

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

Der p53-Signalweg im Schleimhautmelanom

Veronika Metzler

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Elias Scherer

2. Prof. Dr. Henning A. Bier

Die Dissertation wurde am 30.10.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.03.2017 angenommen.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Definition	1
1.2	Epidemiologie	1
1.3	Einteilung und Klassifikation	2
1.4	Ätiologie und Risikofaktoren	6
1.5	Therapie	7
1.6	Das Chemotherapeutikum Cisplatin	10
1.7	Molekularpathologie und Betrachtung des p53 Signalwegs beim malignen Melanom	11
1.8	Publikationen	14
2	Fragestellung	15
3	Material	16
3.1	Geräte	16
3.2	Software	17
3.3	Verbrauchsmaterialien	17
3.4	Chemikalien, Reagenzien, Zellkultur	17
3.5	Antikörper, Inhibitoren, Primer	19
3.6	Assays, Kits, Sonstiges	22
4	Methoden	23
4.1	FFPE(formalin-fixed-paraffin-embedded)-Material	23
4.1.1	RNA-Isolation	23
4.1.2	DNA-Isolation	24
4.1.3	Immunhistochemie	25
4.2	Zellkultur	27
4.2.1	RNA-Isolation	28
4.2.2	Proteinisolation	28
4.3	Weiterführende Untersuchungen	29

4.3.1	cDNA-Synthese	29
4.3.2	Real-time-PCR (<i>Polymerase-chain-reaction</i>)	30
4.3.3	Real-time-PCR Auswertung	31
4.3.4	Proteinuntersuchungen	32
4.3.5	Konventionelle PCR	35
4.3.6	<i>C-KIT</i> -Sequenzierung	36
5	Ergebnisse	37
5.1	Real-time-PCR aus FFPE-Material	37
5.2	Uneinheitliche Färbemuster in der Immunhistochemie von Schleimhaut- und kutanen Melanomen	38
5.2.1	p53 ist konstitutionell in beiden Tumorentitäten erhöht mit deutlichem Überwiegen der kutanen Melanome	38
5.2.2	Kaum Unterschiede in der MDM2-Expression	39
5.2.3	Vorwiegend negatives Ergebnis in der HIPK2-Immunhistochemie	40
5.2.4	Die Immunhistochemie von p21 zeigt keine Unterschiede zwischen den Kollektiven	41
5.2.5	In Schleimhautmelanomen wird GADD45A signifikant höher exprimiert als in kutanen Melanomen	42
5.2.6	In kutanen Melanomen ist der Anteil PUMA positiver Färbungen deutlich erhöht	43
5.2.7	Überwiegen negativer BAX-Expression in Schleimhautmelanomen	44
5.2.8	Caspase 9-Färbungen fast ausschließlich negativ	45
5.2.9	Vorwiegend negative BCL2-Färbeergebnisse	46
5.2.10	Überwiegen der BCL2A1-Expression in kutanen Melanomen	47
5.2.11	Höherexpression von CDK1 in kutanen Melanomen	48
5.2.12	Kaum Unterschiede in der Expression von C-Kit	49
5.3	Das Regulationsverhalten der Zelllinien nach Behandlung mit 8 μ M Cisplatin ist in Schleimhautmelanomen den Melanozyten ähnlicher als in kutanen Melanomen	50

5.3.1	Deutlich geringere Expression aller untersuchten Gene in Melanomen im Vergleich zu Melanozyten	50
5.3.2	Auf Proteinebene deutliche Induzierbarkeit von p53, p21 und MDM2 bei uneinheitlichem Verhalten im weiteren <i>downstream</i>	52
5.4	Sequenzanalyse	53
6	Diskussion.....	54
7	Zusammenfassung.....	62
8	Danksagung.....	63
9	Verzeichnisse.....	64
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	64
9.2	Tabellenverzeichnis.....	65
9.3	Literaturverzeichnis	66
10	Anhang.....	75

1 Einleitung

1.1 Definition

Beim malignen Melanom handelt es sich um einen hochaggressiven Tumor, der vom melanozytären Zellsystem ausgeht und hauptsächlich an der Haut vorkommt. Es gibt auch selten andere Manifestationsorte wie Konjunktiva, Uvea, Hirnhäute und Schleimhäute. Meist ist das Melanom stark pigmentiert, doch es treten auch amelanotische Formen auf. Seine ungünstige Prognose ergibt sich aus der im Verhältnis zur Tumormasse frühzeitigen Tendenz zur Metastasierung und ist somit für 90 % der Hautkrebsmortalität verantwortlich (AWMF, Version 09/2007).

Im Gegensatz dazu zeigt das erstmals 1856 von Weber (Weber, 1859) beschriebene Schleimhautmelanom nur eine sehr schwache Tendenz zur Metastasierung, die das Gesamtüberleben betroffener Patienten wenig beeinflusst (Manolidis & Donald, 1997). Die trotzdem sehr schlechte Prognose dieser Tumorerkrankung wird unter anderem auf die fehlende Tumorkontrolle an der Primärlokalisierung zurückgeführt (Panje & Moran, 1986).

1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des malignen Melanoms in Deutschland entspricht der in Mitteleuropa und liegt bei ca. 10 bis 12 Fällen pro 100 000 Einwohnern pro Jahr (Garbe & Leiter, 2009). Das entspricht 1,5 – 2 % aller Malignitäten (Garbe & Orfanos, 1992). In den letzten Jahrzehnten zeigte sich indessen ein Anstieg der Inzidenz in kaukasischen Populationen, wogegen sie bei dunkelhäutigeren Populationen (z.B. Schwarzafrikaner, Asiaten) auf einem niedrigen Niveau stabil blieb (Garbe & Leiter, 2009). Erklären lässt sich dieser Trend wahrscheinlich durch die verbesserte Früherkennung in Screening-Untersuchungen und ein verändertes Freizeitverhalten (z.B. Solarienbesuche) (Brochez & Naeyaert, 2000). Vor allem Länder mit besonders starker Sonneneinstrahlung zeigen höhere Inzidenzen. So liegt die Inzidenz in Australien bei 40 – 60 pro 100 000 Einwohnern pro Jahr (Burton *et al.*, 1993). Die meisten Fälle in Europa treten in den skandinavischen Ländern mit ca. 15 Fällen pro 100 000 Einwohnern pro Jahr auf (Armstrong & Krickler, 1994, Osterlind *et al.*, 1988, Thorn *et al.*, 1990). Männer (55 %) sind etwas häufiger betroffen als Frauen (45 %).

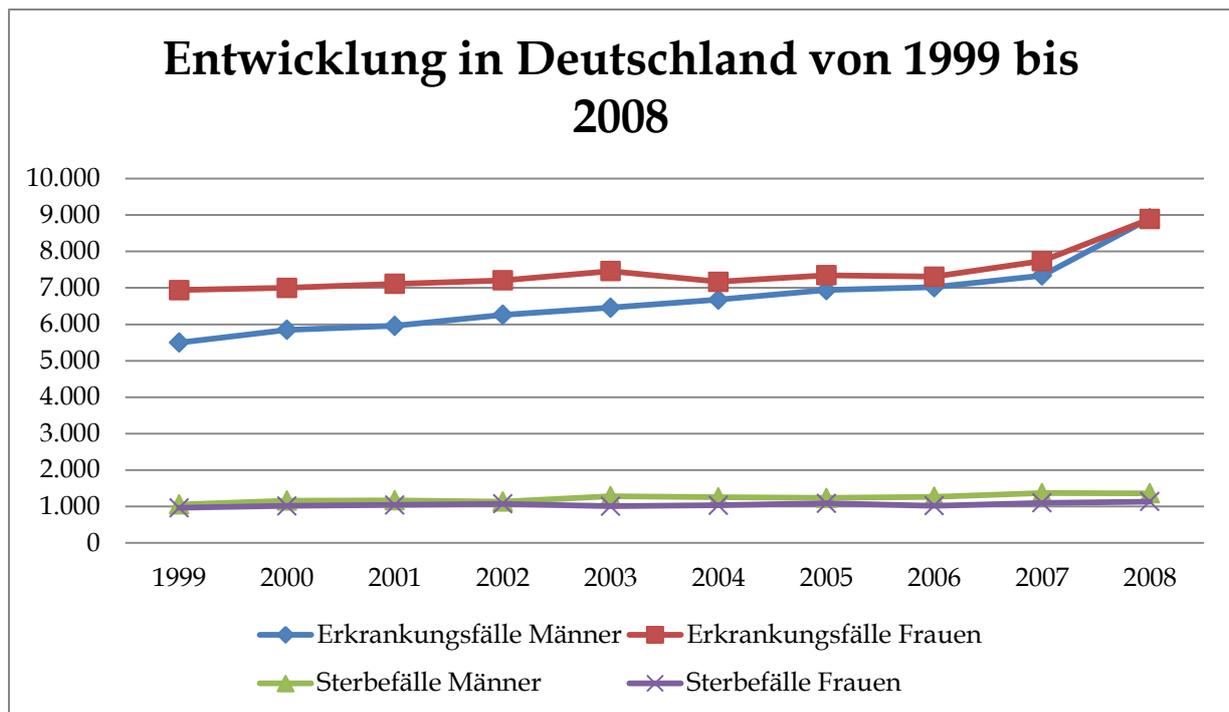


Tabelle 1: Entwicklung der Erkrankungs- und Sterbefälle des Malignen Melanoms in Deutschland von 1999 bis 2008 (Krebsregisterdaten des Bundeskrebsregister für das Maligne Melanom, 2010): Es zeigt sich eine steigende Erkrankungsrate bei weitgehend gleichbleibender Sterberate für beide Geschlechter.

Das Schleimhautmelanom ist mit einer Häufigkeit von 1 : 11 626 aller Malignitäten eine wesentlich seltenerer Erkrankung (Hormia & Vuori, 1969). Die Inzidenz wird mit 1,05 – 1,7 % aller Melanomerkrankungen angegeben (Moore & Martin, 1955, Allen & Spitz, 1953, Jemal *et al.*, 2010). Hier sind Frauen mit 65 % häufiger betroffen als Männer mit 35 % (Chang *et al.*, 1998). Das Schleimhautmelanom tritt vor allem bei älteren Menschen mit einem mittleren Erkrankungsalter von 67 Jahren (Gilligan & Slevin, 1991), im Vergleich zu 54 Jahren beim malignen Melanom (Garbe & Blum, 2001), auf.

1.3 Einteilung und Klassifikation

Die häufigste Unterform des malignen Melanoms ist das superfiziell spreitende Melanom mit einem Anteil von 57,4 % (Garbe *et al.*, 1995). Die klassische Läsion imponiert als unterschiedlich pigmentierter Fleck und zeigt ein pagetoides intraepidermales Wachstum (Demitsu *et al.*, 2000). Der zweithäufigste Subtyp ist das noduläre Melanom mit 21,4 % (Garbe *et al.*, 1995). Es hat per definitionem keine radiale Wachstumsphase und ist deshalb nodulär, polypoid oder gestielt (Plotnick *et al.*, 1990). Es folgt das Lentigo-maligna Melanom mit 8,8 % (Garbe *et al.*, 1995). Etwa ein zwanzigstel der Melanoma-in-situ-Form Lentigo maligna ist progredient zum

invasiven Melanom (Weinstock & Sober, 1987). Es tritt besonders oft an den UV-Licht exponierten Hautarealen (z.B. Gesicht, obere Extremität) älterer Patienten auf (Cohen, 1995). Die letzte größere Unterform ist das akrolentiginöse maligne Melanom mit 4 % Häufigkeit (Garbe *et al.*, 1995). Es tritt palmar und plantar, z.T. auch unguis auf und kommt bevorzugt bei Japanern und Schwarzen vor (Chen *et al.*, 1999). Es werden noch zwei weitere klinisch-histologische Subtypen unterteilt, nicht klassifizierbare Melanome (3,5 %) (Garbe *et al.*, 1995) und „Andere“ (4,9 %) (Garbe *et al.*, 1995). In diese Kategorie sind das Schleimhautmelanom, aber auch amelanotische, uveale und sonstige extrakutane Melanome einzuordnen.

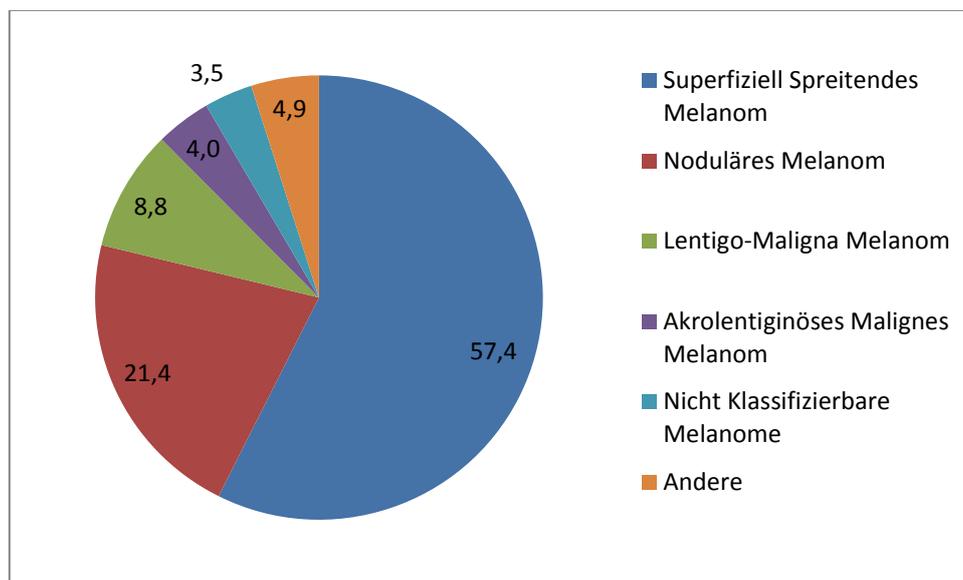


Abbildung 1: Prozentuale Aufteilung der histologischen Subtypen des Malignen Melanoms nach Garbe *et al.* (Garbe *et al.*, 1995)

Das 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit kutanem malignem Melanom liegt bei etwa 80 % (Chang *et al.*, 1998). Die Prognose ist allerdings stark vom Erkrankungsstadium bei Diagnose abhängig, wie in Tabelle 2 zu sehen ist (Balch *et al.*, 2001).

Das 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit Schleimhautmelanom liegt bei 25 % (Chang *et al.*, 1998). Die Prognose ist weniger vom Vorhandensein lokoregionärer Lymphknoten oder Fernmetastasen als vielmehr von der Lokalisation des Primarius abhängig. So liegt das 5-Jahres-Überleben für Schleimhautmelanome der Nasenhaupthöhle bei 15 % - 30 %, der Mundhöhle bei etwa 12 % und der Nasennebenhöhlen bei 0 % - 5 % (Bachar *et al.*, 2008). Aufgrund der äußerst schlechten Prognose beim Schleimhautmelanom wird bei der Klassifikation auf die T-Kategorien T1 und T2 sowie auf die Tumorstadien I und II verzichtet (Sobin & Compton, 2010).

T-, N- und M-Klassifikation beim kutanen Melanom (Petro *et al.*, 2004):

TX: Material nicht beurteilbar

T0: Unbekannter Primarius

Tis: Melanoma in situ

T1: Tumordicke nach Breslow ≤ 1 mm

- a. ohne Ulzeration
- b. mit Ulzeration

T2: Tumordicke nach Breslow > 1 mm und ≤ 2 mm

- a. ohne Ulzeration
- b. mit Ulzeration

T3: Tumordicke nach Breslow > 2 mm und ≤ 4 mm

- a. ohne Ulzeration
- b. mit Ulzeration

T4: Tumordicke nach Breslow > 4 mm

- a. ohne Ulzeration
- b. mit Ulzeration

NX: Material nicht beurteilbar

N0: Keine regionalen Lymphknotenmetastasen

N1: Metastase in einem regionalen Lymphknoten

- a. Mikrometastase
- b. Makrometastase

N2: Metastase in zwei oder drei regionalen Lymphknoten

- a. Mikrometastase
- b. Makrometastase
- c. In-transit- oder Satellitenmetastase ohne Lymphknotenmetastasen

N3: Metastasen in mindestens vier regionalen Lymphknoten, Lymphknotenpaket oder In-transit- oder Satellitenmetastase mit Lymphknotenmetastasen

MX: Material nicht beurteilbar

M0: Keine Fernmetastasierung

M1: Fernmetastasierung

- a. in Haut, Subkutis oder Lymphknoten mit normaler LDH
- b. in der Lunge mit normaler LDH
- c. alle sonstigen Metastasierungslokalisationen bzw. Haut, Subkutis oder Lunge mit erhöhter LDH

Stadium	TNM-Klassifikation			5-Jahres-Überleben
0	Tis	N0	M0	100 %
IA	T1a	N0	M0	95,3 %
IB	T1b	N0	M0	90,9 %
	T2a	N0	M0	89,0 %
IIA	T2b	N0	M0	77,4 %
	T3a	N0	M0	78,7 %
IIB	T3b	N0	M0	63,0 %
	T4a	N0	M0	67,4 %
IIC	T4b	N0	M0	45,1 %
IIIA	jedes Ta	N1a	M0	69,5 %
	jedes Ta	N2a	M0	63,3 %
IIIB	jedes Tb	N1a	M0	52,8 %
	jedes Tb	N2a	M0	49,6 %
	jedes Ta	N1b	M0	59,0 %
	jedes Ta	N2b	M0	46,3 %
IIIC	jedes Tb	N1b	M0	29,0 %
	jedes Tb	N2b	M0	24,0 %
	jedes T	N3	M0	26,7 %
IV	jedes T	jedes N	M1a	18,8 %
	jedes T	jedes N	M1b	6,7 %
	jedes T	jedes N	M1c	9,5 %

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Malignen Melanoms (Balch *et al.*, 2001)

T-, N- und M-Klassifikation beim Schleimhautmelanom (Sobin & Compton, 2010):

T3: begrenzt auf Epithel/Submucosa

T4a: infiltriert tiefes Weichgewebe, Knorpel, Knochen oder bedeckende Haut

T4b: infiltriert eine oder mehrere Strukturen: Dura, Gehirn, Schädelbasis, A. carotis, Spatium masticatorium, prävertebraler Raum, untere Hirnnerven (IX, X, XI, XII), Mediastinalstrukturen

N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1: regionäre Lymphknotenmetastasen

M0: keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

Stadium	TNM-Klassifikation		
III	T3	N0	M0
IVA	T3	N1	M0
	T4a	N0-N1	
IVB	T4b	jedes N	M0
IVC	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 3: Stadieneinteilung des Schleimhautmelanoms (Sobin & Compton, 2010)

1.4 Ätiologie und Risikofaktoren

Sowohl beim Schleimhautmelanom als auch beim kutanen Melanom ist die genaue Ätiologie bisher ungeklärt. Beim kutanen Melanom wird die UV-Strahlung als wichtigster Risikofaktor diskutiert. So besteht ein Zusammenhang zwischen intermittierender, intensiver UV-Exposition mit schweren Sonnenbränden und dem Entstehen kutaner maligner Melanome (Elwood & Jopson, 1997, Autier *et al.*, 2011, Langley & Sober, 1997, Gandini *et al.*, 2005). Ob die UV-Belastung bereits im Kindesalter oder erst im Erwachsenenalter besteht, scheint nach einer Metaanalyse von Dennis *et al.* keinen signifikanten Unterschied zu machen (Dennis *et al.*, 2008).

