., D'Orazi G. HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function. *Oncogene.* 23 (2004) 5185-92

- Doi T., Morita T., Wakabayashi N., Sumi T., Iwai S.A., Amekawa S., Sakuda M., Nishimune Y. Induction of instability of p34(cdc2) expression by treatment with cisplatin (CDDP) in mouse teratocarcinoma F9 cells. *Cancer Lett.* 176 (2002) 75-80
- D'Orazi G., Cecchinelli B., Bruno T., Manni I., Higashimoto Y., Saito S., Gostissa M., Coen S., Marchetti A., Del Sal G., Piaggio G., Fanciulli M., Appella E., Soddu S. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol.* 4 (2002) 11-9
- Drepper H., Kohler C.O., Bastian B., Breuninger H., Brocker E.B., Gohl J., Groth W., Hermanek P., Hohenberger W., Lippold A. Benefit of elective lymph node dissection in subgroups of melanoma patients. Results of a multicenter study of 3616 patients. *Cancer.* 72 (1993) 741-9
- Eggermont A.M. European approach to the treatment of malignant melanoma. *Curr Opin Oncol.* 14 (2002) 205-11
- el-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75 (1993) 817-25
- English D.R., Armstrong B.K., Kricger A., Fleming C. Sunlight and cancer. *Cancer Causes Control.* 8 (1997) 271-83
- Engvall E., Yonemoto R.H. Is SP1 (pregnancy specific beta 1 glycoprotein) elevated in cancer patients? *Int J Cancer.* 24 (1979) 759-61
- Erster S., Moll U.M. Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun.* 331 (2005) 843-50
- Farrance I.K., Ordahl C.P. The role of transcription enhancer factor-1 (TEF-1) related proteins in the formation of M-CAT binding complexes in muscle and non-muscle tissues. *J Biol Chem.* 271 (1996) 8266-74
- Farshad A., Burg G., Panizzon R., Dummer R. A retrospective study of 150 patients with lentigo maligna and lentigo maligna melanoma and the efficacy of radiotherapy using Grenz or soft X-rays. *Br J Dermatol.* 146 (2002) 1042-6
- Finlay C.A., Hinds P.W., Tan T.H., Eliyahu D., Oren M., Levine A.J. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol.* 8 (1988) 531-9
- Fisher D.E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell.* 78 (1994) 539-42
- Fletcher W.S., Pommier R.F., Lum S., Wilmarth T.J. Surgical treatment of metastatic melanoma. *Am J Surg.* 175 (1998) 413-7
- Florenes V.A., Oyjord T., Holm R., Skrede M., Borresen A.L., Nesland J.M. Fodstad O TP53 allele loss, mutations and expression in malignant melanoma. *Br J Cancer.* 69 (1994) 253-9
- Ford D., Bliss J.M., Swerdlow A.J., Armstrong B.K., Franceschi S., Green A., Holly E.A., Mack T., MacKie R.M., Osterlind A. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer.* 62 (1995) 377-81
- Fritz G., Grosch S., Tomicic M., Kaina B. APE/Ref-1 and the mammalian response to genotoxic stress. *Toxicology.* 193 (2003) 67-78
- Fuhrmann D., Lippold A., Borrosch F., Ellwanger U., Garbe C., Suter L. Should adjuvant radiotherapy be recommended following resection of regional lymph node metastases of malignant melanomas ? *Br J Dermatol.* 144 (2001) 66-70
- Gaidon C., Moorthy N.C., Prives C. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J.* 18 (1999) 5609-21