Desweiteren stellen eine positive Familienanamnese, die Anzahl benigner Nävi und vor allem das Vorhandensein dysplastischer Nävi weitere Risikofaktoren dar (Platz *et al.*, 2000, Williams *et al.*, 2011). Auch Hauttyp I nach Fitzpatrick mit blauen Augen, rötlichem oder hellblondem Haar, wenig pigmentierter Haut und Sommersprossen, gehört zu den Risikofaktoren (Williams *et al.*, 2011, Wei *et al.*, 2003).

Eine genetische Prädisposition zur Entwicklung verschiedener Hauttumoren wie Basalzellkarzinome, Plattenepithelkarzinome und Melanome liegt bei der Xeroderma pigmentosum vor. Ursächlich für diese autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung ist ein Defekt in der DNA (desoxyribonucleic acid)-Reparatur (Lehmann *et al.*, 2011).

Das kutane maligne Melanom fällt meist als juckende, blutende, rasch größtenprogrediente, teils erhabene, nävusähnliche Läsion auf (Vestergaard *et al.*, 2008).

Für das Schleimhautmelanom sind keine Risikofaktoren bekannt, die Exposition gegenüber Tabakrauch und Formaldehyd werden als solche diskutiert (Holmstrom & Lund, 1991, Manolidis & Donald, 1997). Für die sehr seltenen Schleimhaut-Nävi wird aufgrund des theoretischen Entartungsrisikos eine Exzision empfohlen (Batsakis *et al.*, 1982).

Beim Schleimhautmelanom treten Symptome hauptsächlich in weit fortgeschrittenen Stadien auf. Die ersten Beschwerden sind meist Epistaxis, Schmerzen, Gesichtsdeformitäten oder nasale Obstruktion (Manolidis & Donald, 1997).

1.5 Therapie

Die Datenlage für die Therapie des malignen Melanoms ist durch die 2013 aktualisierte Leitlinie sehr gut etabliert (Pflugfelder *et al.*, 2013).

Die am weitesten verbreitete Therapieoption ist die Exzision der primären kutanen malignen Melanome. Dabei werden abhängig von der Tumordicke folgende Sicherheitsabstände empfohlen:

- Tumordicke: Melanoma in situ – Exzisionsrand 5 mm
- Tumordicke < 2 mm nach Breslow – Exzisionsrand 10 mm
- Tumordicke >2 mm nach Breslow – Exzisionsrand 20 mm

Je nach Lokalisation des Tumors bezüglich angrenzender Strukturen (z.B. drohende Verstümmelung bei Lage im Gesicht oder akral) ist nach Absprache und ausführlicher Aufklärung des Patienten auch ein Abweichen von den üblichen Sicherheitsabständen möglich. Eine Aufarbeitung des so gewonnenen histologischen Materials durch einen Pathologen ist obligat.

Bei Verbleib von mikroskopischen oder makroskopischen Tumoranteilen nach Primärresektion (R1- bzw. R2-Situation) soll, wenn möglich, eine Nachresektion zum Erreichen der Tumorfreiheit (R0-Situation) durchgeführt werden. Ist dies nicht möglich, können andere lokale Verfahren wie hypertherme Extremitätenperfusion oder Kryochirurgie zum Einsatz kommen.

Bei Lentigo-maligna-Melanomen und inoperablen Melanomen kann zum Erreichen der lokalen Tumorkontrolle eine primäre Radiotherapie erwogen werden. Auch bei desmoplastischen Melanomen ohne ausreichenden Resektionssicherheitsabstand besteht die Möglichkeit einer postoperativen Radiatio zur Verbesserung der lokalen Kontrolle.

Bei Melanompatienten bis Stadium IIB soll die weiterführende Diagnostik eine lokoregionäre Lymphknotenultraschalluntersuchung umfassen. Außerdem kann fakultativ der melanomspezifische Tumormarker S100 bestimmt werden. Darüber hinaus wird bei Melanomen ab einer Dicke von einem Millimeter bzw. auch bei dünneren Melanomen mit zusätzlichen Risikofaktoren (z.B. Ulzeration, erhöhte Mitoserate) eine

Sentinellymphknotenbiopsie empfohlen. Eine prophylaktische Lymphknoten-dissektion des Abstromgebiets bringt keinen Überlebensvorteil und sollte deshalb nicht durchgeführt werden.

Bei Patienten der Tumorstadien IIC bis IIIC ist eine Erweiterung der Staging-Untersuchungen um Schnittbildgebung angezeigt. Die sensitivsten Ergebnisse hierzu liefern eine kraniale Magnetresonanztomographie sowie ein PET-CT für den übrigen Körper. Bei gesicherter lymphogener Metastasierung ohne Hinweis auf Fernmetastasen soll eine systematische Lymphknotendissektion der sich anschließenden Lymphabflussgebiete sowie der Lymphknotenstationen erfolgen. Sind mehr als drei Lymphknoten befallen bzw. ist eine Metastase größer als drei Zentimeter oder hat ein Kapseldurchbruch stattgefunden kann auf empirischer Grundlage eine Strahlentherapie mit 50-60 Gy angeschlossen werden. Ein Einfluss auf das Überleben durch die Radiatio konnte bislang nicht gesichert werden. Auch adjuvante Therapien haben bis Stadium IIIC keinen gesicherten Stellenwert. Allein die Therapie mit pegyliertem Interferon α kann erwogen werden. Allerdings sollte auf Grund der erheblichen Nebenwirkungen eine sehr kritische Indikationsstellung im Hinblick auf die Lebensqualität erfolgen.

Beim Vorliegen von lokoregionären Satelliten- oder In-transit-Metastasen ohne Hinweis auf Fernmetastasierung soll eine R0-Resektion angestrebt werden. Eine weitere Option zur lokalen Kontrolle stellt die Radiotherapie dar. Andere lokale Verfahren kommen im Rahmen klinischer Studien zum Einsatz, darunter die intratumorale Injektion von Interleukin 2, die intratumorale Elektrochemotherapie mit Bleomycin oder Cisplatin und andere. Bei multiplen, rezidivierenden, auf eine Extremität beschränkten, sonst unkontrollierbaren Metastasen besteht die Möglichkeit der isolierten Extremitätenperfusion mit Melphalan.

Im Stadium IV einer Melanomerkrankung nehmen Chirurgie und Strahlentherapie nur noch eine untergeordnete Rolle ein. Es können lokale Interventionen bei akuten Symptomen indiziert sein, z.B. Tumordebulking bei Druck auf Nerven, Ganzhirnbestrahlung bei zentralneurologischer Symptomatik durch Hirnmetastasen.

An systemischen Therapeutika kommen klassische Monochemotherapien mit Dacarbazin, Temozolamid und Fotemustin zum Einsatz. Polychemotherapieschemata erhöhen zwar das Ansprechen, eine Verlängerung des Gesamtüberlebens konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Beim Vorliegen von BRAF-Mutationen (40-60 % der Fälle) kann eine Therapie mit BRAF-

Inhibitoren z.B. Vemurafenib durchgeführt werden. Wegen der raschen Resistenzentwicklung ist das Ansprechen auf diese Therapie auf 5 bis 7 Monate beschränkt. Selten kommen auch C-Kit-Mutationen vor, die bei relativ milden Nebenwirkungen auf Thyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib ansprechen. Alternativ gibt es die Möglichkeit einer Immuntherapie mit Ipilimumab, das über Stimulation von Aktivität und Proliferation von T-Zellen eine Aktivierung des Immunsystems vermittelt. Gerade in hohen Tumorstadien in palliativer Behandlungsintention steht die Lebensqualität des Patienten im Vordergrund. Diese kann durch psychoonkologische Betreuung, adäquate Schmerztherapie, komplementäre Medizin, seelsorgerische Begleitung und weitere Faktoren grundlegend verbessert werden.

Die Nachsorge bei einer Melanomkrankung dauert 10 Jahre (Tabelle 4).

Jahr	Grunduntersuchung			Lymphknotenultraschall			S100 im Serum			Bildgebung		
	1-3	4-5	6-10	1-3	4-5	6-10	1-3	4-5	6-10	1-3	4-5	6-10
IA	6 mtl.	12 mtl.	12 mtl.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB- IIB	3 mtl.	6 mtl.	6-12 mtl.	6 mtl.	-	-	3 mtl.	-	-	-	-	-
ab IIC	3 mtl.	3 mtl.	6 mtl.	3 mtl.	6 mtl.	-	3 mtl.	6 mtl.	-	6 mtl.	-	-

Tabelle 4: Nachsorgeschema für Melanompatienten (Pflugfelder *et al.*, 2013)

Die Grunduntersuchung beinhaltet eine gezielte Anamnese, die Inspektion des gesamten Integuments, der angrenzenden Schleimhäute, Palpation der Primärnarbe sowie der Lymphabstromgebiete und der Lymphknotenstationen.

Anschließend an die 10-jährige Tumornachsorge wird eine jährliche Suche nach Zweitmelanomen empfohlen. Außerdem sind die Patienten durch Schulungen an die regelmäßige Selbstuntersuchung heranzuführen (Pflugfelder *et al.*, 2013).

Im Gegensatz zu der sehr guten Datenlage beim kutanen malignen Melanom gründet sich die Behandlung des Schleimhautmelanoms vor allem auf empirische Daten. Insgesamt ist es jedoch schwierig, einheitliche Empfehlungen zur Behandlung des Schleimhautmelanoms zu geben, da die Studienlage auf Grund der Seltenheit der Erkrankung uneinheitlich ist und sich über große Zeiträume mit unterschiedlichen technischen und therapeutischen Möglichkeiten erstreckt (Manolidis & Donald, 1997). Auch beim Schleimhautmelanom stellt die primäre Resektion die vielversprechendste Therapieoption dar. Allerdings ist sie auf Grund der häufigen Multifokalität der Erkrankung sowie der anatomischen Gegebenheiten im Kopf-Hals-Bereich, v.a. bei einem Primarius in den Nasennebenhöhlen, oft nicht vollständig bzw. mit

ausreichenden Sicherheitsrändern möglich. So kommt es auch trotz aggressiver Resektion zu Lokalrezidivraten von 50-90 % (Lee *et al.*, 1994).

In einigen Studien gibt es Hinweise auf eine Verbesserung der lokoregionären Kontrolle durch adjuvante Radiotherapie (Moreno *et al.*, 2010, Krenkli *et al.*, 2006). Bisher gibt es aber keine Richtlinien in Bezug auf Indikationsstellung, Strahlendosis oder Fraktionierung der Radiotherapie. Das Ansprechen scheint bei Einzeldosen über 4 Gy besser zu sein (Bentzen *et al.*, 1989).

Bis jetzt konnte keine systemische Therapie etabliert werden, die das Outcome v.a. bei fortgeschrittenen Schleimhautmelanomen verbessert. Der bei kutanen Melanomen mit großem Erfolg eingesetzte BRAF-Inhibitor Vemurafenib kann bei Mutationsraten von unter 10 % im Schleimhautmelanom kaum zum Einsatz kommen (Curtin *et al.*, 2006). Allerdings konnten Carvajal *et al.* KIT-Mutationen in rund 25 % der Schleimhautmelanome nachweisen (Carvajal *et al.*, 2011), was Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib als mögliche Therapieoptionen aufzeigt (Guo *et al.*, 2011).

1.6 Das Chemotherapeutikum Cisplatin

Bei Cisplatin handelt es sich um einen planen, anorganischen Schwermetallkomplex, der aus einem zentralen Platinatom mit je 2 Amin- und 2 Chlorliganden besteht. Es wird nach dem Übertritt vom chloridreichen Blutserum in das chloridarme Milieu des Zellplasmas durch Hydrolyse der Chloridliganden zu geladenen Platin-Wasserkomplexen. Diese greifen bevorzugt an der N-7-Position von Guanin und Adenin an und führen so zu DNA-Intra- und -Interstrangvernetzungen. Dadurch ist die Replikationsfähigkeit der Zelle nicht mehr gegeben und es wird über verschiedene Signalwege, vor allem dem p53-Signalweg, die Apoptose eingeleitet (Siddik, 2003). In der Behandlung von Melanomen kommt diesem Chemotherapeutikum nur eine sehr untergeordnete Rolle zu, da hier ausgeprägte Chemoresistenzen ein Ansprechen verhindern (Lee *et al.*, 1995). Trotzdem hat Cisplatin in der vorliegenden Arbeit seinen Stellenwert als hochpotenter p53-Induktor, der die Untersuchung des p53-Signalwegs ermöglicht.

1.7 Molekularpathologie und Betrachtung des p53 Signalwegs beim malignen Melanom

Es gibt verschiedene Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorsignalwegen bei der Transformation von Melanozyten zu Melanomzellen.

Das in etwa der Hälfte der kutanen Melanome mutierte murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF) gehört zur Familie der RAF-Proteine (Curtin *et al.*, 2006). Sie werden physiologischerweise von Mitgliedern der RAS-Familie aktiviert und führen ihrerseits zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1) und Mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MAP2K2). Über den weiteren Signalweg via extracellular-signal-regulated kinase 1 und 2 (ERK1/2) und andere wird die Proliferation der Zelle vorangetrieben (Chang & Karin, 2001). Liegt eine aktivierende Mutation des Protoonkogens BRAF vor, wird die Zellzyklusprogression ohne exogene physiologische Stimuli angetrieben, was eine wesentliche Pathologie des Tumors darstellt.

Für die Pathologie des Schleimhautmelanoms scheint auch die Regulation durch C-Kit (CD117, v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) bei Mutationsraten um 25 % eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen (Carvajal *et al.*, 2011). Das Protoonkogen C-Kit gehört zur Familie der Rezeptorthyrosinkinasen (McIntyre *et al.*, 2005). Bei Stimulation durch Bindung von SCF (stem cell factor, KIT-Ligand) aktiviert C-Kit verschiedene Signalwege, unter anderem PI3KR1 (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1), AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1), RAS/RAF/MAPK (rat sarcoma viral oncogene homolog/ V-Raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1), und führt so zu Zellüberleben, Proliferation und Differenzierung (Liang *et al.*, 2002, Jahn *et al.*, 2002, Minamiguchi *et al.*, 2001).

Zwei weitere miteinander verknüpfte Signalwege, sind die von Retinoblastom (RB) und p53. Das von Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin dependent kinase, CDK) phosphorylierte RB ermöglicht die Freisetzung von E2F (E2F transkription factor) aus dem RB-E2F-Komplex und somit die Progression der Zelle in die S-Phase (Li *et al.*, 2006). Die Phosphorylierung von RB ist unter anderem von Cyclin D und den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 abhängig (Hinds *et al.*, 1992). Durch die Bindung von cyclin dependent kinase inhibitor 2A (p16, CDKN2A) an CDK 4/6 wird dieser Komplex inhibiert und so ein Voranschreiten des Zellzykluses verhindert (Li *et al.*,

2006). Weitere Vertreter mit ähnlicher Wirkung der CDKN2A-Familie sind p14, p15, p18 und p19 (Kamb, 1995). In Melanomfamilien können oft Keimbahnmutationen vom *CDKN2A*, welches p16 kodiert, nachgewiesen werden (Bataille, 2000). Auch bei sporadischen Melanomen kann zum Teil der Verlust des Tumorsuppressors p16 gezeigt werden (Bataille, 2003). Karim *et al.* konnten außerdem nachweisen, dass bei der Transformation eines benignen Nävus zum invasiven und schlussendlich zum metastasierten Melanom ein progressiver Verlust von p16 stattfindet (Sanki *et al.*, 2007).

Ein weiterer Tumorsuppressor ist p53. In ca. 50 % aller solider Tumoren liegt ein Funktionsverlust von p53 vor (Hollstein *et al.*, 1991). Dabei schwanken die Mutationsraten von p53 stark von 70 % in Lungenkarzinomen über 30 % in Brustkrebs bis unter 1% in primären Melanomen (Beroud & Soussi, 1998, Hartmann *et al.*, 1996). Allerdings kann es auch bei vorhandenem Wildtyp-p53 durch Mutationen in anderen Genen des Signalwegs zu einem funktionellen Verlust von p53 kommen. Dies scheint in Melanomen der Fall zu sein, da erhöhte p53-Wildtyp-Konzentrationen in diesem stark proliferierenden Tumortyp nachgewiesen werden konnten (Lassam *et al.*, 1993, McGregor *et al.*, 1993, Zerp *et al.*, 1999). Als nukleärer Transkriptionsfaktor ist p53 bei der Transkription von apoptoseassoziierten und zellzyklusregulierenden Genen involviert. Es handelt sich um ein Protein aus 393 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von rund 53 kDa (Pavletich *et al.*, 1993). Der zugrundeliegende Genort (*TP53*) befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p131) (Maltzman & Czyzyk, 1984). Bisher konnten zwei p53-Homologa, p63 und p73, mit vergleichbarer Aktivierung und Funktion gefunden werden (Stiewe & Putzer, 2001). Intaktes Wildtyp-p53 hat eine Halbwertszeit von etwa 30 Minuten und liegt unter physiologischen Bedingungen in niedrigen Konzentrationen vor, sodass ein immunhistochemischer Nachweis erst nach Akkumulation von p53 bei DNA-Schäden möglich wird (Maltzman & Czyzyk, 1984). DNA-Schäden können durch UV-Strahlung, ionisierende Strahlung oder DNA-schädigende Substanzen (z.B. Platinanaloga) verursacht werden (Nelson & Kastan, 1994). Bei Vorhandensein von DNA-Schäden wird unter anderem HIPK2 (homeodomain interacting protein kinase 2) stabilisiert. HIPK2 wiederum phosphoryliert p53 und führt damit zu dessen Stabilisierung (Hofmann *et al.*, 2002). Aber auch suboptimale Lebensbedingungen wie Hypoxie, Hitze, oxidativer Stress und Unterversorgung mit Nährstoffen können p53 induzieren (Graeber *et al.*, 1994,

Hainaut & Milner, 1993, Linke *et al.*, 1996). Ein weiterer p53-Induktor neben DNA-Schäden ist p14, das demselben Genort wie p16 entstammt (*CDKN2A*) (Quelle *et al.*, 1995). Es inhibiert durch Interaktion mit MDM2 (E3 ubiquitin protein ligase) den MDM2-vermittelten Abbau von p53 via Ubiquitinierung des MDM2-p53-Komplexes (Pomerantz *et al.*, 1998, Zhang & Xiong, 1999, Honda & Yasuda, 1999). Die Wirkung als Tumorsuppressor ist bei p53 auf zwei wesentliche Mechanismen zurückzuführen, Zellzyklusarrest und Einleiten von Apoptose. Über die Induktion von p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, *CDKN1A*) kann p53 einen Arrest der Zelle in der G1-Phase veranlassen (el-Deiry *et al.*, 1993). p21 ist ein potenter Inhibitor der Cyklin-abhängigen Kinasen (v.a. CDK 2, 3, 4, 6) (el-Deiry *et al.*, 1994, Dulic *et al.*, 1994). Diese Kinasen spielen unter anderem eine Rolle bei der Phosphorylierung von RB und somit der Freisetzung von E2F, respektive der Zellzyklusprogression (Slebos *et al.*, 1994). Das Anhalten des Zellzyklusses ermöglicht die Wiederherstellung des integren Genoms durch DNA-Reparaturgene wie das p53-abhängige *GADD45A* (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha) (Fornace *et al.*, 1992). Ist die DNA zu schwer geschädigt bzw. sind noch andere apoptoseinduzierende Signale wie z.B. bestimmte posttranslationale Modifikationen vorhanden, steigt die p53-Konzentration weiter an und induziert Apoptose. Über direkte Induktion von BAX (BCL2-associated X protein) werden Poren in der Mitochondrienwand gebildet, was zur Freisetzung von Cytochrom C ins Zytoplasma führt (Bergmann, 2002). Dies wiederum vermittelt die Bildung des Apoptosoms aus APAF1 (apoptotic peptidase activating factor 1) und Caspase 9 (CASP9) und damit die Aktivierung der Caspase-Kaskade (Riedl & Shi, 2004). Durch BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) und Mitglieder der BCLXL-Familie wie BCL2A1 (BCL2-related protein A1) kann die Cytochrom-C-Freisetzung und damit die Apoptose inhibiert werden (Burlacu, 2003). BCL2 seinerseits kann allerdings von PUMA (BBC3, BCL2 binding component 3), einem weiteren direkt von p53 induziertem Protein, gebunden und somit inaktiviert werden (Yu & Zhang, 2008). Synergistisch dazu wirkt CDK1 (cyclin-dependent kinase 1, CDC2, cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M), das BCL2A1 phosphoryliert und so dessen antiapoptotische Aktivität unterbindet (Pathan *et al.*, 2001).

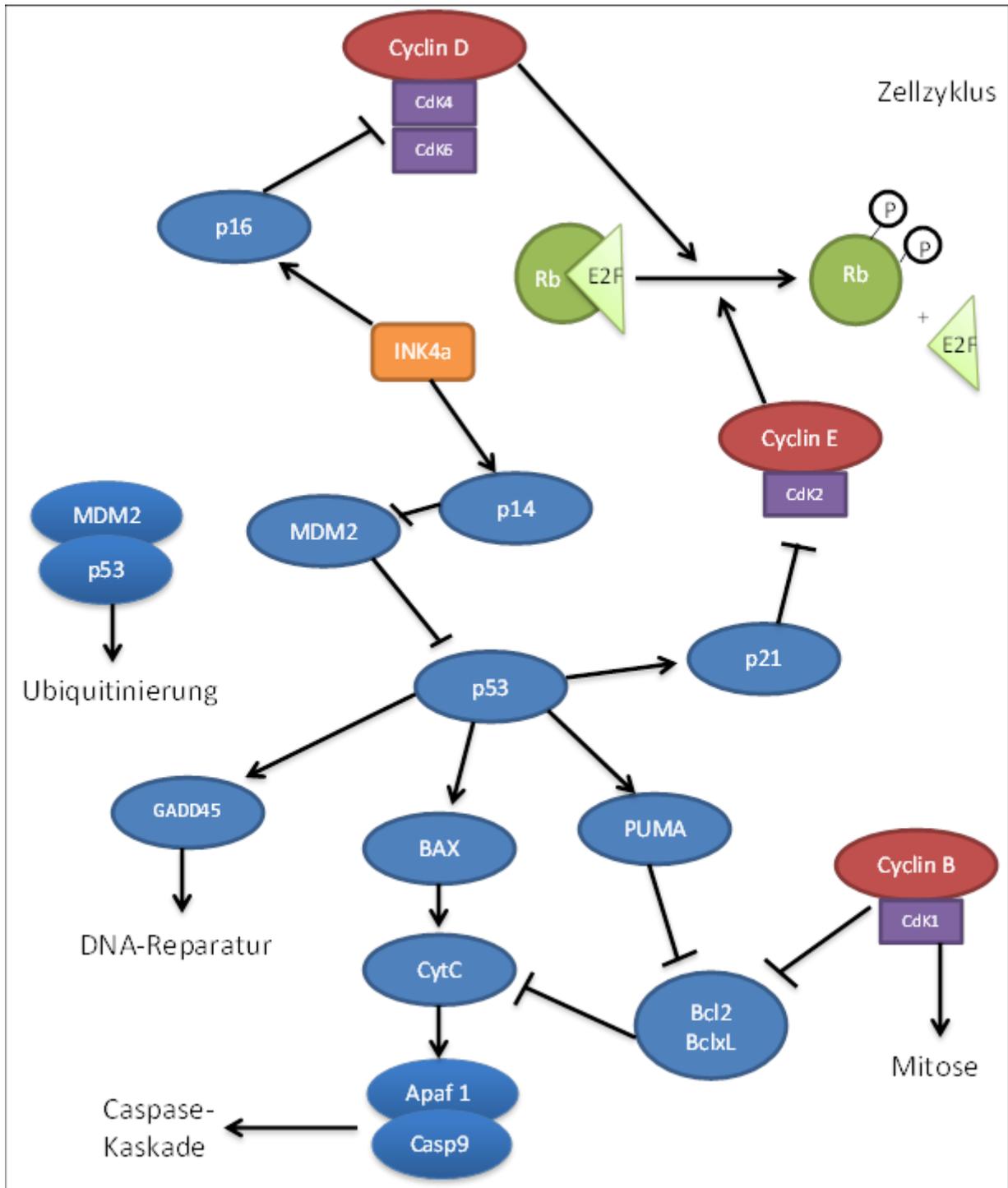


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus, Zusammenfassung des Kapitels 1.6

1.8 Publikationen

Aus den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe ging die Publikation „Cisplatin fails to induce puma mediated apoptosis in mucosal melanomas“ (Fritsche *et al.*, 2015) hervor. Sie ist im Anhang zu finden.

2 Fragestellung

Das Schleimhautmelanom ist klinisch gesehen eine äußerst aggressive Tumorerkrankung. Auf Grund seiner Seltenheit gibt es keine hinreichend etablierten Behandlungskonzepte. Im Vergleich zum kutanen malignen Melanom fällt die schlechtere Prognose auf. Diese Arbeit soll das unterschiedliche Verhalten der beiden Melanom-Entitäten auf genetischer und molekularbiologischer Ebene weiter aufklären:

I. Welche Expressionsunterschiede von Genen des p53-Signalwegs liegen in fixiertem Patientenmaterial von Schleimhaut- und kutanen Melanomen auf mRNA (messenger ribonucleic acid)-Ebene vor?

Um das klinisch aggressivere Verhalten der Schleimhautmelanome aufzuklären, wurden verschiedene Gene des p53-Signalwegs mittels real-time-PCR auf ihre relative mRNA-Expression untersucht. Es wurde dazu ein Kollektiv von 22 Schleimhautmelanomen (MuM) mit 16 kutanen Melanomen (MM) verglichen.

II. Gibt es immunhistochemische Hinweise auf ein unterschiedliches Verhalten von Schleimhaut- und kutanen Melanomen der Patientenkollektive bezüglich des p53-Signalwegs?

Um das Ergebnis von I. gedanklich weiterzuführen wurden von den gleichen Proben Schnitte angefertigt und immunhistochemisch bearbeitet, um zu überprüfen, ob sich das Ergebnis auf mRNA-Ebene auch in der Protein-Expression nachweisen lässt.

III. Wie verhalten sich Schleimhaut-, kutane Melanom-Zellen und Melanozyten bei Behandlung mit Cisplatin?

Mit Hilfe von zwei Schleimhautmelanomprimärkulturen konnten auch funktionelle Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt werden. Dazu erfolgte eine Stimulation mit Cisplatin, einem starken Induktor von p53, um Rückschlüsse auf die Regulation des p53-Signalwegs ziehen zu können. Das Verhalten der Zellen wurde auf mRNA-Ebene mittels real-time-PCR und auf Protein-Ebene mittels Western Blot abgebildet.

IV. Welche Aussagen bezüglich des C-Kit Mutationsstatus lassen sich für das vorliegende Patientenmaterial treffen?

Dazu wurden aus den Patientenproben sowie aus den eingebetteten Zelllinien DNA gewonnen und diese mittels DNA-Sequenzierung auf C-Kit-Mutationen in den Exons 9, 11, 13 und 17 untersucht.

3 Material

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research-Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5430R → Rotor für Eppendorfgefäße bis 2 ml: FA - 45 - 30 - 11 → Rotor für Reaktionsgefäße bis 50 ml: F - 35 - 6 - 30	Eppendorf AG, Hamburg
MS2 Minishaker	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Pipettus-akku Accu-jet Pro	Brand, Wertheim
Schüttler/ Mischer Vibrax VXR	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-PROTEAN 3 Cell (Gelkammern)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Power Pac 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Scaltec Rezeptureinwaage SBC21	Scaltec, Göttingen
Entwicklermaschine für die Röntgenfilme: SRX-101A	Konica Minolta GmbH, Unterföhring
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Mikroskop Leica DMI 6000B	Leica Microsystems
Cleanbench: Hera safe KS	Thermo Scientific, Langenselbold
CO2-Inkubator Hera Cell 150i	Thermo Scientific, Langenselbold
Absaugpumpe Vacuubrand LE2	Vacuubrand, Wertheim
Liebherr Gefrierschrank no frost premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Liebherr Kühlschranks comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
ELISA Reader Multiscan FC	Thermo Scientific, Langenselbold

Gilson Pipetman	Gilson, Middletown USA
Peqette	PeqLab, Erlangen
Leica DFC 425C	Leica Microsystem, Wetzlar
pH-Meter 766, Calimatic	Knick, Berlin
Taumel-Rollenmischer	A. Hartenstein, Würzburg
DNA Engine	Biorad, München
C1000 Thermo Cycler	Biorad, München
CFX96 Real time System	Biorad, München
NanoDrop 1000	PeqLab, Erlangen
Laborabzug	Köttermann, Uetze
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Canon Scanner Multiscan	Canon, Krefeld

Tabelle 5: Verwendete Geräte

3.2 Software

Programm	Hersteller
Leica Application Suite LAS V3.7	Leica Microsystems
Windows Office 2007	Microsoft
SnapGene	GSL Biotech LLC

Tabelle 6: Verwendete Software

3.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pipetten-Spitzen 1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
15 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
50 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Biosphere Micro Tubes 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Dish 100x20 mm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Röntgenfilme Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Whatmann Gel Blotting Papier	Carl Roth AG, Karlsruhe
ImmobilonP Transfer Membranes Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore GmbH, Schwalbach

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.4 Chemikalien, Reagenzien, Zellkultur

Chemikalien	Hersteller
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tween 20 %	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Chlorwasserstoff (HCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Dithiotreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ϵ -Amino-n-caproic Acid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Non-fat skimmed milk powder	Biomol GmbH, Hamburg
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein Assay, Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Proteinmarker: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas Inc., Glen Burnie
Crystal violet	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
5x First strand buffer	Invitrogen, Darmstadt
0,1M DTT	Invitrogen, Darmstadt
Hexanukleotid mix 10x conc.	Roche, Mannheim
DNTP Polymerisation Mix	Roche, Mannheim
MMLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt
Master Mix für RT-PCR	SA Bioscience, Frederick, USA
Master Mix für RT-PCR	Peqlab, Erlangen
RNA Carrier	Qiagen, Hilden

Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Xylol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natronlauge	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Citratmonohydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Goat Serum	DAKO, Hamburg
Antibody Diluent S2022	DAKO, Hamburg
Eukitt	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Zellkultur-Reagenzien	Hersteller und Firmensitz
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
L-Glutamin 200mM	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10 000 Einheiten/ml Penicillin und 10 000 µg/ml Streptomycin)	Biochrom AG, Berlin
Accutase	PAA Laboratories, Pasching, Austria
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Melanocyte Growth Medium	Promo cell, Heidelberg
SupplementMix Melanocyte Growth medium	Promocell, Heidelberg
PBS	PAA Laboratories, Pasching, Austria

Tabelle 9: Verwendete Zellkultur-Reagenzien

3.5 Antikörper, Inhibitoren, Primer

Antikörper	Hersteller	Verdünnung Immunhistochemie
p53 (DO7)	DAKO, Hamburg	1:200
MDM2	US Biological, Biomol Hamburg	1:250
HIPK2	US Biological, Biomol Hamburg	1:600
p21	US Biological, Biomol	1:250

	Hamburg	
GADD45A	US Biological, Biomol, Hamburg	1:100
PUMA	Epitomics, Burlingame USA	1:400
proCaspase9	Biomol, Hamburg	1:100
BAX	Biomol, Hamburg	1:250
BCL2	Biomol, Hamburg	1:100
BCL2A1	Biomol, Hamburg	1:100
CDK1	Epitomics, Burlingame USA	1:100
C-Kit	DAKO, Hamburg	1:50

Tabelle 10: Für Immunhistochemie verwendete Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung Western blot
p53 (DO7)	DAKO, Hamburg	1:2500
MDM2	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	1:1000
p21 12D1	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:1000
GADD45A	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:1000
PUMA	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:2000
BAX D2E11	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:2000
BCL2 S-OE3	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:1000
CDK1	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:1000

Tabelle 11: Für Western blot verwendete Primärantikörper

Inhibitor	Hersteller	verwendete Konzentrationen
Cisplatin	Hexal AG, Holzkirchen	8 µM

Tabelle 12: Verwendete Inhibitoren

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung Western blot
Anti-Rabbit-HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:5000
Anti-Mouse-HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:10000

Tabelle 13: Für Western blot verwendete Sekundärantikörper

Primer (QuantiTect Primer Assay Kit for SYBR Green based real-time RT-PCR)	Hersteller
<i>TP53</i> Cat. No. QT00060235	Qiagen, Hilden
<i>MDM2</i> Cat. No. QT00056378	Qiagen, Hilden
<i>HIPK2</i> Cat. No. QT01184694	Qiagen, Hilden
<i>CDKN1A</i> Cat. No. QT00062090	Qiagen, Hilden
<i>GADD45 A</i> Cat. No. QT00014084	Qiagen, Hilden
<i>PUMA</i> Cat. No. QT00082859	Qiagen, Hilden
<i>BAX</i> Cat. No. QT00031192	Qiagen, Hilden
<i>Pro-CASP 9</i> Cat. No. QT00036267	Qiagen, Hilden
<i>BCL2A1</i> Cat. No. QT00044646	Qiagen, Hilden
<i>CDC2</i> Cat. No. QT00042672	Qiagen, Hilden
<i>GAPDH</i> Cat. No. QT01192646	Qiagen, Hilden

Tabelle 14: Verwendete Real-time-PCR-Primer

C-KIT-Primer (Eurofins MWG Operon)	Hersteller
C-KIT Exon 9 forward 5'- ATG CTC TGC TTC TGT ACT GCC -3'	Eurofins MWG Operon
C-KIT Exon 9 reverse 5'- AGA GCC TAA ACA TCC CCT TA -3'	Qiagen, Hilden
C-KIT Exon 11 forward	Qiagen, Hilden

5'- CCA GAG TGC TCT AAT GAC TG -3'	
C-KIT Exon 11 reverse 5'- ACC CAA AAA GGT GAC ATG GA -3'	Qiagen, Hilden
C-KIT Exon 13 forward 5'- CAT CAG TTT GCC AGT TGT GC -3'	Qiagen, Hilden
C-KIT Exon 13 reverse 5'- ACA CGG CTT TAC CTC CAA TG -3'	Qiagen, Hilden
C-KIT Exon 17 forward 5'- TGT ATT CAC AGA GAC TTG GC -3'	Qiagen, Hilden
C-KIT Exon 17 reverse 5'- GGA TTT ACA TTA TGA AAG TCA CAG G -3'	Qiagen, Hilden

Tabelle 15: Verwendete C-KIT-Primer

3.6 Assays, Kits, Sonstiges

Kit	Hersteller und Firmensitz
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
High Pure FFPE RNA Micro Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
DNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Avidin-Biotin-Kit	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
RT2 FFPE PreAMP C07	SA Bioscience, Frederick, USA
Dako REAL™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	DAKO, Hamburg
Taq "all inclusive"	Peqlab, Erlangen

Tabelle 16: Verwendete Assays, Kits, sonstige Reagenzien

4 Methoden

4.1 FFPE(formalin-fixed-paraffin-embedded)-Material

Das Kollektiv bestand aus Proben von 16 Patienten mit kutanen Melanomen des Kopf-Hals-Bereichs und 24 Schleimhautmelanompatienten. Die Proben wurden nach der Operation durch das Einlegen in Formalinlösung fixiert, anschließend entwässert und in Paraffinblöcken eingebettet. Die so gefertigten Blöcke wurden jeweils von den entsprechenden pathologischen Instituten zur Verfügung gestellt. Die Beurteilung erfolgte durch zwei erfahrene Pathologen.