- Gallagher R.P., Elwood J.M., Threlfall W.J., Spinelli J.J., Fincham S., Hill G.B. Socioeconomic status, sunlight exposure, and risk of malignant melanoma: the Western Canada Melanoma Study. *J Natl Cancer Inst.* 79 (1987) 647-52
- Gandini S., Sera F., Cattaruzza M.S., Pasquini P., Picconi O., Boyle P., Melchi C.F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer.* 41 (2005) 45-60
- Garbe C., Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 14 (2001) 280-90
- Garbe C., Buttner P., Bertz J., Burg G., d'Hoedt B., Drepper H., Guggenmoos-Holzmann I., Lechner W., Lippold A., Orfanos C.E. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer.* 75 (1995) 2492-8 (a)
- Garbe C., Buttner P., Bertz J., Burg G., d'Hoedt B., Drepper H., Guggenmoos-Holzmann I., Lechner W., Lippold A., Orfanos C.E. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer.* 75 (1995) 2484-91 (b)
- Garbe C., Buttner P., Ellwanger U., Bröcker E.B., Jung E.G., Orfanos C.E., Rassner G., Wolff H.H. The central malignant melanoma registry of the German dermatological society 1983 to 1993. Epidemiological trends and current treatment of cutaneous melanoma. *Hautarzt.* 46 (1995) 683-92 (c)
- Garbe C., Eigentler T.K. Therapie des malignen Melanoms im Stadium der Fernmetastasierung. *Der Hautarzt* 55 (2004) 195-213
- Garbe C., McLeod G.R., Buettner P.G. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer.* 89 (2000) 1269-78
- Giatromanolaki A., Sivridis E., Kouskoukis C., Gatter K.C., Harris A.L., Koukourakis M.I. Hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin. *Melanoma Res.* 13 (2003) 493-501
- Giglia-Mari G., Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat.* 21 (2003) 217-28
- Gilchrest B.A., Eller M.S., Geller A.C., Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* 340 (1999) 1341-8
- Gjerset R.A., Turla S.T., Sobol R.E., Scalise J.J., Mercola D., Collins H., Hopkins P.J. Use of wild-type p53 to achieve complete treatment sensitization of tumor cells expressing endogenous mutant p53. *Mol Carcinog.* 14 (1995) 275-85
- Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T., Housman D.E., Koch C.J., Lowe S.W., Giaccia A.J. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* 379 (1996) 88-91
- Grob J.J., Dreno B., de la Salmoniere P. Randomised trial of interferon alpha-2b as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet* 351 (1998) 1905-10
- Grossman D., Altieri D.C. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev.* 20 (2001) 3-11
- Gualberto A., Baldwin A.S. Jr. P53 and Sp1 interact and cooperate in the tumor necrosis factor-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *J Biol Chem.* 270 (1995) 19680-3
- Gwosdz C., Scheckenbach K., Lieven O., Reifenberger J., Knopf A., Bier H., Balz V. Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer.* 118 (2006) 577-82
- Haapajarvi T., Pitkanen K., Laiho M. Human melanoma cell line UV responses show independency of p53 function. *Cell Growth Differ.* 10 (1999) 163-71
- Halevy O., Hall A., Oren M. Stabilization of the p53 transformation-related protein in mouse fibrosarcoma cell lines: effects of protein sequence and intracellular environment. *Mol Cell Biol.* 9 (1989) 3385-92

- Han J.W., Ahn S.H., Park S.H., Wang S.Y., Bae G.U., Seo D.W., Kwon H.K., Hong S., Lee H.Y., Lee Y.W., Lee H.W. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Res.* 60 (2000) 6068-74
- Harms K., Nozell S., Chen X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* 61 (2004) 822-42
- Hartmann A., Blaszyk H., Cunningham J.S., McGovern R.M., Schroeder J.S, Helander S.D., Pittelkow M.R., Sommer S.S., Kovach J.S. Overexpression and mutations of p53 in metastatic malignant melanomas. *Int J Cancer.* 67 (1996) 313-7
- Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 387 (1997) 296-9
- Heaton K.M., Sussman J.J., Gershenwald J., Lee J.E., Reintgen D.S., Mansfield P.F., Ross M.I. Surgical margins and prognostic factors in patients with thick (> 4 mm) primary melanoma. *Ann Surg Oncol* 5 (1998) 322-8
- Hinds P.W., Finlay C.A., Frey A.B., Levine A.J. Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-ras-transformed cell lines. *Mol Cell Biol.* 7 (1987) 2863-9
- Hirota K., Matsui M., Iwata S., Nishiyama A., Mori K., Yodoi J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (1997) 3633-8
- Hofmann T.G., Möller A., Sirma H., Zentgraf H., Taya Y., Dröge W., Will H., Schmitz M.L. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol.* 4 (2002):1-10
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. p53 mutations in human cancers. *Science.* 253 (1991) 49-53
- Holly E.A., Kelly J.W., Shpall S.N., Chiu S.H. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 17 (1987) 459-68
- Holman C.D., Armstrong B.K. Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: an analysis separating histogenetic types. *J Natl Cancer Inst.* 73 (1984) 75-82
- Howe H.L., Wingo P.A., Thun M.J., Ries L.A., Rosenberg H.M., Feigal E.G., Edwards B.K. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst.* 93 (2001) 824-42
- Hsieh M.M., Hegde V., Kelley M.R., Deutsch W.A. Activation of APE/Ref-1 redox activity is mediated by reactive oxygen species and PKC phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 3116-22
- Huang L., Sowa Y., Sakai T., Pardee A.B. Activation of the p21WAF1/CIP1 promoter independent of p53 by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) through the Sp1 sites. *Oncogene.* 19 (2000) 5712-9
- Hutchinson F. Induction of tandem-base change mutations. *Mutat Res.* 309 (1994) 11-5
- IARC, Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans; solar and ultraviolet radiation. Lyon; 1992
- Iggo R., Gatter K., Bartek J., Lane D., Harris A.L. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet.* 335 (1990) 675-9
- Imbriano C., Gurtner A., Cocchiarella F., Di Agostino S., Basile V., Gostissa M., Dobbstein M., Del Sal G., Piaggio G., Mantovani R. Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol.* 25 (2005) 3737-51
- Ishiji T., Lacey M.J., Parkkinen S., Anderson R.D., Haugen T.H., Cripe T.P., Xiao J.H., Davidson I., Chambon P., Turek L.P. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 11 (1992) 2271-81