4.1.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus FFPE-Material wurde das *High Pure FFPE RNA Micro Kit* von Roche verwendet. Das FFPE-Material wurde mit dem Microtom in mehrere 10 µm dicke Schnitte geschnitten, von denen ca. ein Quadratzentimeter Tumormasse gesammelt und in je ein Eppendorfgefäß gegeben wurde. Für jeden Patienten wurden drei Eppendorfgefäße FFPE-Material gefüllt.

Anschließend fand die Entparaffinierung der Proben statt. Dazu wurde das Material zuerst mit 800 µl Xylol und anschließend mit 400 µl 100 %-igem Ethanol gevortext. Durch 4-minütiges Zentrifugieren bei 13 000 rpm wurde das Xylolgemisch vom Gewebe getrennt und verworfen. Die Proben wurden erneut in 1 000 µl 100 %-igem Ethanol aufgenommen, gevortext und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben bei 55 °C im Thermomixer getrocknet.

Die getrockneten Proben wurden mit 100 µl *tissue lysis buffer*, 16 µl 10 %-igem SDS und 40 µl Proteinase K gemischt, um die Zellen zu zerstören und somit die Nukleinsäuren freizulegen, und über Nacht bei 55 °C und 450 rpm im Thermomixer inkubiert. Waren Gewebereste sichtbar, wurde ein Nachverdau der Probe mit 10 µl Proteinase K ebenfalls bei 55 °C und 450 rpm für eine Stunde durchgeführt.

Anschließend wurden je 325 µl *binding buffer* und 100 %-iges Ethanol eingemischt und das Lysat auf die *high pure micro spin filter tubes* gegeben. Die im *binding buffer* enthaltenen caotropen Salze führten zu einer Bindung der Nukleinsäuren an die Membran in den Säulen. Danach wurden die Reaktionsgefäße bei zuerst 8 000 rpm und dann 13 000 rpm je 30 sec zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Zum

Reinigen der Nukleinsäuren von Zellresten wurden zuerst 500 µl *wash buffer I*, dann 500 µl und zuletzt 300 µl *wash buffer II* auf die Säulen gegeben, dazwischen je bei 8 000 rpm 15 sec zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nach dem Waschen wurden die Säulen bei 13 000 rpm 2 min erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden die Filter erst 2 min mit 90 µl *elution buffer* inkubiert und dann 1 min bei 8 000 rpm zentrifugiert. Dabei lösten sich durch den salzarmen *elution buffer* die Nukleinsäuren von den Filtersäulen, die anschließend verworfen wurden.

Für den DNA-Verdau wurde das Eluat mit 1 µl DNase und 10 µl 10x *DNase incubation buffer* 45 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin fand eine zweite Lyse mit 20 µl *tissue lysis buffer*, 18 µl 10 %-igem SDS und 40 µl Proteinase K für 60 min bei 55 °C im Thermomixer statt.

Nach Zugabe von je 325 µl *binding buffer* und 100 %-igem Ethanol folgten die Zentrifugations- und Waschschrirte wie oben beschrieben.

Die trocken zentrifugierten Filter wurden mit 100 µl *elution buffer* für 2 min inkubiert, 1 min bei 8 000 rpm zentrifugiert und anschließend verworfen.

Zum Aufreinigen der RNA wurden die Eluate mit 250 µl 100 %-igem Ethanol, 10 µl 3-molarem Natriumacetat und 1,5 µl *RNA Carrier* vermischt und 60 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden bei 4 °C und 13 000 rpm 10 min RNA-Pellets abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipetiert und verworfen. Die Pellets wurden in 1000 µl 70 %-igem Ethanol gelöst, nochmals abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Abschließend wurden die RNA-Pellets in 20 µl H₂O aufgenommen, wobei je die drei Proben eines Patienten gepoolt wurden, um eine höhere RNA-Konzentration zu erreichen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte im NanoDrop.

Die RNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

4.1.2 DNA-Isolation

Zur Gewinnung von DNA aus FFPE-Material wurden pro Probe drei 20 µm dicke Schnitten aus den FFPE-Blöcken angefertigt. Diese wurden mit Xylol versetzt und 15 sec gevortext. Nach der Zugabe von 250 µl 70 %-igem Ethanol wurde die Probe erneut 15 sec gevortext und dann 5 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde die Probe im Thermomixer bei 45 °C getrocknet. Die trockene Probe wurde mit 200 µl PK-Puffer aus dem DNeasy-Kit mit

25 % Tween 20 resuspendiert und mittels einer Pipettenspitze mechanisch zerkleinert. Es folgte eine Inkubation mit 50 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C. Nach der Enzymaktivierung durch 10-minütiges Erhitzen auf 95 °C wurde die DNA-Lösung mit H₂O 1:200 verdünnt und bei 4 °C gelagert.

4.1.3 Immunhistochemie

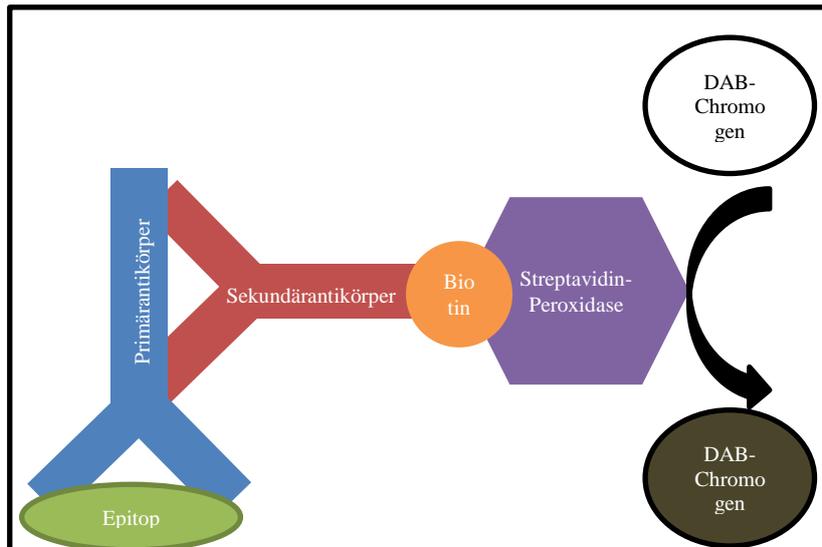


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Färbereaktion

Die Immunhistochemie ermöglicht die Identifikation und Lokalisation bestimmter Proteine durch Bindung spezifischer Antikörper und deren Detektion durch ein geeignetes Chromogen. Der Primärantikörper bindet an das entsprechende Epitop im Gewebe.

Dessen F_c-Anteil wird durch den biotinkoppelten Sekundärantikörper erkannt und gebunden. Die Streptavidin-Peroxidase bindet dann an das Biotin. Die Peroxidase setzt das zugegebene DAB-Chromogen um und führt so zu einer Braunfärbung.

Für die Immunhistochemie wurden mit dem Mikrotom 1,5 µm dicke Schnitte der FFPE-Blöcke angefertigt und über Nacht bei 60 °C im Wärmeschrank getrocknet. Da eine Antikörperbindung nur im wässrigen Milieu stattfinden kann, musste eine Entparaffinierung der Schnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe (3 x 10 min Xylol, 2 x 5 min Isopropanol, 5 min 100 % Ethanol, 5 min 70 % Ethanol, 5 min Tris-Puffer) durchgeführt werden.

Tris-Puffer (10x):

- 90 g NaCl
- 41,5 g Tris
- 600 ml Aqua dest.
- pH 7,6 mit konzentrierter Salzsäure einstellen
- mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

Danach wurden die Epitope im Gewebe durch 7-minütiges Kochen in 2l Citrat-Puffer demaskiert.

Citrat-Puffer:

- 2,1 g Citrat-Monohydrat
- 600 ml Aqua dest.
- pH 6 mit 4 M Natronlauge einstellen
- mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

Nach 5 min Waschen in Tris-Puffer fand ein 15-minütiger Peroxidase-Quench mit 3 %-igem Wasserstoffperoxid statt. Es folgten 3 x 5 min Waschen in Tris-Puffer. Um weitere endogene Bindungsstellen zu blocken, fand zuerst ein 15-minütiger Avidin-, und nach 5 min Waschen in Tris-Puffer, ein ebenfalls 15-minütiger Biotin-Block statt. Unspezifische Epitope wurden mit 5 %-igem Ziegen Serum in Tris-Puffer 30 min geblockt. Danach wurden die Schnitte über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Die entsprechenden Antikörperverdünnungen mit *Antibody-diluent* sind der obenstehenden Tabelle zu entnehmen.

Nach 3 x 5-minütigem Waschen wurden die Schnitte in Tris-Puffer für 15 min mit dem *secondary antibody* (Lösung A) aus dem *Dako REAL™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse* inkubiert und nochmals 3 x 5 min in Tris-Puffer gewaschen. Es folgte eine 15-minütige Inkubation mit der Streptavidin-Peroxidase (Lösung B) gefolgt von erneutem Waschen (3 x 5 min in Tris-Puffer). Die Chromogenlösung wurde aus 5 % DAB+ Chromogen (Lösung C) in HRP Substrate Buffer (Lösung D) hergestellt und die Schnitte 3 min damit inkubiert. Überschüssige Chromogen wurde durch 5 min Waschen mit Tris-Puffer entfernt. Es erfolgte eine 4-minütige Gegenfärbung mit Hämalaun und anschließender Differenzierung unter fließendem Wasser. Um den Schnitten das Wasser wieder zu entziehen und sie haltbar zu machen folgte die aufsteigende Alkoholreihe (s.o.) für je 2 min. Anschließend wurden sie mit Eukitt eingedeckelt und über Nacht im Wärmeschrank bei 60 °C getrocknet.

Die einzelnen Schnitte wurden zuerst nach Auswertbarkeit überprüft. War eine angemessene Beurteilbarkeit gegeben, wurde der Anteil gefärbter Zellen (in vier Kategorien: >71 %, 31-70 %, 11-30 %, und <10 % bzw. negativ) und bei >10 % positiver Zellen auch die Lokalisation der Färbung (in drei Kategorien: Kern, Plasma, Kern und Plasma) ausgewertet.

4.2 Zellkultur

Folgende Zelllinien bzw. Primärkulturen wurden untersucht:

Zelllinie	Zelltyp	p53-Status	DSMZ-Nummer
MEL-JUSO	kutanes Melanom	Wildtyp	ACC 74
IGR-37	kutanes Melanom	<i>knock-out</i> -Mutante	ACC 237
COLO-849	kutanes Melanom	Wildtyp	ACC 216
SK-MEL-30	kutanes Melanom	Wildtyp	ACC151
SK-MEL-3	kutanes Melanom	Punktmutation	ACC 321
NHEM-c M2	Melanozyten	Wildtyp	C-10402
TU-MM 1	Schleimhautmelanom	nicht bekannt	Primärkultur
TU-MM 2	Schleimhautmelanom	nicht bekannt	Primärkultur

Tabelle 17: Verwendete Zelllinien bzw. Primärkulturen

Alle Zelllinien wurden im CO₂-Inkubator Hera Cell 150i bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Bis auf die Melanozyten, die mit Melanocyte Growth Medium M2, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung und dem zugehörigen Supplement-Kit von PromoCell versorgt wurden, erfolgte die Kultivierung der übrigen Zellen mit DMEM von GIBCO, das mit 10 % FBS und je 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung und L-Glutamin versehen wurde. Ein Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Bei etwa 80 % Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde die Schale nach Absaugen des Mediums mit PBS gespült und danach mit 2 ml Accutase im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen lösten. Sie wurden in 4 ml Medium aufgenommen, mechanisch durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren voneinander gelöst und schließlich 0,5 ml bis 2 ml der Zellsuspension in eine frische Schale mit 7 ml Medium gegeben.

Für den Stimulationsversuch wurde je eine Schale als Kontrolle und eine Schale mit 8 µM Cisplatin im Medium angelegt. Nach 24 h erfolgten jeweils die RNA- und Proteinisolierung.

4.2.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus Zellen wurde das RNeasy-Kit nach Herstellerangabe verwendet. Die Zellen wurden vorbereitet, indem das Medium abgesaugt und sie mit ca. 7 ml PBS gespült wurden. Es folgte eine 10-minütige Inkubation mit 500 µl Lyse-Puffer, der zuvor mit 1 % β -Mercaptoethanol versetzt wurde. Nach dem Auftauen folgte die Einmischung von 500 µl 70 %-igen Ethanols. Anschließend wurde das Gemisch auf eine *spin column* gegeben und 15 sec bei 12 000 rpm zentrifugiert. Es folgten, jeweils nach dem Verwerfen der Flüssigkeit, drei Waschschrte, zuerst mit 700 µl *RW1* Puffer und zweimal mit je 500 µl *RPE* Puffer. Zwischendurch wurden die Säulen je eine Minute bei 12 000 rpm zentrifugiert. Die Eluierung der RNA von der Säule erfolgte durch eine einminütige Inkubation mit H₂O und einminütiges Zentrifugieren bei 12 000 rpm.

Entsprechend der RNA-Isolation aus FFPE-Material erfolgte die Konzentrationsbestimmung im NanoDrop und die Lagerung bei -20 °C.

4.2.2 Proteinisolation

Zur Gewinnung von Proteinlysate aus dem Zellkulturmaterial wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit je 7 ml kaltem (ca. 4 °C) PBS-Puffer gespült. Pro 10 cm Zellkulturschale wurden 500 µl 1x *Cell lysis buffer* zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt. Nach dem Überführen in ein Reaktionsgefäß wurden die Zellen durch Zentrifugieren (5 min, 4 °C, 7830 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde etwa in seinem fünffachen Volumen in *Cell lysis buffer* aufgenommen, resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinlysate wurden bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford Assay. Dafür fand zuerst eine 1:10-Verdünnung der Proben mit PBS statt. Davon wurden jeweils 20 µl mit 180 µl PBS und 200 µl 0,01 % Triton X-100 zum vermisch. Für die Kalibrierung wurden Standardlösungen aus 0,2 mg/ml Bovine Serum Albumin und 0,01 % Triton X-100 hergestellt. Nach Verdünnung des Bradford-Reagenzes 1:4 mit PBS wurden davon je 600 µl zu den Probe- und Standardlösungen gegeben. Vor der Messung der Extinktion bei 595 nm im Photometer wurden die Lösungen in eine 96-well-Platte

umpipettiert, durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die als Ergebnis erhaltenen Werte für die optische Dichte der jeweiligen Proben wurden in Excel exportiert, wo basierend auf den Daten der Standardlösungen eine Kalibrationskurve erstellt werden konnte. Anhand dieser war die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Probelösungen möglich.

4.3 Weiterführende Untersuchungen

4.3.1 cDNA-Synthese

Protokoll A:

Für die cDNA-Synthese wurde das RT² FFPE PreAMP cDNA Synthesis Kit (C-07) von SABiosciences verwendet. Zuerst wurde der RNA-Mix hergestellt. Dafür musste anfangs das Volumen für 1 µg RNA berechnet werden. Dieses Volumen wurde dann mit RNase-freiem Wasser auf 8 µl aufgefüllt und 2 µl 5x gDNA Elimination Buffer (GE) zugegeben, um etwaige DNA-Kontaminationen zu eliminieren. Der RNA-Mix wurde 15 min bei 37 °C und dann 1 min auf Eis inkubiert und schließlich mit 10 µl RT-Mix aus 4 µl 5x Reverse Transcription Buffer 3 (BC3), 3 µl RNase-freiem Wasser und je 1 µl Primer and External Control Mix (P2), cDNA Synthesis Enzyme Mix (RE) und RNase Inhibitor (RI) vermischt. Die cDNA-Synthese erfolgte dann 30 min lang bei 37 °C. Dabei konnten die dNTPs an die RNA binden und durch die reverse Transkriptase zu DNA-Strängen polymerisiert werden. Abschließend wurde die Reaktion durch 5-minütige Inkubation bei 95 °C durch Denaturierung der zugegebenen Enzyme beendet. Zuletzt wurde das cDNA-Gemisch in 91 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Dieses Verfahren wurde als Vorbereitung auf die real-time-PCRs mit dem RT² Profiler™ PCR Array: Human p53 Signaling Pathway und dem RT² Profiler™ PCR Array: CAPH09816D durchgeführt. Für die übrigen real-time-PCR-Verfahren erfolgte die cDNA-Synthese wie nachfolgend.

Protokoll B:

Es wurden 11 µl RNA-Mix aus 1 µl Hexameren, einem probenabhängigen Volumen RNA zum Erreichen einer RNA-Menge von 250 ng und H₂O hergestellt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 70 °C im Heizblock folgte die Zugabe von 8 µl RT-Mix aus: 2 µl 100 mM DTT, 4 µl 5xReverse Transcriptase Buffer, 0,5 µl dNTP's und 1,5 µl

H₂O. Es folgte eine weitere 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 1 µl M-MLV eingemischt, das Gemisch für 2,5 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert und abschließend 5 min bei 95 °C die Enzymaktivierung durchgeführt. Es folgte die Verdünnung der cDNA mit 20 µl H₂O.

4.3.2 Real-time-PCR (*Polymerase-chain-reaction*)

Protokoll A:

Für die real-time-PCR im CFX96 Real-Time System C 1000™ Thermal Cycler von BIO RAD wurden 96-well-plates verwendet. Pro well wurde ein 25 µl Reaktionsansatz bestehend aus 12,5 µl RT² Real-Time™ SYBR Green PCR master mix von SABioscience, 1 µl cDNA und 11,5 µl H₂O nötig. Als Übersichtsuntersuchung wurden 12 zufällig ausgewählte Schleimhaut- und kutane Melanomproben mit dem RT² Profiler™ PCR Array: Human p53 Signaling Pathway untersucht. Das verwendete Protokoll bestand aus einer Aktivierungsphase von 10 min bei 95 °C. Es folgten 40 Zyklen von:

- 15 sec bei 95 °C (Denaturierung)
- 30 sec bei 55 °C (Annealing)
- 30 sec bei 72 °C (Polymerisation)

Nach Identifikation von relevanten Genen wurden Customer Plates (RT² Profiler™ PCR Array: CAPH09816D) mit folgender Belegung angefertigt:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BAX	BCL2	BCL2A1	CASP9	CDKN1A	EI24	IGF1R	MDM2	RB1	RELA	TNFα	GAPDH
B	BAX	BCL2	BCL2A1	CASP9	CDKN1A	EI24	IGF1R	MDM2	RB1	RELA	TNFα	GAPDH
C	BAX	BCL2	BCL2A1	CASP9	CDKN1A	EI24	IGF1R	MDM2	RB1	RELA	TNFα	GAPDH
D	BAX	BCL2	BCL2A1	CASP9	CDKN1A	EI24	IGF1R	MDM2	RB1	RELA	TNFα	GAPDH
E	BAX	BCL2	BCL2A1	CASP9	CDKN1A	EI24	IGF1R	MDM2	RB1	RELA	TNFα	GAPDH
F	BAX	BCL2	BCL2A1	CASP9	CDKN1A	EI24	IGF1R	MDM2	RB1	RELA	TNFα	GAPDH
G	BAX	BCL2	BCL2A1	CASP9	CDKN1A	EI24	IGF1R	MDM2	RB1	RELA	TNFα	GAPDH
H	BAX	BCL2	BCL2A1	CASP9	CDKN1A	EI24	IGF1R	MDM2	RB1	RELA	TNFα	GAPDH

Tabelle 18: Plattenbelegung der Customer Plates

Es wurden jeweils Triplets bzw. aus belegungstechnischen Gründen Dupletts (A,B,C bzw. D,E,F bzw. G,H) für jede Probe angelegt. Das für diese Platten verwendete Protokoll begann auch mit einer Aktivierungsphase von 10 min auf 95 °C. Es folgten 45 Zyklen mit:

- 15 sec bei 95 °C (Denaturierung)
- 60 sec bei 60 °C (Annealing, Polymerisation, Detektion).

Das im Master Mix enthaltene SYBR® Green bindet an doppelsträngige DNA und sendet in gebundener Form bei Belichtung ein Fluoreszenzsignal aus. Das Signal ist also proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA. So ist eine quantitative Aussage über die DNA-Menge möglich.

Protokoll B:

Für die quantitative mRNA-Bestimmung (sowohl die übrigen Gene für FFPE-Material, als auch die Untersuchungen aus Zellkulturmaterial) kam das QuantiTect Primer Assay Kit von Qiagen zum Einsatz und es ergab sich pro well folgender Reaktionsansatz:

- 12,5 µl Master Mix
- 9,5 µl H₂O
- 2 µl cDNA
- 1 µl Primer Mix

Das verwendete PCR-Protokoll sah zuerst eine Aktivierungsphase von 15 min bei 95 °C vor. Es folgten 45 Zyklen mit:

- 15 sec bei 95 °C
- 60 sec bei 60 °C an.

4.3.3 Real-time-PCR Auswertung

Zur Auswertung wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt. Der Ct-Wert ist die PCR-Zykluszahl, bei der ein definiertes Fluoreszenzniveau (das Fluoreszenzsignal liegt deutlich über dem Hintergrundsignal) erreicht ist. Für die Triplets/Dupletts wurden jeweils die arithmetischen Mittel für die Ct-Werte der Gene gebildet. Der ΔCt -Wert ergab sich aus der Differenz des Ct-Werts des Zielgens und des GAPDH:

$$\Delta\text{Ct}[\text{Zielgen}] = \text{Ct}[\text{Zielgen}] - \text{Ct}[\text{GAPDH}]$$

Für den Vergleich der Proben wurde der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ermittelt ($\Delta\text{Ct}[\text{A}] - \Delta\text{Ct}[\text{B}] = \Delta\Delta\text{Ct}[\text{A vs. B}]$) und daraus die relative Expression ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) berechnet. Dabei wurden für Werte unter 0,4 eine signifikant erniedrigte, und für Werte über 2,5 eine signifikant erhöhte relative Expression angenommen.

4.3.4 Proteinuntersuchungen

4.3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Auftrennen des Proteingemischs die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Dabei wird das Proteingemisch im elektrischen Feld unter denaturierten Bedingungen (Tertiärstruktur durch β -Mercaptoethanol) und unter Anwesenheit von SDS (Überdecken der Eigenladung des Moleküls) aufgetrennt, sodass lediglich das Molekulgewicht Einfluss auf die Wandergeschwindigkeit Richtung Anode nimmt. Die von der Polyacrylamidkonzentration abhängige Porengröße des Trenngels beeinflusst die Laufgeschwindigkeit der Proteine und kann variiert werden, um die zu untersuchende Proteinbande klarer herauszuarbeiten. Zur Größenbestimmung wurde jeweils ein standardisiertes Markergemisch mitgeführt.

Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel ist nachstehender Tabelle zu entnehmen. Bei dem Acrylamidmix handelt es sich um eine 30 %-ige Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30:0,8 (w/v)). Für das Sammelgel wurde 1 M Tris/HCl mit einem pH-Wert von 6,8 verwendet. Die Aufgabe des Sammelgels ist, die Probe auf ein schmales Band zu bündeln. Für das Trenngel wurde 1,5 M Tris/HCl mit einem pH-Wert von 8,8 verwendet, der pH-Sprung von Sammel- auf Trenngel ermöglicht die Auftrennung des Proteingemischs.

	Sammelgel 5 %	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %
Tris/HCl	0,25 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
Acrylamidmix	0,33 ml	1,3 ml	1,7 ml	2 ml
H₂O	1,4 ml	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml
SDS 10 %	20 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
APS 10 %	20 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l

Tabelle 19: Übersicht über die Zusammensetzung der Gele

Nach dem Polymerisieren der Gele wurden je 10 μ g Protein der zu untersuchenden Proben mit 5x SDS-Auftragspuffer vermischt und 5 min bei 99 °C zur Denaturierung gekocht.

5x SDS-Auftragspuffer:

- 1 g SDS
- 386 mg DTT
- 5 ml Glycerol
- 3,125 ml 1 M Tris pH 6,8
- 0,5 ml 1 % Bromphenol Blue
- 1,375 ml aqua dest.

Anschließend erfolgte das Beladen der Gele mit den denaturierten Proben. Für die Auftrennung wurden die Gele in 10x SDS-Laufpuffer an ein elektrisches Feld von anfangs 80 V, nach dem Einlaufen bei 250 V durchgeführt. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins dauerte die Gelelektrophorese 1 bis 3 h.

10x SDS-Laufpuffer:

- 250 mM Tris
- 1,91 M Glycin
- 1 % SDS
- in H₂O

4.3.4.2 Western Blot

Um die aufgetrennten Proteine näher untersuchen zu können, schloss sich eine Western Blot Analyse nach Renart *et al.* (Renart *et al.*, 1979) an. Dazu werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, die dann im nächsten Schritt mittels Immunodetektion dargestellt werden können. Die Übertragung erfolgt in einem Semi-dry-blot erneut in einem elektrischen Feld, da das noch immer an die Proteine gebundene SDS mit seinen negativen Ladungen eine Wanderung der Proben Richtung Anode verursacht.

Zur Vorbereitung mussten PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran und Filterpapier (Whatman-3MM-Chromatographiepapier) entsprechend der Größe der Gele zugeschnitten werden. Es folgte eine 5-minütige Inkubation in 100 %-igem Methanol. Nach kurzem Spülen mit Aqua dest. erfolgte die 5-minütige Inkubation in Anodenpuffer II.

Anodenpuffer I:

- 300 mM Tris
- 20 % Methanol
- in Aqua dest.

Anodenpuffer II:

- 25 mM Tris
- 20 % Methanol
- in Aqua dest.

Kathodenpuffer:

- 25 mM Tris
- 20 % Methanol
- 40 mM ϵ -Amino-n-caproic Acid
- in Aqua dest.

Der Aufbau zum Blot bestand aus (von unten nach oben): Anode - 6 getränkte Filterpapiere mit Anodenpuffer I - 3 getränkte Filterpapiere mit Anodenpuffer II - Membran - Gel mit Proteinen - 9 getränkte Filterpapiere mit Kathodenpuffer - Kathode. Die angelegte Spannung betrug maximal 5 mA pro cm² der Membran. Der Blot benötigte je nach Proteingröße 45 bis 60 min.

4.3.4.3 Immunodetektion

Um nun das Protein zweifelsfrei identifizieren zu können, wird eine, dem Prinzip der Immunhistochemie ähnliche, antikörperbasierte Methode eingesetzt. Auch hier bindet ein Primärantikörper epitopspezifisch an sein Substrat (hier: das zu untersuchende Protein). Ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) erkennt wiederum den Primärantikörper und bindet ihn. Der Sekundärantikörper ist mit HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt, und kann dementsprechend durch Peroxidase-Reaktion erzeugte Fluoreszenz zum Nachweis der Antikörperkomplexe eingesetzt werden. Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörperlösung (Primärantikörper in der unter Material aufgeführten Verdünnung in TBS Tween mit 5 % Magermilchpulver und 5 % BSA) inkubiert.

TBS Tween:

- 50 mM Tris/HCl
- 150 mM NaCl
- pH auf 7,5 einstellen (mit HCl bzw. NaOH)
- 0,1 % Tween 20

Es folgten drei Waschschrte für je 5 min in TBS Tween. Danach erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (auch dem Materialteil mit der Verdünnung zu entnehmen, in TBS Tween mit 5 % Magermilchpulver) für 1,5 h. Erneut schlossen sich 3 Waschschrte für je 5 min in TBS Tween an. Der Nachweis

wurde mittels ECL-Kit geführt. Dazu wurden die Membranen 1 min mit frisch angemischter Lösung inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols. Das dabei entstehende Lichtsignal (Chemilumineszenz) wurde mit dem Imager von BioRad detektiert. Die Expositionszeiten für verschiedene Proteine variierten stark und wurden dementsprechend angepasst, um verwertbare Banden zu erhalten. Dabei wurde natürlich berücksichtigt, dass die zu vergleichenden Proben (z.B. Probe A Kontrolle und nach Behandlung) jeweils in einem Versuchsansatz (also auf einer Membran mit gleicher Belichtungszeit) behandelt wurden.

4.3.5 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde als Vorbereitung auf die C-Kit-Sequenzierung durchgeführt. Die Exons 9, 11, 13 und 17 wurden untersucht. Dazu wurde zuerst ein Master-Mix hergestellt aus:

- 5 µl 10 x PCR Puffer
- 1 µl dNTP's
- 10 µl 5 x Enhancer P
- 0,5 µl Forward-Primer (Verdünnung 1:20)
- 0,5 µl Reverse-Primer (Verdünnung 1:20)
- 0,5 µl taq-Polymerase
- 22,5 µl H₂O

Nach der Zugabe von 10 µl DNA zum Master-Mix erfolgte die PCR im ThermoCycler nach dem Protokoll:

- a) 95 °C 5 min (Aktivierung)
- b) 95 °C 30 sec (Denaturierung)
- c) 56 °C 30 sec (Annealing)
- d) 72 °C 90 sec (Elongation)
- e) 72 °C 7 min (Deaktivierung)

Die Schritte b) bis d) wurden 45 mal wiederholt.

4.3.6 *C-KIT*-Sequenzierung

Es wurden jeweils 50 µl PCR-Produkt pro Probe auf 96-well-plates umpipettiert und zusammen mit insgesamt je 50 µl Forward- und Reverse-Primer (Primerverdünnung 1:20) an MWG Eurofins verschickt. Dort erfolgte die Sequenzierung.

Die von MWG Eurofins erhaltenen Daten wurden mittels SnapGene mit der Wildtypsequenz verglichen und so auf Mutationen untersucht.

5 Ergebnisse

5.1 Real-time-PCR aus FFPE-Material: teilweise signifikante Unterschiede in der Expression verschiedener Gene des p53-Signalwegs in Schleimhaut- und kutanen Melanomen

Um das Verhalten der Schleimhautmelanome verglichen mit kutanen Melanomen auf RNA-Ebene hinsichtlich seiner biologischen Aggressivität zu beleuchten, wurden die beiden Patientenkollektive nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese mittels real-time-PCR untersucht und einander gegenübergestellt.

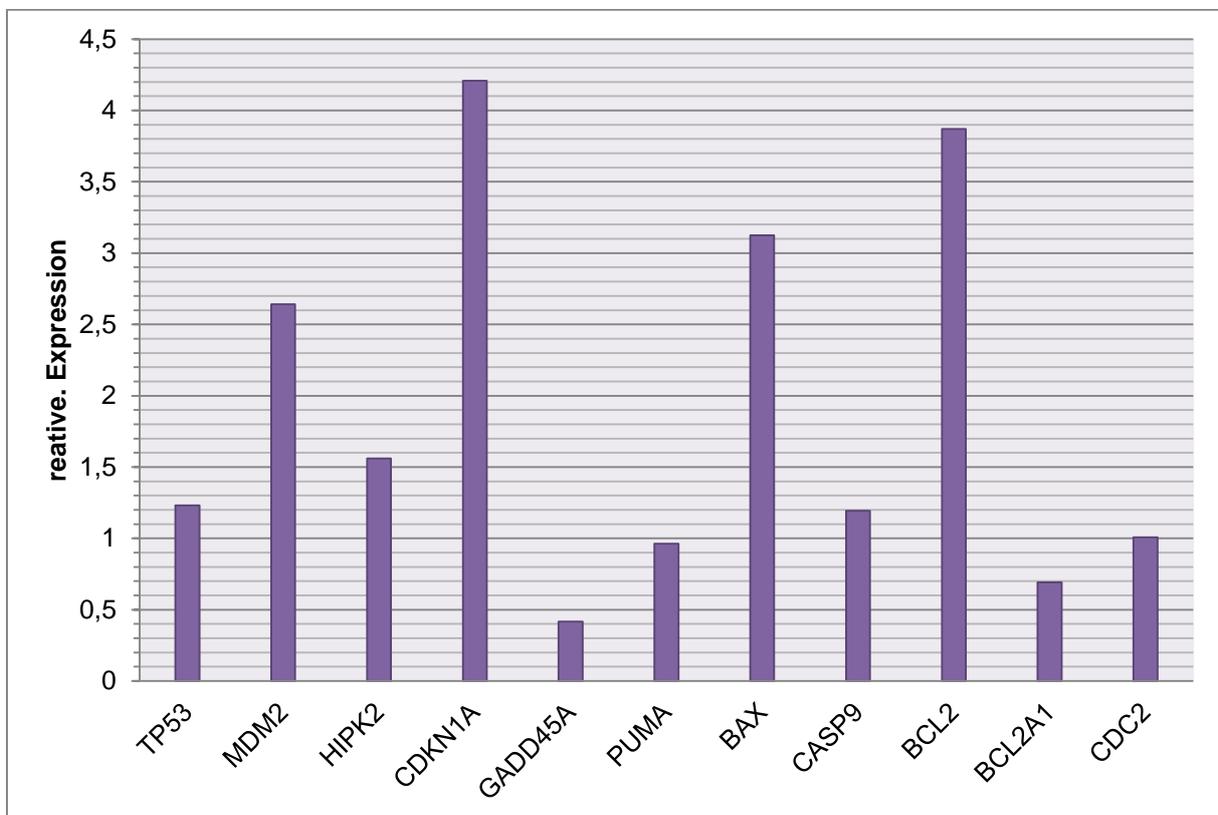


Abbildung 4: Die Genexpression verschiedener p53-Regulatoren bzw. von p53 regulierter Gene ist im Vergleich von MuM zu MM alteriert. Dargestellt ist die x-fache Über-/Herabregulation der auf GAPDH normalisierten Werte in Schleimhautmelanomen verglichen mit kutanen Melanomen.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied für *TP53*, *HIPK2*, *PUMA*, *CASP9*, *BCL2A1* und *CDC2*. *MDM2* ist ebenso wie *CDKN1A*, *BAX*, und *BCL2* in Schleimhautmelanomen signifikant höher exprimiert als in kutanen Melanomen. Lediglich *GADD45A* zeigt eine signifikant verminderte Expression in Schleimhautmelanomen verglichen mit kutanen Melanomen.

5.2 Uneinheitliche Färbemuster in der Immunhistochemie von Schleimhaut- und kutanen Melanomen

5.2.1 p53 ist konstitutionell in beiden Tumorentitäten erhöht mit deutlichem Überwiegen der kutanen Melanome

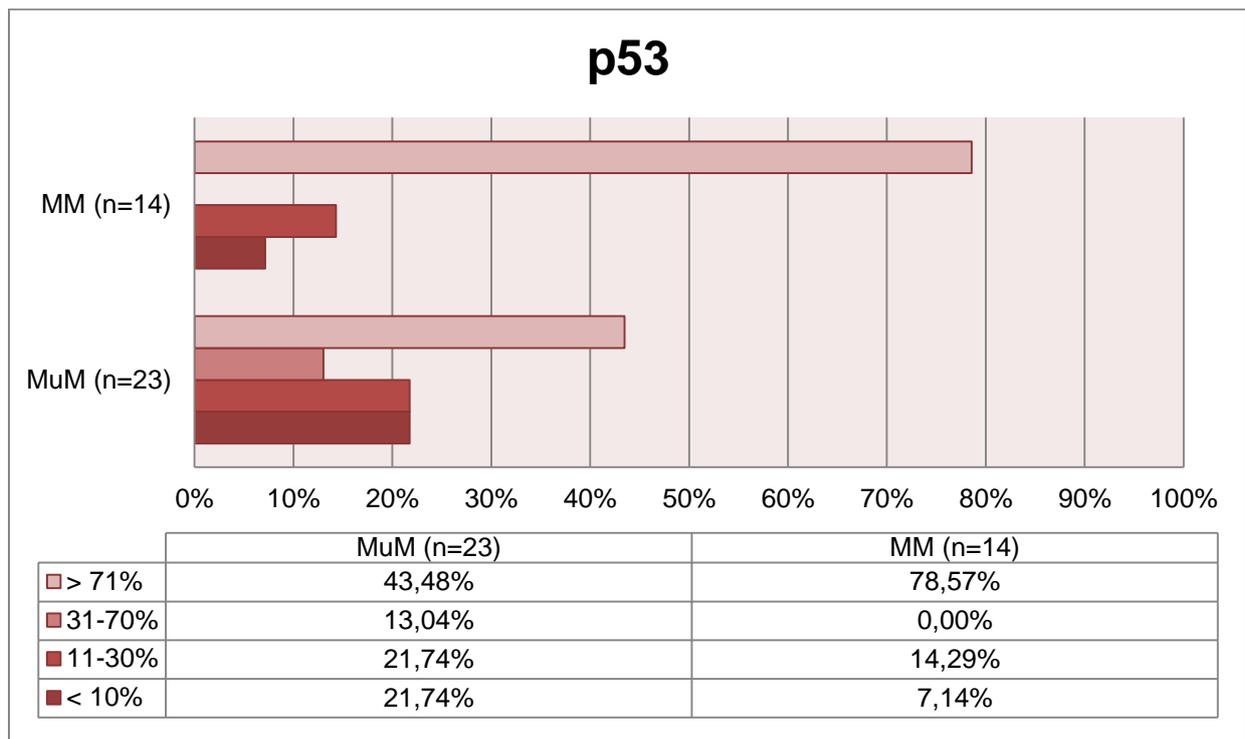


Abbildung 5: Übersicht zur p53-Immunhistologie, es zeigt sich eine Anfärbarkeit für beide Melanomgruppen. Dabei Überwiegen die positiven Färbungen für kutane Melanome deutlich.