- Ito A., Kawaguchi Y., Lai C.H., Kovacs J.J., Higashimoto Y., Appella E., Yao T.P. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J.* 21 (2002) 6236-45
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin W.G. Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 292 (2001) 464-8
- Iyer N.G., Chin S.F., Ozdag H., Daigo Y., Hu D.E., Cariati M., Brindle K., Aparicio S., Caldas C. p300 regulates p53-dependent apoptosis after DNA damage in colorectal cancer cells by modulation of PUMA/p21 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (2004) 7386-91
- Izumi T., Henner W.D., Mitra S. Negative regulation of the major human AP-endonuclease, a multifunctional protein. *Biochemistry.* 35 (1996) 14679-83
- Jacquemin P., Hwang J.J., Martial J.A., Dolle P., Davidson I. A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J Biol Chem.* 271 (1996) 21775-85
- Jacquillat C., Khayat D., Banzet P., Weil M., Avril M.F., Fumoleau P., Namer M., Bonnetterre J., Kerbrat P., Bonerandi J.J. Chemotherapy by fotemustine in cerebral metastases of disseminated malignant melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 25 (1990) 263-6
- Juan L.J., Shia W.J., Chen M.H., Yang W.M., Seto E., Lin Y.S., Wu C.W. Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem.* 275 (2000) 20436-43
- Jayaraman L., Murthy K.G., Zhu C., Curran T., Xanthoudakis S., Prives C. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev.* 11 (1997) 558-70
- Kanai Y., Takemura R., Oshima T., Mori H., Ihara Y., Yanagisawa M., Masaki T., Hirokawa N. Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J Cell Biol.* 109 (1989) 1173-84
- Kaneko K.J., DePamphilis M.L. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors. *Dev Genet.* 22 (1998) 43-55
- Karran P., Macpherson P., Ceccotti S., Dogliotti E., Griffin S., Bignami M. O⁶-methylguanine residues elicit DNA repair synthesis by human cell extracts. *J Biol Chem.* 268 (1993) 15878-86
- Karst A.M., Dai D.L., Martinka M., Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene.* 24 (2005) 1111-6
- Karst A.M., Dai D.L., Cheng J.Q., Li G. Role of p53 up-regulated modulator of apoptosis and phosphorylated Akt in melanoma cell growth, apoptosis, and patient survival. *Cancer Res.* 66 (2006) 9221-6
- Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51 (1991) 6304-11
- Kastan M.B., Zhan Q., el-Deiry W.S., Carrier F., Jacks T., Walsh W.V., Plunkett B.S., Vogelstein B., Fornace A.J. Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell.* 71 (1992) 587-97
- Kaufmann R., Tilgen W., Garbe C. Diagnostische und therapeutische Standards in der Dermatologischen Onkologie. *Hautarzt* 49 (1998) 30-38
- Kern S.E., Pietenpol J.A., Thiagalingam S., Seymour A., Kinzler K.W., Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science.* 256 (1992) 827-30
- Khlat M., Vail A., Parkin M., Green A. Mortality from melanoma in migrants to Australia: variation by age at arrival and duration of stay. *Am J Epidemiol.* 135 (1992) 1103-13
- Kim Y.H., Choi C.Y., Lee S.J., Conti M.A., Kim Y. Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J Biol Chem.* 273 (1998) 25875-9

- Kirkwood J.M., Strawderman M.H., Ernstoff M.S. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high risk resected cutaneous melanoma. The Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 14 (1996) 7-17
- Kirova Y.M.; Chen J., Rabarijaona L.L., Piedbois Y.; Le-Bourgeois J.P. Radiotherapy as palliative treatment for metastatic melanoma. *Melanoma Res* 9 (1999) 611-3
- Koh H.K. Cutaneous melanoma. *N Engl J Med.* 325 (1991) 171-82
- Kolmel K.F., Kulle B., Lippold A., Seebacher C. Survival probabilities and hazard functions of malignant melanoma in Germany 1972-1996, an analysis of 10433 patients. Evolution of gender differences and malignancy. *Eur J Cancer.* 38 (2002) 1388-94
- Korabiowska M., Betke H., Kellner S., Stachura J., Schauer A. Differential expression of growth arrest, DNA damage genes and tumour suppressor gene p53 in naevi and malignant melanomas. *Anticancer Res.* 17 (1997) 3697-700
- Korting H.C., Callies R., Reusch M., Schlaeger M., Sterry W. Dermatologische Qualitätssicherung. Leitlinien und Empfehlungen. ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin, 2007 329-348
- Kothari S., Cizeau J., McMillan-Ward E., Israels S.J., Bailes M., Ens K., Kirshenbaum L.A., Gibson S.B. BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene.*22 (2003) 4734-44
- Kraemer K.H., Lee M.M., Andrews A.D., Lambert W.C. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol.* 130 (1994) 1018-21
- Kricker A., Armstrong B.K., English D.R., Heenan P.J. Pigmentary and cutaneous risk factors for non-melanocytic skin cancer--a case-control study. *Int J Cancer.* 48 (1991) 650-62
- Kricker A., Armstrong B.K. Jones M.E., Burton R.C. Health, solar UV radiation and environmental change. IARC, Lyon, 1993
- Kulesz-Martin M., Lagowski J., Fei S., Pelz C., Sears R., Powell M.B., Halaban R., Johnson J. Melanocyte and keratinocyte carcinogenesis: p53 family protein activities and intersecting mRNA expression profiles. *J Investig Dermatol Symp Prog.* 10 (2005) 142-52.
- Lagger G., Doetzlhofer A., Schuettengruber B., Haidweger E., Simboeck E., Tischler J., Chiocca S., Suske G., Rotheneder H., Wintersberger E., Seiser C. The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol.* 23 (2003) 2669-79
- Lakin N.D., Jackson S.P. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene.* 18 (1999) 7644-55
- Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J., Whitelaw M.L. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 295 (2002) 858-61
- Langley E., Pearson M., Faretta M., Bauer U.M., Frye R.A., Minucci S., Pelicci P.G., Kouzarides T. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* 21 (2002) 2383-96
- Lassam N.J., From L., Kahn H.J. Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 53 (1993) 2235-8
- La Vecchia C., Lucchini F., Negri E., Levi F. Recent declines in worldwide mortality from cutaneous melanoma in youth and middle age. *Int J Cancer.* 81 (1999) 62-6
- Lee S.M., Betticher D.C., Thatcher N. Melanoma: chemotherapy. *Br Med Bull.*51 (1995) 609-30
- Leitlinie Malignes Melanom, AWMF online, Vers. 09/2007
- Leo F., Cagini L., Rocmans P., Cappello M., van Geel A.N., Maggi G., Goldstraw P., Pastorino U. Lung metastases from melanoma: when is surgical treatment warranted? *Br J Cancer* 83 (2000) 569-572