Bei der p53-Immunhistologie wurden in über 90 % der kutanen Melanome positive Färbungen gefunden. Lokalisiert war die Färbung im Kern, zu 23,08 % war eine zusätzliche Plasmafärbung gegeben.

Auch bei den Schleimhautmelanomen fanden sich in knapp 80 % der Fälle positive Färbeergebnisse, verglichen mit den kutanen allerdings mit einem geringeren Prozentsatz positiver Zellen. Es waren ausschließlich Kernfärbungen vorhanden.

5.2.2 Kaum Unterschiede in der MDM2-Expression

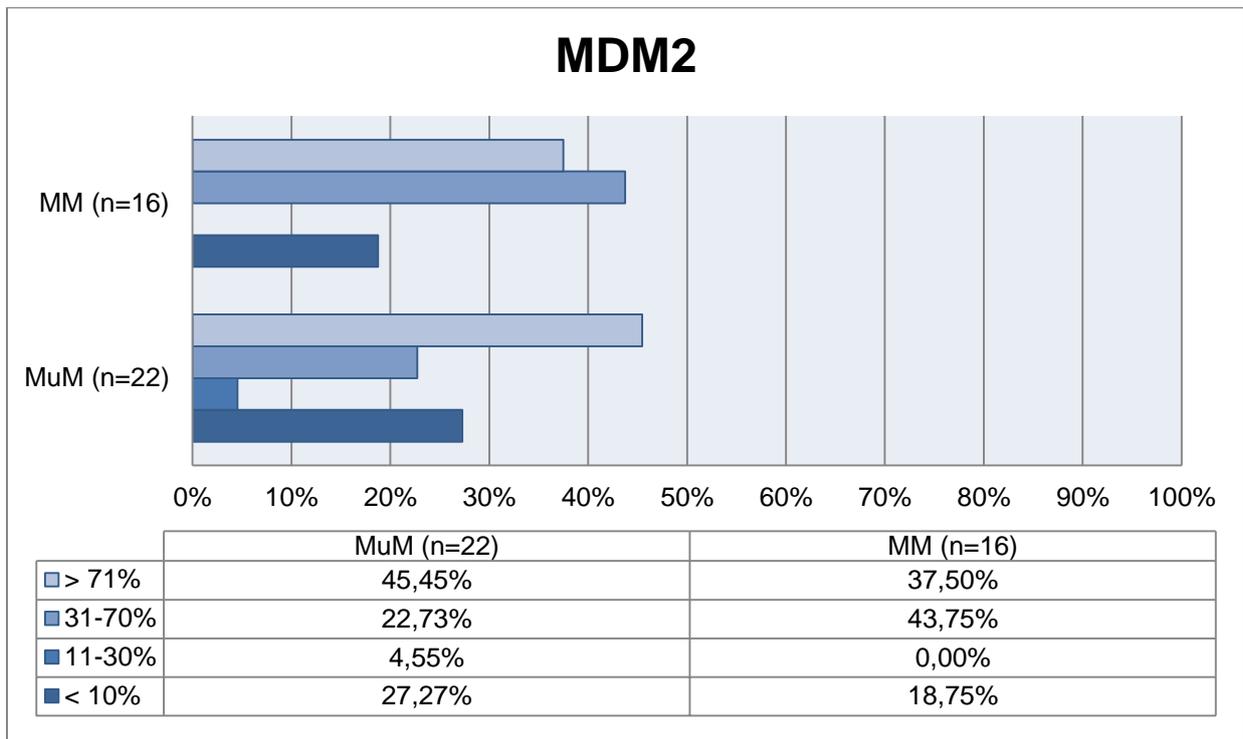


Abbildung 6: Keine wegweisenden Unterschiede in der MDM2-Immunhistologie

Die Proteinexpression von MDM2 lag im mittleren und hochpositiven Bereich bei rund 80 % in kutanen Melanomen. Dabei lagen am häufigsten reine Kernfärbungen (46,15 %) gefolgt von Färbungen beider Zellkompartimente (30,77 %) vor. Bei 23,08 % der Schnitte wurde nur das Zellplasma angefärbt.

In den Schleimhautmelanomen war die MDM2-Expression mit knapp 30 % negativen Schnitten etwas geringer. Die Verteilung auf die Zellkompartimente fiel dafür mit 75 % deutlich zugunsten der Kernfärbung aus, auf Plasma- und kombinierte Plasma- und Kernfärbung entfielen je 12,5 %.

5.2.3 Vorwiegend negatives Ergebnis in der HIPK2-Immunhistochemie

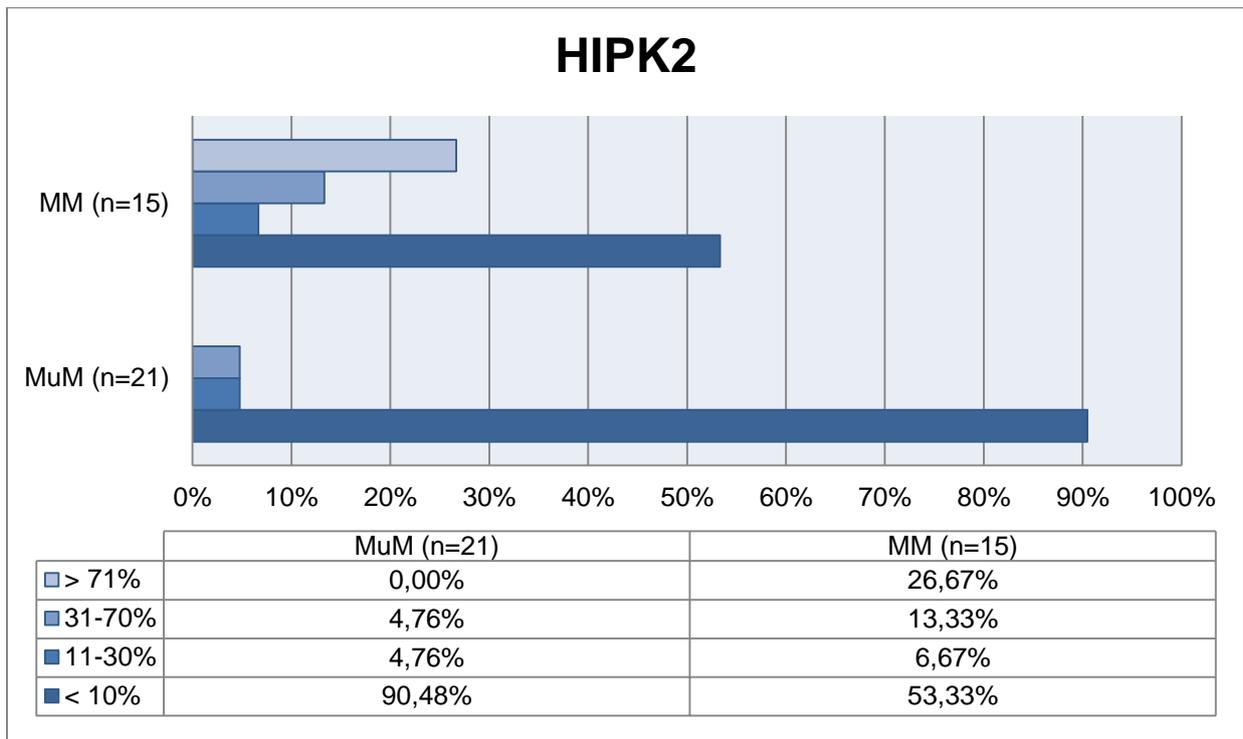


Abbildung 7: Übersicht zur HIPK2-Immunhistologie

Nur bei ungefähr der Hälfte der kutanen Melanome konnte eine HIPK2-Färbung gezeigt werden. Diese fanden sich hauptsächlich im Plasma (57,14 %), bei 28,57 % lag eine kombinierte Kern- und Plasmafärbung vor. Lediglich in einem Schnitt (14,29 %) waren nur die Kerne positiv.

Im Schleimhautmelanomkollektiv waren über 90 % der Schnitte negativ. Die vorhandenen positiven Färbungen waren im Zellplasma lokalisiert.

5.2.4 Die Immunhistochemie von p21 zeigt keine Unterschiede zwischen den Kollektiven

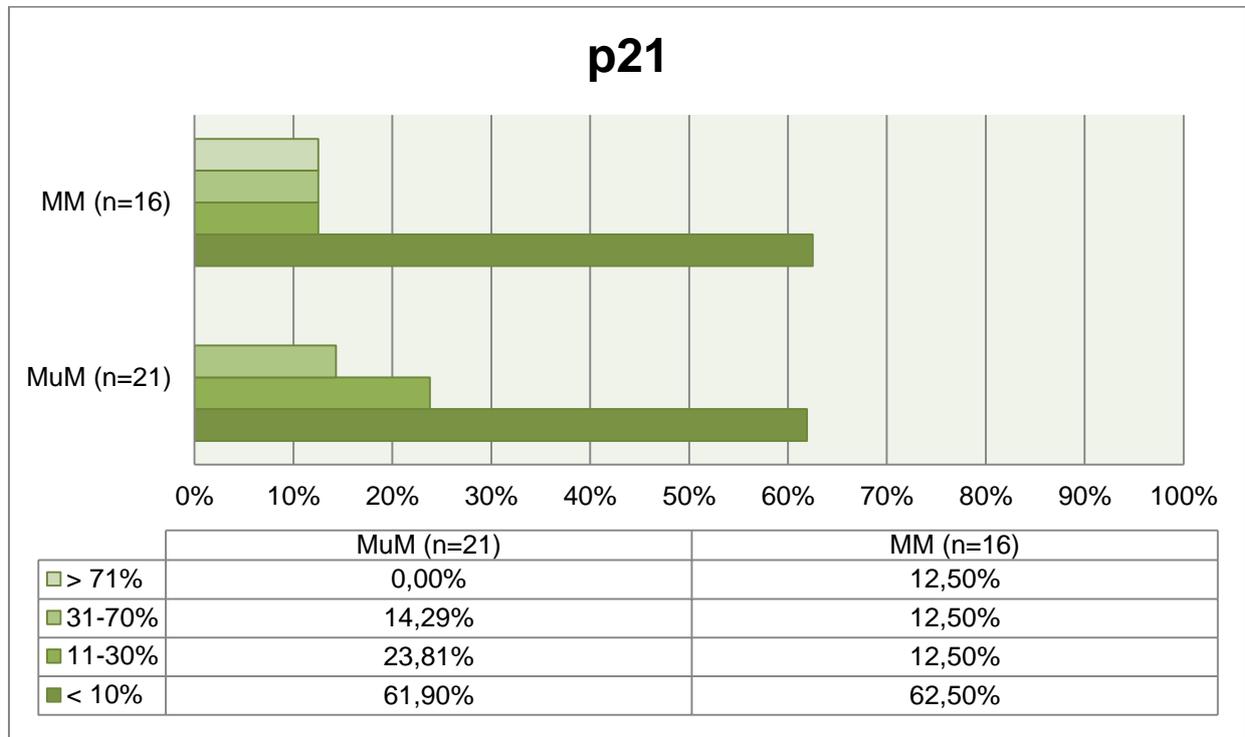


Abbildung 8: Die p21-Immunhistologie zeigt kaum Unterschiede zwischen den Melanomentitäten bei hauptsächlich negativen Färbergebnissen.

p21 zeigte in beiden Kollektiven ähnliche Anteile von negativen Färbungen von rund 60 %. Dabei hatten die Schleimhautmelanome eher eine Tendenz zu mittel- und schwachpositiven Färbungen während sich die kutanen Melanome gleichmäßig auf die übrigen Kategorien verteilen.

Bei den Schleimhautmelanomen überwogen deutlich die Kernfärbungen mit 87,5 %, in 12,5 % bestanden Plasmafärbungen, kombinierte Färbungen wurden nicht gefunden. Unter den kutanen Melanomen war die größte Lokalisationsgruppe ebenfalls die Kernfärbung mit 66,67 %. Die übrigen Färbungen verteilten sich zu gleichen Teilen auf Plasma- und kombinierte Färbung mit je 16,67 %.

5.2.5 In Schleimhautmelanomen wird GADD45A signifikant höher exprimiert als in kutanen Melanomen

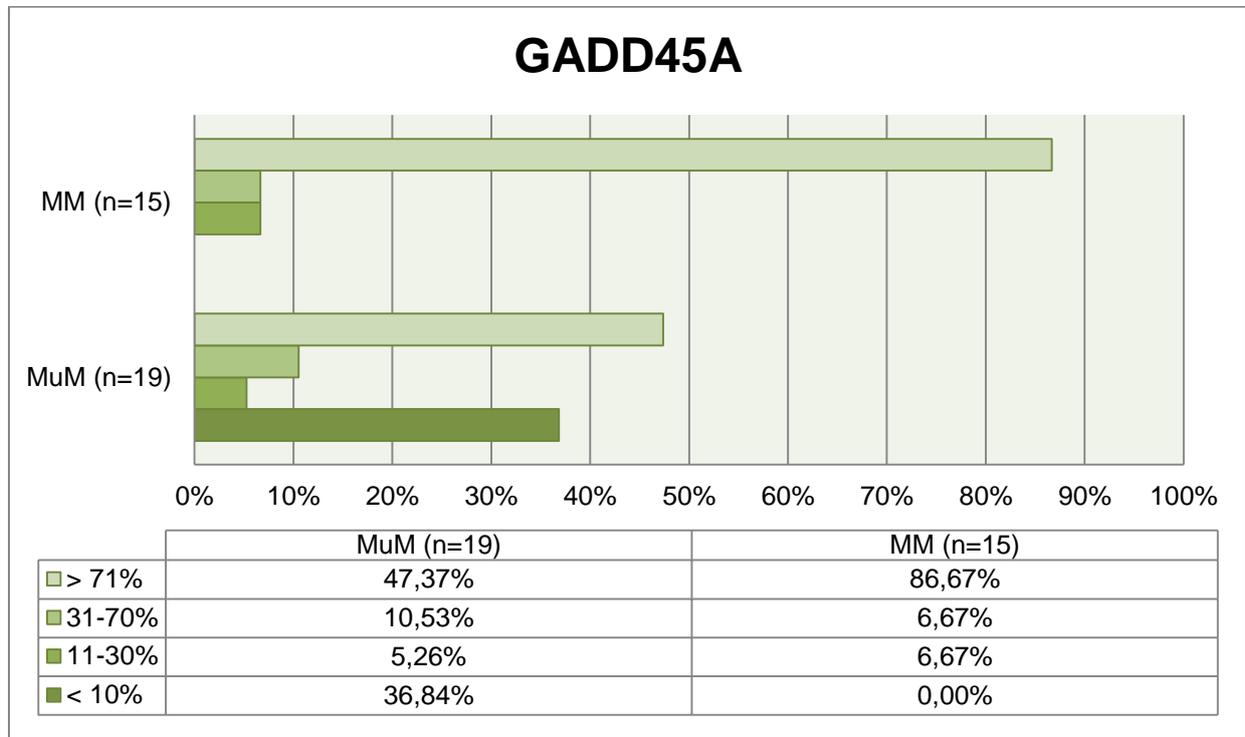


Abbildung 9: In der GADD45A-Immunhistologie zeigen alle kutanen Melanome eine Färbung, Schleimhautmelanome bleiben in über einem Drittel der Fälle ungefärbt.

Alle kutanen Melanome zeigten eine positive GADD45A-Färbung wobei die hochpositiven Schnitte mit gut 85 % den größten Anteil hatten. Außerdem gab es je einen mittel- und einen schwachpositiven Schnitt. Lokalisiert waren die Färbungen zu 33,33 % im Plasma und zu 66,67 % kombiniert in Plasma und Kern.

In den Schleimhautmelanomen stellten ebenfalls die hochpositiven Schnitte die größte Gruppe dar, allerdings nur mit einem Anteil von knapp 50 %, gefolgt von den negativen Schnitten mit knapp 40 %. Eine reine Kernfärbung zeigten dabei 25 %, eine kombinierte ebenfalls 25 %. Am häufigsten war die reine Plasmafärbung mit 50 %.