- Lev D.C., Ruiz M., Mills J.L., McGary E.C., Price J.E., Bar-Eli M. Dacarbazine causes transcriptional up-regulation of interleukin 8 and vascular endothelial growth factor in melanoma cells: a possible escape mechanism from chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2 (2003) 753-63.
- Li G., Tang L., Zhou X., Tron V., Ho V. Chemotherapy-induced apoptosis in melanoma cells is p53 dependent. *Melanoma Res.* 8 (1998) 17-23
- Li W., Sanki A., Karim R.Z., Thompson J.F., Soon Lee C., Zhuang L., McCarthy S.W., Scolyer R.A. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology.*38 (2006) 287-301 (a)
- Li Y., Bi Z., Yan B., Wan Y. UVB radiation induces expression of HIF-1 α and VEGF through the EGFR/PI3K/DEC1 pathway. *Int J Mol Med.* 18 (2006) 713-9 (b)
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25 (2001) 402-8
- Livingstone L.R., White A., Sprouse J., Livanos E., Jacks T., Tlsty T.D. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell.* 70 (1992) 923-35
- Looper M., Bhatia K. *Australian Health Trends 2001.* AIHW (Australian Institute of Health and Welfare), Canberra, 2001
- Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A., Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature.* 362 (1993) 847-9
- Lu X., Lane D.P. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell.* 75 (1993) 765-78
- Mack T.M., Floderus B. Malignant melanoma risk by nativity, place of residence at diagnosis, and age at migration. *Cancer Causes Control.* 2 (1991) 401-11
- MacKie R.M., Freudenberger T., Aitchison T.C. Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. *Lancet.* 2 (1989) 487-90
- Malkin D., Li F.P., Strong L.C., Fraumeni J.F. Jr, Nelson C.E., Kim D.H., Kassel J., Gryka M.A., Bischoff F.Z., Tainsky M.A. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 250 (1990) 1233-8
- Maltzman W., Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol.* 4 (1984) 1689-94
- Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol.* 25 (2000) 459-63
- Matlashewski G., Lamb P., Pim D., Peacock J., Crawford L., Benchimol S. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.* 3 (1984) 3257-62
- McKay B.C., Francis M.A., Rainbow A.J. Wildtype p53 is required for heat shock and ultraviolet light enhanced repair of a UV-damaged reporter gene. *Carcinogenesis.* 18 (1997) 245-9
- Medrano E.E., Im S., Yang F., Abdel-Malek Z.A. Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. *Cancer Res.* 55 (1995) 4047-52
- Meek D.W. Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal.* 10 (1998) 159-66
- Mercer W.E., Shields M.T., Amin M., Sauve G.J., Appella E., Romano J.W., Ullrich S.J. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87 (1990) 6166-70

- Middleton M.R., Grob J.J., Aaronson N., Fierlbeck G., Tilgen W., Seiter S., Gore M., Aamdal S., Cebon J., Coates A., Dreno B., Henz M., Schadendorf D., Kapp A., Weiss J., Fraass U., Statkevich P., Muller M., Thatcher N. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 18 (2000) 158-66
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., Moll U.M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 11 (2003) 577-90
- Minamoto T., Buschmann T., Habelhah H., Matusевич E., Tahara H., Boerresen-Dale A.L., Harris C., Sidransky D., Ronai Z. Distinct pattern of p53 phosphorylation in human tumors. *Oncogene.* 20 (2001) 3341-7
- Miyashita T., Reed J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 80 (1995) 293-9
- Mooney E.E., Ruis Peris J.M., O'Neill A., Sweeney E.C. Apoptotic and mitotic indices in malignant melanoma and basal cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 48 (1995) 242-4
- Morales-Ducret C.R., van de Rijn M., Smoller B.R. Bcl-2 expression in melanocytic nevi. Insights into the biology of dermal maturation. *Arch Dermatol.* 131 (1995) 915-8
- Mornex F., Thomas L., Mohr P., Hauschild A., Delaunay M.M., Lesimple T., Tilgen W., Bui B.N., Guillot B., Ulrich J., Bourdin S., Mousseau M., Cupissol D., Bonnetterre M.E., De Gislain C., Bensadoun R.J., Clavel M. A prospective randomized multicentre phase III trial of fotemustine plus whole brain irradiation versus fotemustine alone in cerebral metastases of malignant melanoma. *Melanoma Res* 13 (2003) 97-103
- Morton D.L., Wanek L., Nizze J.A., Elashoff R.M., Wong J.H. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann Surg* 214 (1991) 491-9
- Morton D.L., Davtyan D.G., Wanek L.A., Foshag L.J., Cochran A.J. Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness. *Cancer.* 71 (1993) 3737-43
- Mouriaux F., Maurage C.A., Labalette P., Sablonniere B., Malecaze F., Darbon J.M. Cyclin-dependent kinase inhibitory protein expression in human choroidal melanoma tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41 (2000) 2837-43
- Mosner J., Mummembrauer T., Bauer C., Sczakiel G., Grosse F., Deppert W. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* 14 (1995) 4442-9
- Murphy D.B., Borisy G.G. Association of high-molecular-weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72 (1975) 2696-700
- Murphy M., Ahn J., Walker K.K., Hoffman W.H., Evans R.M., Levine A.J., George D.L. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev.* 13 (1999) 2490-501
- Murphy M., Hinman A., Levine A.J. Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein. *Genes Dev.* 10 (1996) 2971-80
- Nakano K., Vousden K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 7 (2001) 683-94
- Nakazawa H., English D., Randell P.L., Nakazawa K., Martel N., Armstrong B.K., Yamasaki H. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 (1994) 360-4
- Nelson W.G., Kastan M.B. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol.* 14 (1994) 1815-23
- Nguyen H.L., Chari S., Gruber D., Lue C.M., Chapin S.J., Bulinski J.C. Overexpression of full- or partial-length MAP4 stabilizes microtubules and alters cell growth. *J Cell Sci.* 110 (1997) 281-94

- Noda A., Toma-Aiba Y., Fujiwara Y. A unique, short sequence determines p53 gene basal and UV-inducible expression in normal human cells. *Oncogene*. 19 (2000) 21-31
- Ohlsson C., Kley N., Werner H., LeRoith D. P53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology*. 139 (1998) 1101-7
- Ohtani-Fujita N., Minami S., Mimaki S., Dao S., Sakai T. P53-Independent activation of the gadd45 promoter by Delta12-prostaglandin J2. *Biochem Biophys Res Commun*. 251 (1998) 648-52
- Okamoto K., Beach D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J*. 13 (1994) 4816-22
- Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L., Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. 358 (1992) 80-3
- Oren M., Levine A.J. Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80 (1983) 56-9
- Ookata K., Hisanaga S., Bulinski J.C., Murofushi H., Aizawa H., Itoh T.J., Hotani H., Okumura E., Tachibana K., Kishimoto T. Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol*. 128 (1995) 849-62
- Pedoux R., Lefort K., Cuenin C., Cortes U., Kellner K., Dore J.F., Nakazawa H. Specific induction of gadd45 in human melanocytes and melanoma cells after UVB irradiation. *Int J Cancer*. 98 (2002) 811-6
- Pehamberger H., Soyer H.P., Steiner A., Kofler R., Binder M., Mischer P., Pachinger W., Aubock J., Fritsch P., Kerl H., Wolff K. Adjuvant interferon-alpha2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol* 16 (1998) 1425-9
- Peled A., Zipori D., Rotter V. Cooperation between p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways in myeloid cells. *Cancer Res*. 56 (1996) 2148-56
- Petrocelli T., Slingerland J. UVB induced cell cycle checkpoints in an early stage human melanoma line, WM35. *Oncogene*. 19 (2000) 4480-90
- Phelps M., Darley M., Primrose J.N., Blaydes J.P. P53-independent activation of the hdm2-P2 promoter through multiple transcription factor response elements results in elevated hdm2 expression in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells. *Cancer Res*. 63 (2003) 2616-23
- Platz A., Ringborg U., Hansson J. Hereditary cutaneous melanoma. *Semin Cancer Biol*. 10 (2000) 319-26
- Ramana C.V., Boldogh I., Izumi T., Mitra S. Activation of apurinic/apyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95 (1998) 5061-6
- Rate W.R., Solin L.J., Turrisi A.T. Palliative radiotherapy for metastatic malignant melanoma : brain metastases, bone metastases, and spinal cord compression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 15 (1988) 859-64
- Ravi R., Mookerjee B., Bhujwala Z.M., Sutter C.H., Artemov D., Zeng Q., Dillehay E., Madan A., Semenza G.L., Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev*. 14 (2000) 34-44
- Roberts D.L., Anstey A.V., Barlow R.J., Cox N.H., Newton Bishop J.A., Corrie P.G., Evans J., Gore M.E., Hall P.N., Kirkham N. British Association of Dermatologists; Melanoma Study Group. U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*. 146 (2002) 7-17
- Rooseboom M., Commandeur J.N., Vermeulen N.P. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev*. 56 (2004) 53-102
- Sakaguchi K., Herrera J.E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson C.W., Appella E. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*. 12 (1998) 2831-41