5.2.6 In kutanen Melanomen ist der Anteil PUMA positiver Färbungen deutlich erhöht

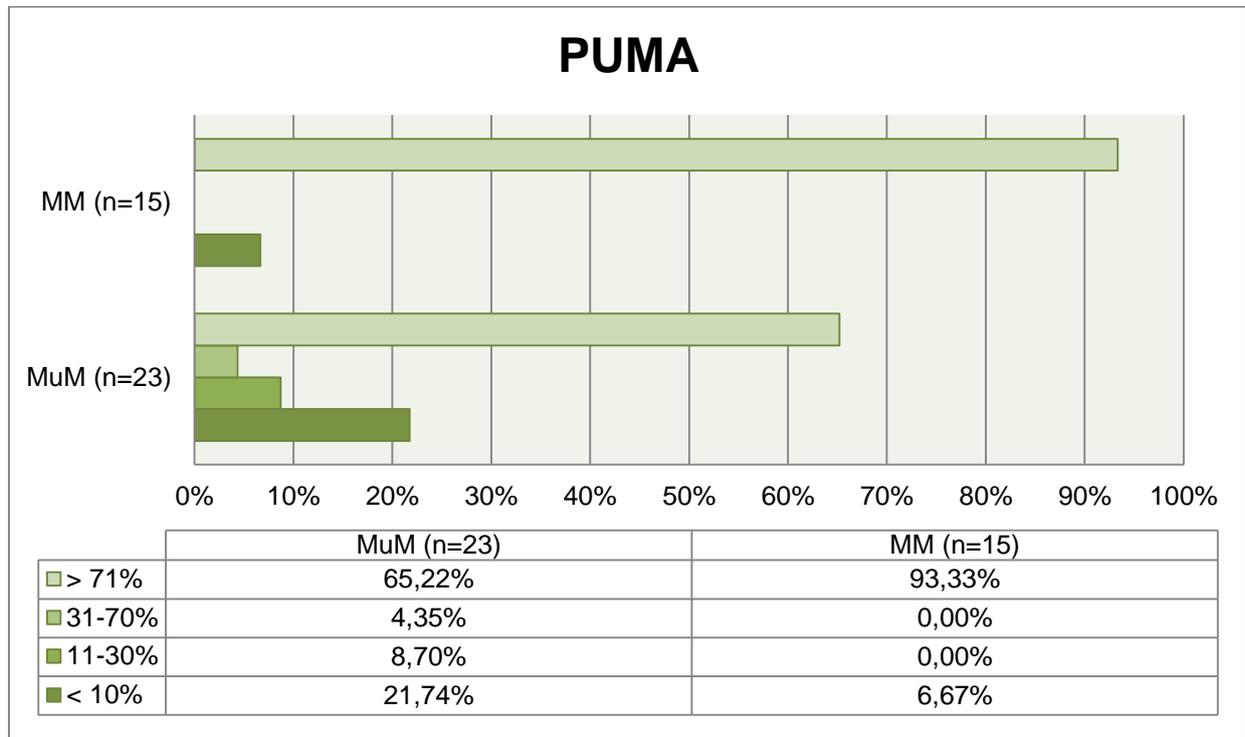


Abbildung 10: Auch in der PUMA-Immunhistologie ist ein deutliches Überwiegen von positiven Färbungen in kutanen Melanomen nachweisbar.

93,33 % der kutanen Melanome waren hochpositiv, lediglich ein Schnitt zeigte keine Färbung. Es handelte sich dabei zu 100 % um Plasmafärbungen.

Die Schleimhautmelanome waren auf alle Kategorien verteilt, knapp zwei Drittel entfielen auf hochpositive Schnitte, gut 20 % waren allerdings auch negativ. Die anderen beiden Gruppen waren jeweils mit weniger als 10 % vertreten. Auch hier waren sämtliche Färbungen im Plasma lokalisiert.

5.2.7 Überwiegen negativer BAX-Expression in Schleimhautmelanomen

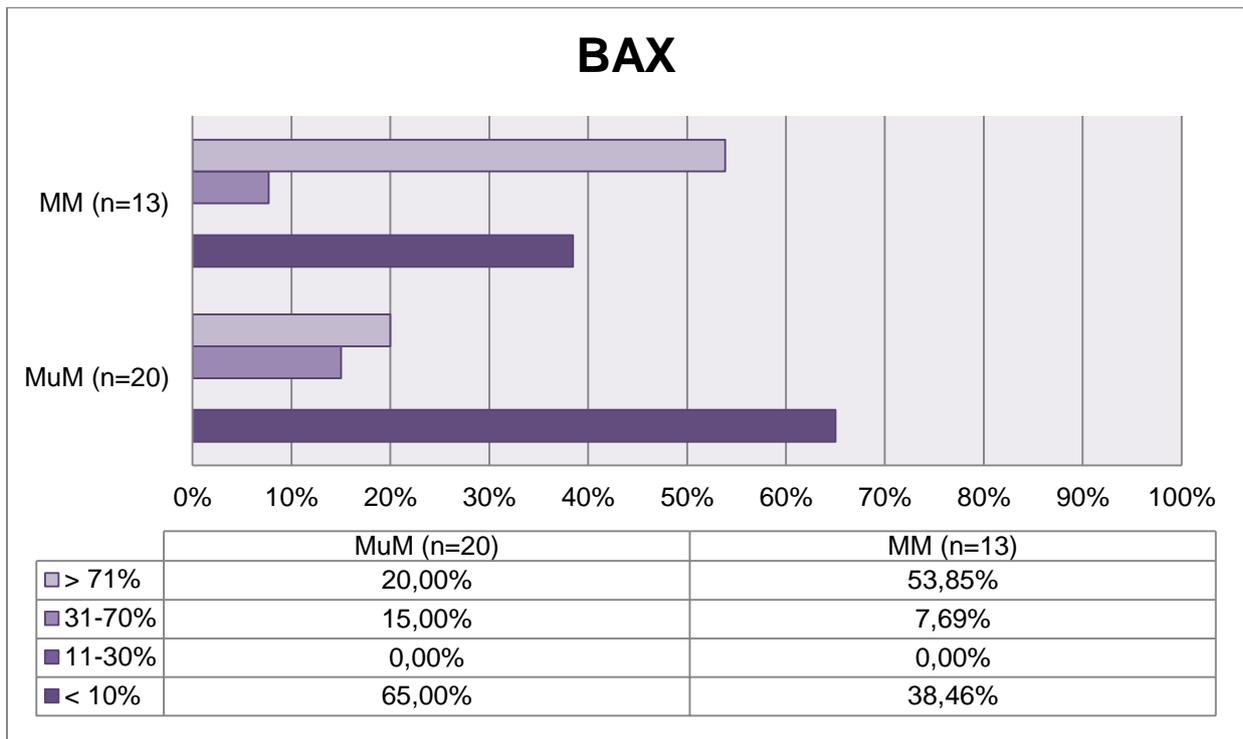


Abbildung 11: Insgesamt hauptsächlich negative Ergebnisse in der BAX-Immunhistologie, mit einem deutlichen Überwiegen der Schleimhautmelanome

Bei der BAX-Immunhistochemie waren in beiden Kollektiven keine schwach positiven Schnitte vorhanden. Die kutanen Melanome teilten sich etwa im Verhältnis 60 zu 40 in positive und negative Schnitte auf. Die Schleimhautmelanome zeigten hingegen 65 % negative und nur 35 % positive Färbungen. In beiden Kollektiven fanden sich ausschließlich Plasmafärbungen.

5.2.8 Caspase 9-Färbungen fast ausschließlich negativ

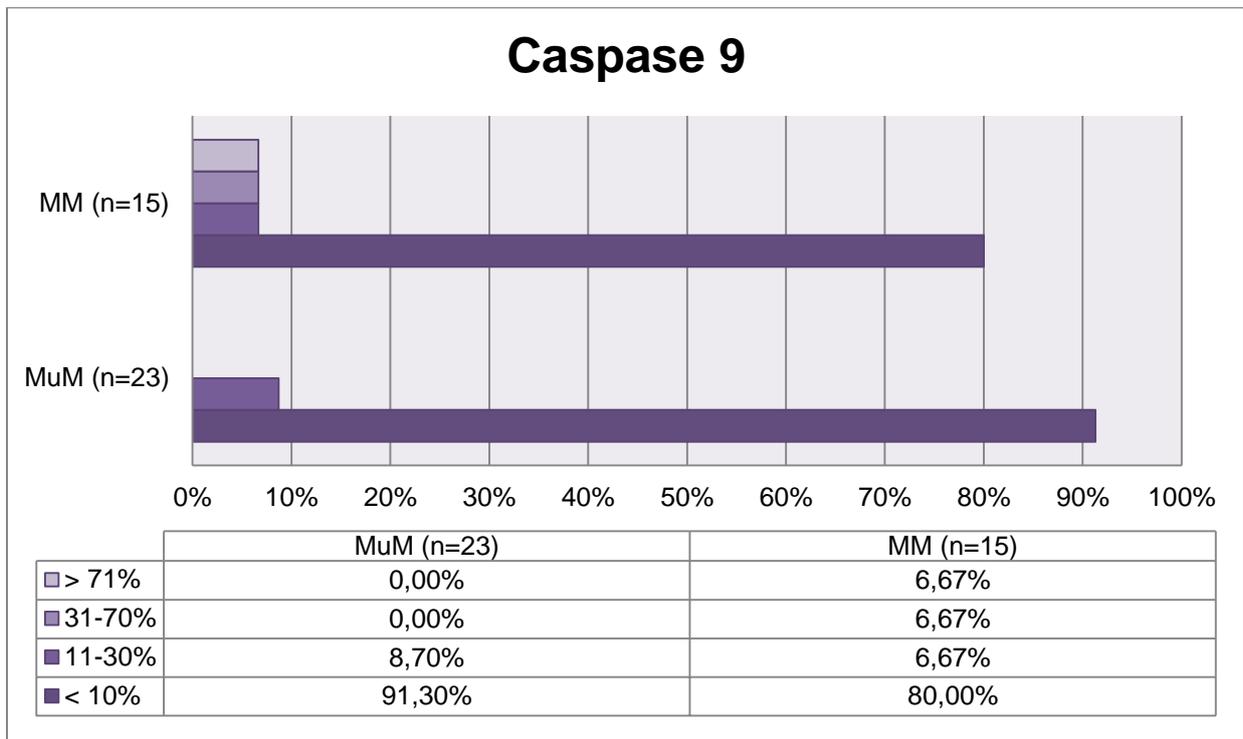


Abbildung 12: Casp9-Immunhistologie ist fast ausschließlich negativ

80 % der kutanen Melanome waren in der Caspase 9-Färbung negativ. Die übrigen 20 % entfielen zu gleichen Teilen auf schwach-, mittel- und hochpositive Färbungen. Es handelte sich dabei nur um Plasmafärbungen.

Auch bei den Schleimhautmelanomen machten die negativen Schnitte den Löwenanteil mit über 90 % aus. Der Rest waren schwachpositive, zur Hälfte Plasma- und zur anderen Hälfte kombinierte Färbungen.

5.2.9 Vorwiegend negative BCL2-Färbeergebnisse

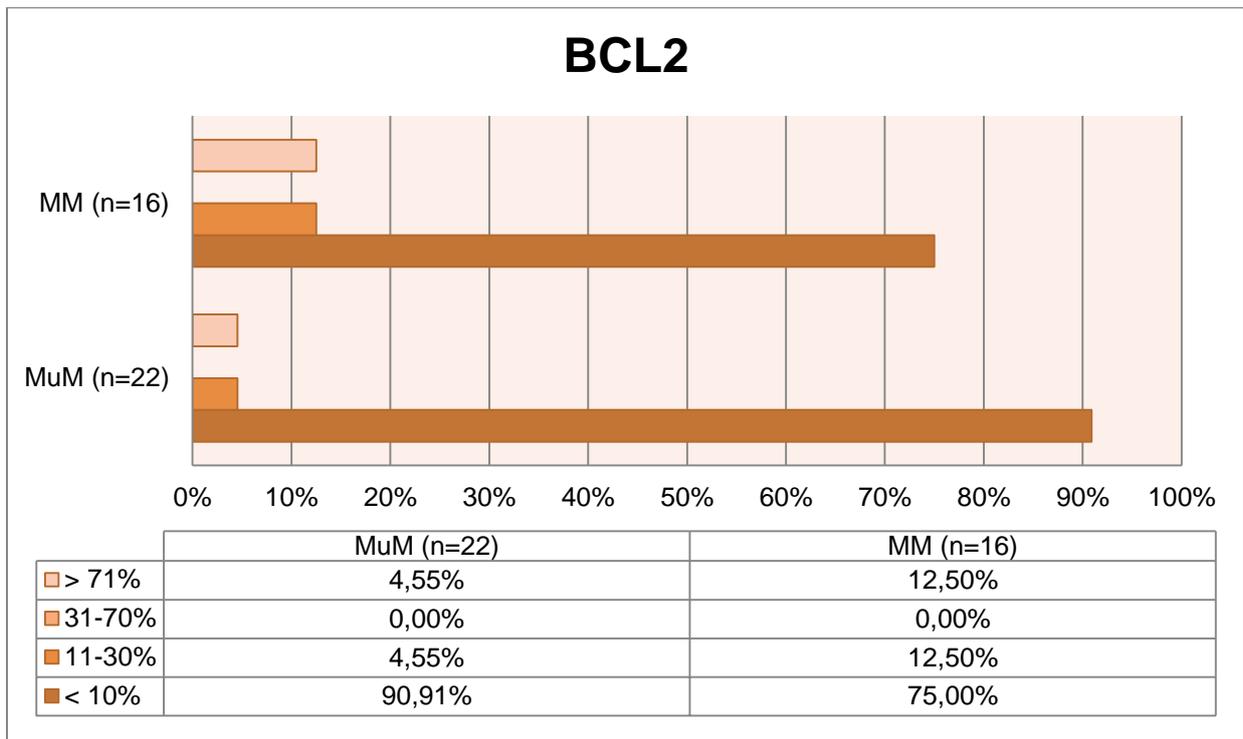


Abbildung 13: Für beide Melanomentitäten zeigt die BCL2-Immunhistologie hauptsächlich negative Färbungen

Die BCL2-Immunhistochemie fiel für kutane und Schleimhautmelanome sehr ähnlich aus. Die größte Untergruppe dabei waren negative Schnitte (75 % kutane, 90 % Schleimhaut). Die übrigen Proben verteilten sich jeweils gleichmäßig auf schwach- und hochpositive Färbungen.

Alle positiven kutanen Melanome waren Plasmafärbungen, während sich die Schleimhautmelanome zu gleichen Teilen auf Kern- und Plasmafärbungen spalteten.

5.2.10 Überwiegen der BCL2A1-Expression in kutanen Melanomen

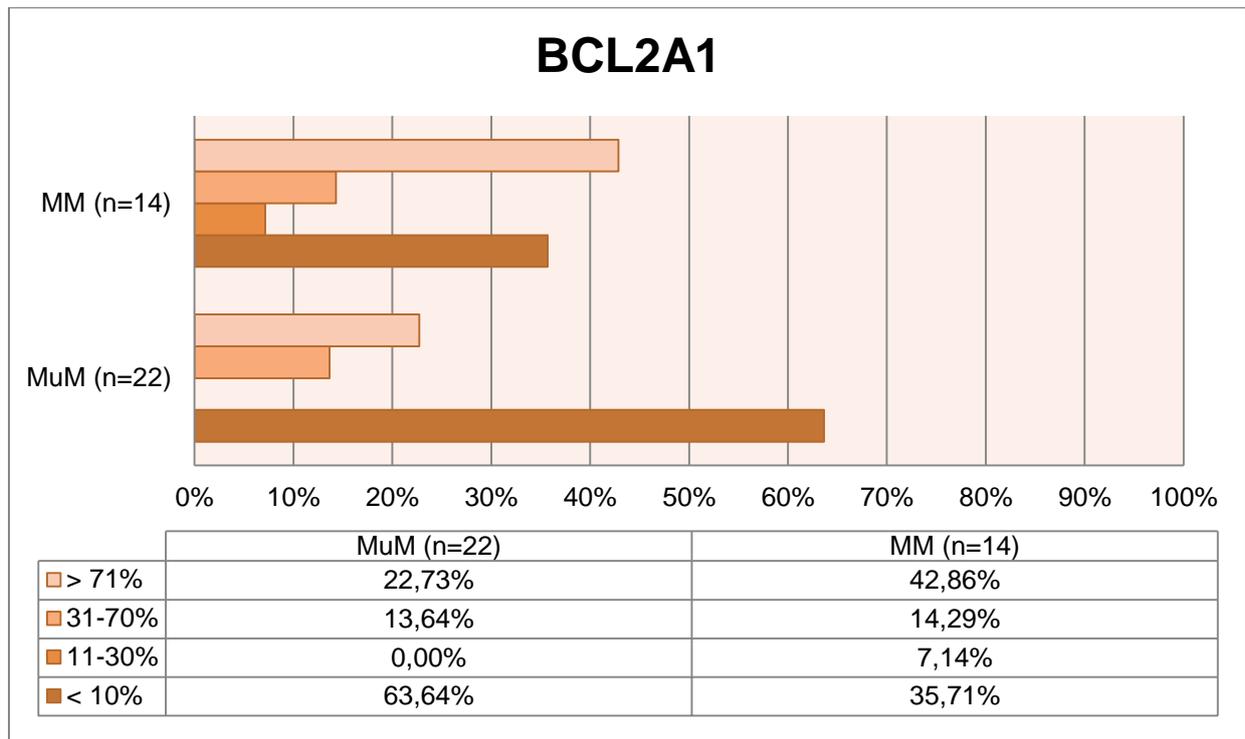


Abbildung 14: Uneinheitliches Ergebnis der BCL2A1-Immunhistologie mit mehr positiven Färbungen auf Seiten der kutanen Melanome

Die kutanen Melanome wiesen rund 35 % negative Schnitte auf. Der größte Anteil positiver Schnitte entfiel mit über 40 % auf hochpositive Proben. Ein Schnitt zeigte dabei eine Kernfärbung, ansonsten waren nur Plasmafärbungen (88,89 %) zu verzeichnen.

Bei den Schleimhautmelanomen fanden sich knapp 65 % negative Färbungen. Die größte Positivgruppe waren hochpositive Schnitte mit gut 20 %. Schwachpositive Proben waren nicht vorhanden. Die Färbungslokalisationen verhielten sich ähnlich zu den kutanen Melanomen mit 12,5 % Kern- und 87,5 % Plasmafärbungen.