- Sambucetti L.C., Fischer D.D., Zabudoff S., Kwon P.O., Chamberlin H., Trogani N., Xu H., Cohen D. Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem.* 274 (1999) 34940-7
- Sato T., Koseki T., Yamato K., Saiki K., Konishi K., Yoshikawa M., Ishikawa I., Nishihara T. P53-independent expression of p21(CIP1/WAF1) in plasmacytic cells during G(2) cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Infect Immun.* 70 (2002) 528-34
- Satyamoorthy K., Bogenrieder T., Herlyn M. No longer a molecular black box--new clues to apoptosis and drug resistance in melanoma. *Trends Mol Med.* 7 (2001) 191-4
- Schmid-Wendtner M.H., Brunner B., Konz B., Kaudewitz P., Wendtner C.M., Peter R.U., Plewig G., Volkenandt M. Fractionated radiotherapy of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma in 64 patients. *J Am Acad Dermatol* 43 (2000) 477-482
- Schwipper V. Malignes Melanom der Kopf-Hals-Region. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 4 (2000) 177-86
- Seemann S., Hainaut P. Roles of thioredoxin reductase 1 and APE/Ref-1 in the control of basal p53 stability and activity. *Oncogene.* 24 (2005) 3853-63
- Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3 (2003) 721-32
- Seto E., Usheva A., Zambetti G.P., Momand J., Horikoshi N., Weinmann R., Levine A.J., Shenk T. Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (1992) 12028-32
- Seykora J.T., Jih D., Elenitsas R., Horng W.H., Elder D.E. Gene expression profiling of melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol.* 25 (2003) 6-11
- Sharpless N.E. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res.* 576 (2005) 22-38
- Shaulsky G., Goldfinger N., Ben-Ze'ev A., Rotter V. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 10 (1990) 6565-77
- Shaw P., Bovey R., Tardy S., Sahli R., Sordat B., Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (1992) 4495-9
- Shin T.H., Paterson A.J., Grant J.H. 3rd, Meluch A.A., Kudlow J.E. 5-Azacytidine treatment of HA-A melanoma cells induces Sp1 activity and concomitant transforming growth factor alpha expression. *Mol Cell Biol.* 12 (1992) 3998-4006
- Siddik Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 22 (2003) 7265-79
- Siemer S., Ornskov D., Guerra B., Boldyreff B., Issinger O.G. Determination of mRNA, and protein levels of p53, MDM2 and protein kinase CK2 subunits in F9 cells after treatment with the apoptosis-inducing drugs cisplatin and carboplatin. *Int J Biochem Cell Biol.* 31 (1999) 661-70
- Silber J.R., Bobola M.S., Blank A., Schoeler K.D., Haroldson P.D., Huynh M.B., Kolstoe D.D. The apurinic/aprimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. *Clin Cancer Res.* 8 (2002) 3008-18
- Sober A.J., Chuang T.Y., Duvic M., Farmer E.R., Grichnik J.M., Halpern A.C., Ho V., Holloway V., Hood A.F., Johnson T.M., Lowery B.J. Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 45 (2001) 579-86
- Song X., Liu X., Chi W., Liu Y., Wei L., Wang X., Yu J. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene. *Cancer Chemother Pharmacol.* 58 (2006) 776-84
- Soto J.L., Cabrera C.M., Serrano S., Lopez-Nevot M.A. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A, and CDKN2B. *BMC Cancer.* 5 (2005) 36

- Sowa Y., Orita T., Minamikawa S., Nakano K., Mizuno T., Nomura H., Sakai T. Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochem Biophys Res Commun.* 241 (1997) 142-50
- Sparrow L.E., Soong R., Dawkins H.J., Iacopetta B.J., Heenan P.J. P53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res.* 5 (1995) 93-100
- Spitler L.E. A randomized trial of levamisole versus placebo as adjuvant therapy in malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 9 (1991) 736-40
- Springler B., Whittington D.A., Lippard S.J. A crystal structure of an Oxaliplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex. *Inorg Chem.* 40 (2001) 5596-602
- Staunton M.J., Gaffney E.F. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am J Clin Pathol.* 103 (1995) 300-7
- Streetly A., Markowe H. Changing trends in the epidemiology of malignant melanoma: gender differences and their implications for public health. *Int J Epidemiol.* 24 (1995) 897-907
- Stretch J.R., Gatter K.C., Ralfkiaer E., Lane D.P., Harris A.L. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res.* 51 (1991) 5976-9
- Stürzbecher H.W., Addison C., Jenkins J.R. Characterization of mutant p53-hsp72/73 protein-protein complexes by transient expression in monkey COS cells. *Mol Cell Biol.* 8 (1988) 3740-7
- Taylor W.R., Schonthal A.H., Galante J., Stark G.R. P130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53. *J Biol Chem.* 276 (2001) 1998-2006
- Taylor W.R., Stark G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* 20 (2001) 1803-15
- Tentori L., Graziani G. Correspondence re: DC Lev et al., Dacarbazine causes transcriptional up-regulation of interleukin 8 and vascular endothelial growth factor in melanoma cells: a possible escape mechanism from chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2 (2003) 753-63
- Tentori L., Orlando L., Lacal P.M., Benincasa E., Faraoni I., Bonmassar E., D'Atri., Graziani G. Inhibition of O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase or poly(ADP-ribose) polymerase increases susceptibility of leukemic cells to apoptosis induced by temozolomide. *Mol Pharmacol.* 52 (1997) 249-58
- Thompson M., Andrade V.A., Andrade S.J., Pusch T., Ortega J.M., Goes A.M., Leite M.F. Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 301 (2003) 267-74
- Thorn M., Ponten F., Bergstrom R., Sparen P., Adami H.O. Trends in tumour characteristics and survival of malignant melanoma 1960-84: a population-based study in Sweden. *Br J Cancer.* 70 (1994) 743-8
- Tomescu D., Kavanagh G., Ha T., Campbell H., Melton D.W. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. *Carcinogenesis.* 22 (2001) 403-8
- Torgeman A., Mor-Vaknin N., Zelin E., Ben-Aroya Z., Löchelt M., Flügel R.M., Aboud M. Sp1-p53 heterocomplex mediates activation of HTLV-I long terminal repeat by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate that is antagonized by protein kinase C. *Virology.* 281 (2001) 10-20
- Tran T.A., Ross J.S., Carlson J.A., Mihm M.C. Jr. Mitotic cyclins and cyclin-dependent kinases in melanocytic lesions. *Hum Pathol.* 29 (1998) 1085-90
- Tront J.S., Hoffman B., Liebermann D.A. Gadd45a suppresses Ras-driven mammary tumorigenesis by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 stress signaling resulting in apoptosis and senescence. *Cancer Res.* 66 (2006) 8448-54
- Trotter M.J., Tang L., Tron V.A. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol.* 24 (1997) 265-71

- Tucker M.A., Halpern A., Holly E.A., Hartge P., Elder D.E., Sagebiel R.W., Guerry D. 4th, Clark W.H. Jr. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA*. 277 (1997) 1439-44
- Tuve S., Wagner S.N., Schittek B., Pützer B.M. Alterations of DeltaTA-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression. *Int J Cancer*. 108 (2004) 162-6
- van der Borcht A., Valckx A., Van Dun J., Grand-Perret T., De Schepper S., Vialard J., Janicot M., Arts J. Effect of an hdm-2 antagonist peptide inhibitor on cell cycle progression in p53-deficient H1299 human lung carcinoma cells. *Oncogene*. 25 (2006) 6672-7
- van der Spek-Keijser L.M., van der Rhee H.J., Toth G., Van Westering R., Bruijn J.A., Coebergh J.W. Site, histological type, and thickness of primary cutaneous malignant melanoma in western Netherlands since 1980. *Br J Dermatol*. 136 (1997) 565-71
- Veronesi U., Cascinelli N. Narrow excision (1cm margin). A safe procedure for thin cutaneous melanoma. *Arch Surg*. 126 (1991) 438-441
- Vousden K.H. Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science*. 309 (2005) 1685-6
- Vousden K.H., Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2 (2002) 594-604
- Walker L.J., Craig R.B., Harris A.L., Hickson I.D. A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. *Nucleic Acids Res*. 22 (1994) 4884-9
- Walker W.H., Fitzpatrick S.L., Saunders G.F. Human placental lactogen transcriptional enhancer. Tissue specificity and binding with specific proteins. *J Biol Chem*. 265 (1990) 12940-8
- Wang Y., Debatin K.M., Hug H. HIPK2 overexpression leads to stabilization of p53 protein and increased p53 transcriptional activity by decreasing Mdm2 protein levels. *BMC Mol Biol*. 2 (2001) 8
- Wang X.W., Harris C.C. TP53 tumour suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Surv*. 28 (1996) 169-96
- Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92 (1995) 5510-4
- Wang X., Li M., Wang J., Yeung C.M., Zhang H., Kung H.F., Jiang B., Lin M.C. The BH3-only protein, PUMA, is involved in oxaliplatin-induced apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 71 (2006) 1540-50 (a)
- Wang Y., Zhu W., Levy D.E. Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. *Methods*. 39 (2006) 356-62 (b)
- Wei Q., Lee J.E., Gershenwald JE et al. Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 95 (2003) 308-15
- Wetzel C.C., Berberich S.J. DNA binding activities of p53 protein following cisplatin damage of ovarian cells. *Oncol Res*. 10 (1998) 151-61
- Wheatley K., Ives N., Eggermont K., Kirkwood J., Cascinelli N., Markovic S.N., Hancock B., Lee S., Suci S. Interferon-alpha as adjuvant therapy for melanoma: An individual patient data meta-analysis of randomised trials. *J Clin Oncol*. 25 (2007) 8526
- White R.R., Stanley W.E., Johnson J.L., Tyler D., Seigler H.F. Long-term survival in 2,505 patients with melanoma with regional lymph node metastasis. *Ann Surg*. 235 (2002) 879-887
- Wiesener M.S., Turley H., Allen W.E., Willam C., Eckardt K.U., Talks K.L., Wood S.M., Gatter K.C., Harris A.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Maxwell P.H. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*. 92 (1998) 2260-8
- Wu L., Levine A.J. Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol Med*. 3 (1997) 441-51

- Xanthoudakis S., Miao G.G., Curran T. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 (1994) 23-7
- Xiao H., Pearson A., Coulombe B., Truant R., Zhang S., Regier J.L., Triezenberg S.J., Reinberg D., Flores O., Ingles C.J. Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol.* 14 (1994) 7013-24
- Yang S., Irani K., Heffron S.E., Jurnak F., Meyskens F.L. Jr. Alterations in the expression of the apurinic/apyrimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE/Ref-1) in human melanoma and identification of the therapeutic potential of resveratrol as an APE/Ref-1 inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 4 (2005) 1923-35
- Yin Y., Tainsky M.A., Bischoff F.Z., Strong L.C., Wahl G.M. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell.* 70 (1992) 937-48
- Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A., Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature.* 352 (1991) 345-7
- Young A.R. The sunburn cell. *Photodermatol.* 4 (1987) 127-34
- Zakut-Houri R., Oren M., Bienz B., Lavie V., Hazum S., Givol D. A single gene and a pseudogene for the cellular tumour antigen p53. *Nature.* 306 (1983) 594-7
- Zeng J., Aldag P., Elsaesser F. Signal transduction mediating gene expression of SP1, LHbeta-subunit and GH in response to GnRH or GHRH in the postnatal and fetal porcine anterior pituitary in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 113 (2005) 21-30
- Zhan Q., Carrier F., Fornace A.J. Jr. Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol Cell Biol.* 13 (1993) 4242-50
- Zhang H. P53 plays a central role in UVA and UVB induced cell damage and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Lett.* 244 (2006) 229-38
- Ziegler A., Leffell D.J., Kunala S., Sharma H.W., Gailani M., Simon J.A., Halperin A.J., Baden H.P., Shapiro P.E., Bale A.E. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (1993) 4216-20
- Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E., Lim M., Hilton D.A., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W.B., Semenza G.L., Simons J.W. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 59 (1999) 5830-5
- Zhou J., Ahn J., Wilson S.H., Prives C. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J.* 20 (2001) 914-23

9. Anhang

p53 Expression u. Stabilität

Gen	nach UV-C				nach UV-B				nach Cisplatin				nach Dacarbazin									
	Melanozyten	SK-Mel 30	COLO-849	Mel-JUSO	SK-Mel 1	SK-Mel 3	IGR-37	Melanozyten	SK-Mel 30	COLO-849	Mel-JUSO	SK-Mel 1	SK-Mel 3	IGR-37	Melanozyten	SK-Mel 30	COLO-849	Mel-JUSO	SK-Mel 1	SK-Mel 3	IGR-37	
BZRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CREBBP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPI	-	-	-	-	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,60	-	-	-	-
E2F1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EP300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDM2	-	-	-	-	-	-	-	0,32	3,49	-	2,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MTBP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NFKB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NUMB	-	-	-	2,87	-	-	0,33	-	-	2,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

p53 Modifikation

ATM	-	-	-	0,33	0,24	-	-	0,25	0,30	-	0,36	-	0,33	0,06	-	0,20	-	-	-	-	-	0,15
ATR	-	-	-	-	-	-	-	0,09	-	-	0,35	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-
CCNH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDK7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,00	-	-	-	-	-	-
CHEK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CHEK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CREBBP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSNK1A1	-	-	-	-	0,26	-	-	-	-	-	-	0,33	-	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-
CSNK2A1	-	-	-	0,37	0,15	-	-	-	0,36	-	-	-	0,21	-	-	-	-	3,22	-	-	-	-
CSNK2A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSNK2B	-	-	-	0,06	0,18	2,71	-	0,18	-	0,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,38
EP300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HIPK2	-	-	-	0,10	0,32	-	-	-	0,32	0,13	0,17	-	0,26	0,04	0,14	-	0,27	-	-	-	-	0,04
KIP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KIP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAP2K4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAP2K7	-	-	-	0,35	-	-	-	0,16	-	0,29	-	0,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,58
MAPK8IP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17
PCAF	-	-	-	-	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PML	-	-	-	-	-	-	-	0,32	0,28	-	-	0,30	-	0,35	0,24	-	-	-	-	-	-	0,23
PRKCA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRKCB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,30
PRKCG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRKCQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRKDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SIRT1	-	-	-	0,16	-	-	-	-	0,20	-	-	15,53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