5.2.11 Höherexpression von CDK1 in kutanen Melanomen

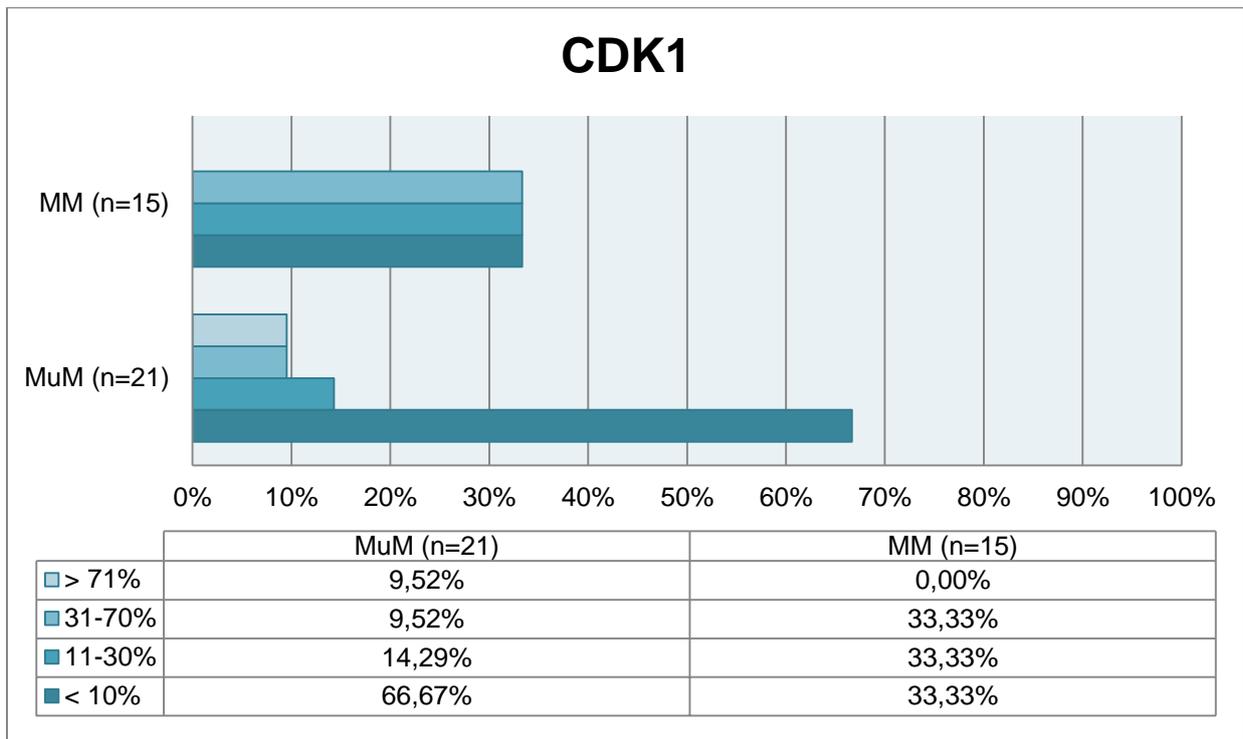


Abbildung 15: Es zeigt sich ein deutliches Überwiegen von positiven CDC2-Immunhistologien in kutanen Melanomen

Die kutanen Melanome wiesen keine hochpositiven Schnitte auf. Die Färbungen verteilten sich gleichmäßig auf die übrigen Kategorien. Lokalisiert waren sie zu 20 % im Kern, zu 40 % im Plasma und zu 40 % kombiniert.

Zwei Drittel der Schleimhautmelanome waren negativ. Knapp 15 % zeigten eine schwachpositive Färbung. Die übrigen Proben entfielen gleichmäßig auf mittel- und hochpositive Schnitte. Dabei waren etwas mehr als die Hälfte der Färbungen im Kern, etwas weniger als die Hälfte im Plasma lokalisiert.

5.2.12 Kaum Unterschiede in der Expression von C-Kit

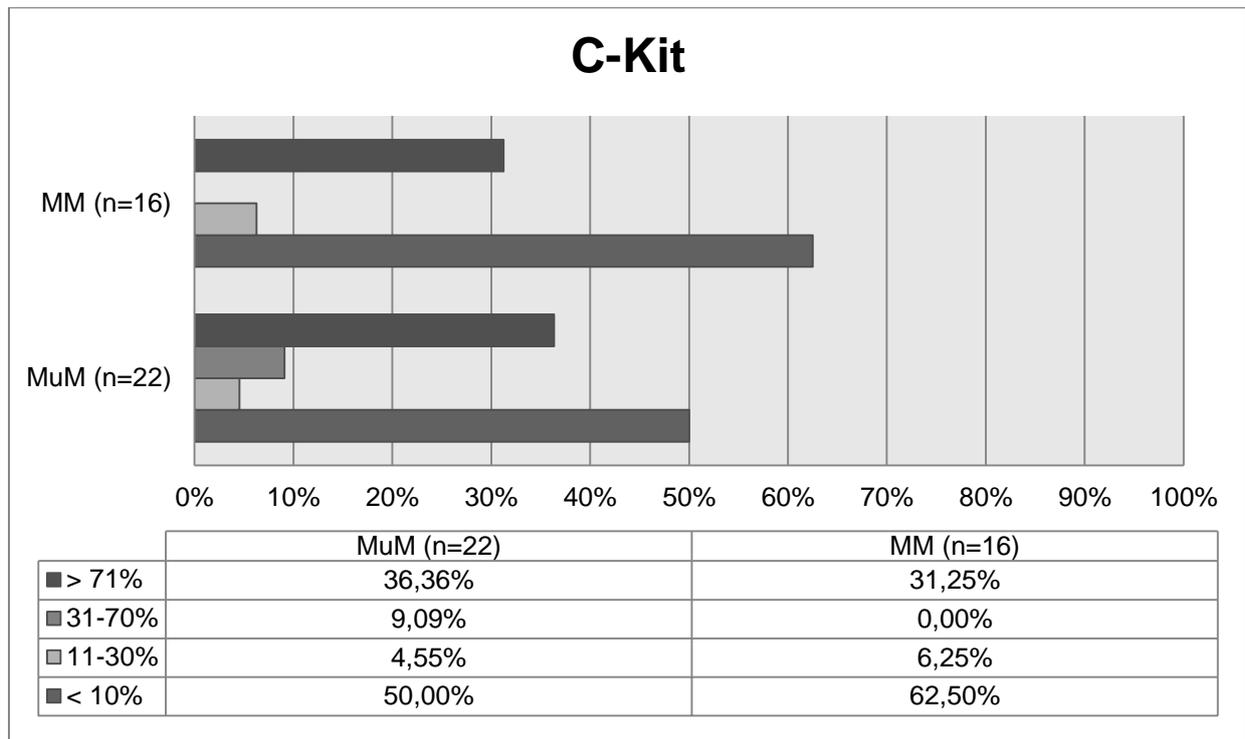


Abbildung 16: Ähnliches, allerdings wenig aussagekräftiges C-Kit-Immunhistologieergebnis in beiden Melanomentitäten

Ungefähr 60 % der kutanen Melanome entfielen auf negative Schnitte. Gut 30 % waren hochpositiv, die übrigen schwach positiv. Dabei zeigten je 50 % eine Plasma- bzw. eine kombinierte Färbung.

Die Hälfte der Schleimhautmelanome war negativ. Ansonsten wiesen rund 35 % eine hochpositive Färbung auf. Dabei war die Färbung in gut einem Viertel im Plasma lokalisiert, der Rest zeigte eine kombinierte Färbung.

Allgemein zeigt die Immunhistochemie kein eindeutiges Ergebnis, welche der Melanomentitäten sich als die aggressivere darstellt. Es fällt allerdings auf, dass bei fast allen Mitgliedern des p53-Signalwegs die positiven Färbungen in höheren Anteilen in kutanen Melanomen nachgewiesen werden konnten.

5.3 Das Regulationsverhalten der Zelllinien nach Behandlung mit 8 μ M Cisplatin ist in Schleimhautmelanomen den Melanozyten ähnlicher als in kutanen Melanomen

In den Stimulationsversuchen wurde die Regulationsfähigkeit der unterschiedlichen Zelltypen nach Behandlung mit dem p53 induzierenden Chemotherapeutikum Cisplatin untersucht. So konnte überprüft werden, inwiefern konstitutionelle Unterschiede vorlagen bzw. ob eine Induzierbarkeit/Repression durch p53 vorlag. Durch Untersuchung von RNA- und Proteinebene konnten Hinweise gesammelt werden, wo die Regulationsmechanismen bevorzugt griffen. Beispielweise war die Induktion von p53 auf RNA-Ebene nicht zu beweisen, wohingegen eine deutliche Proteininduktion (außer in der *knock-out*-Mutante) gezeigt werden konnte. Bei p53 scheint also keine vermehrte Transkription Ursache der Mehrexpression zu sein, sondern später greifende Mechanismen wie z.B. verminderter Abbau.

5.3.1 Deutlich geringere Expression aller untersuchten Gene in Melanomen im Vergleich zu Melanozyten

Zunächst fiel auf, dass die Expression der Melanozyten fast ausschließlich signifikant höher war, als die der Tumorzellen (Abbildung 17). Dies galt sowohl für stimulierte als auch für unstimulierte Zellen. Das Expressionsprofil von Melanomzellen auf mRNA-Ebene scheint also allgemein auf wesentlich niedrigerem Niveau als in den physiologischen Melanozyten stattzufinden.

Durch Cisplatin induzierte Expressionsunterschiede der verschiedenen Gene konnten nur vereinzelt nachgewiesen werden. Keinerlei cisplatininduzierte Regulation zeigten *TP53*, *PUMA*, *BAX* sowie *Caspase 9*. Tendenzen waren für *HIPK2*, *GADD45A* und *BCL2A1* erkennbar. Dabei zeigten die kutanen Melanome eine Tendenz zur Hochregulation von *GADD45A*. Für *HIPK2* zeigten die Melanozyten eine Herabregulierungstendenz. Sowohl Melanozyten als auch Schleimhautmelanome verhielten sich gleichsinnig und regulierten *BCL2A1* tendenziell herab. Auch für *MDM2* zeigten Melanozyten und Schleimhautmelanome eine gleichsinnige Regulation, in Melanozyten tendenziell, in Schleimhautmelanomen signifikant. Das klassische p53-Zielgen *CDKN1A* wurde bei allen drei Untergruppen

signifikant hochreguliert. Die Schleimhautmelanome zeigten eine signifikante Herabregulation von *CDC2*.

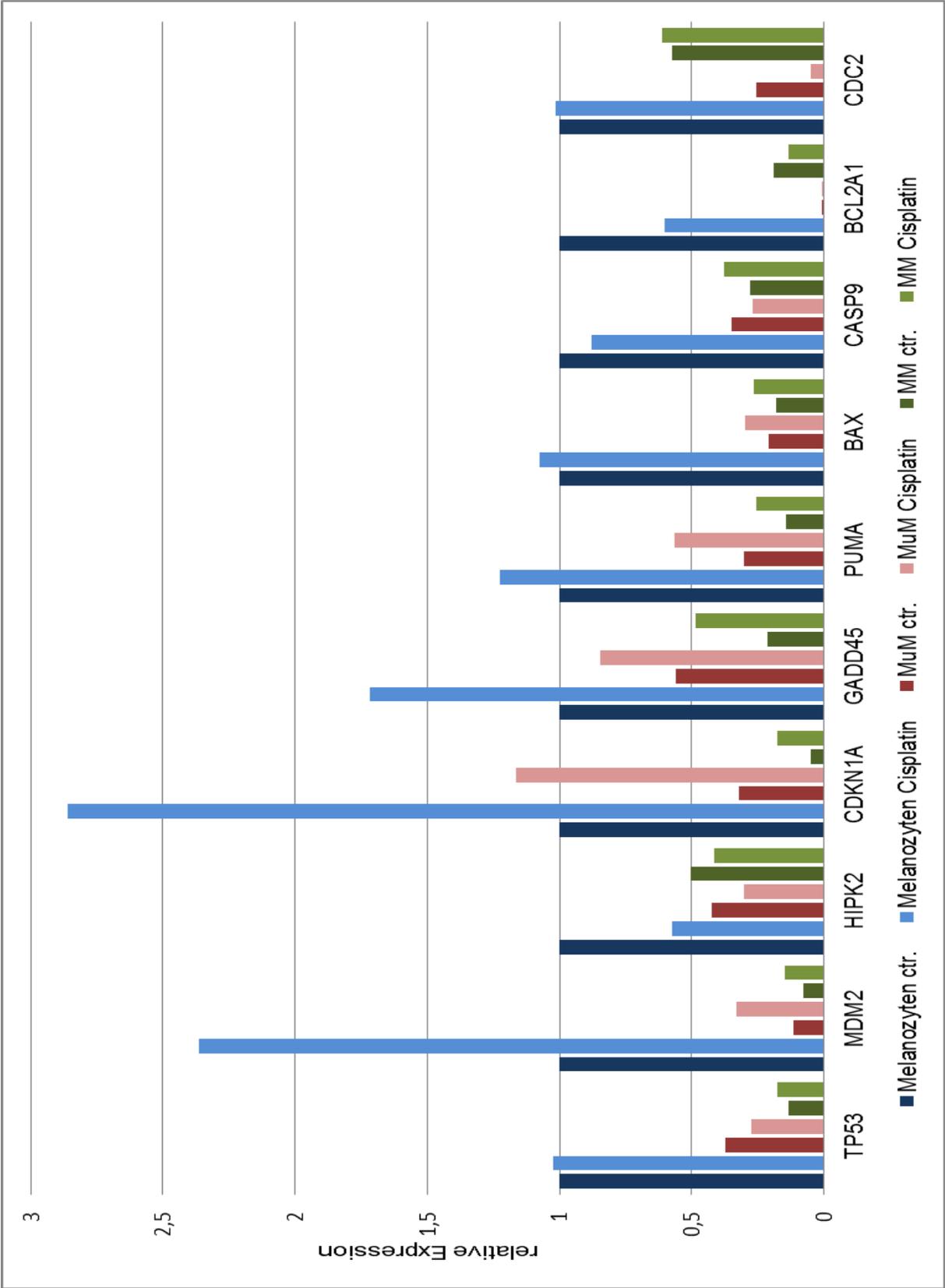


Abbildung 17: Die Grafik zeigt die relative Expression verschiedener Gene der mit 8µM Cisplatin für 24h behandelten Zellen im Vergleich zur Expression des Gens in unstimulierten Melanozyten. Ab 2,5-fachem Expressionsunterschied ist von signifikanten Veränderungen auszugehen, ab 2,0-fachem Expressionsunterschied wird in der vorliegenden Arbeit von Tendenzen gesprochen.

5.3.2 Auf Proteinebene deutliche Induzierbarkeit von p53, p21 und MDM2 bei uneinheitlichem Verhalten im weiteren *downstream*

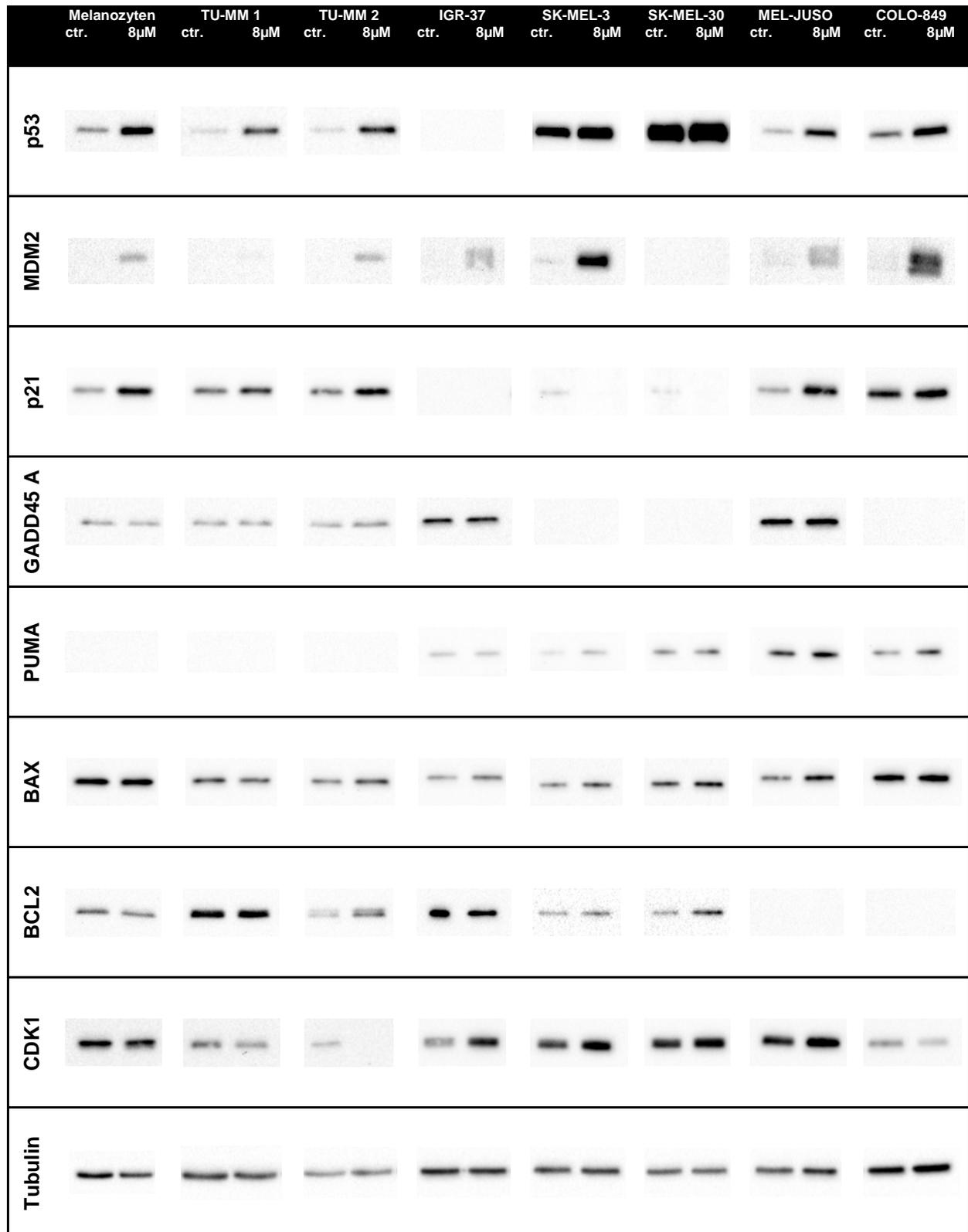


Tabelle 20: Die Zellen wurden für 24 h mit 8µM Cisplatin behandelt. Eine deutliche p53 Induzierbarkeit mit konsekutiver Hochregulation der klassischen p53 targets p21 und MDM2 ist zu sehen. Das Verhalten im weiteren *downstream* des p53-Signalweges ist uneinheitlich.

In allen Zellen, bis auf die *knock-out*-Mutante IGR-37, konnte eine Induzierbarkeit von p53 durch Cisplatin nachgewiesen werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für MDM2 und p21, die in den meisten Zelllinien nach Behandlung mit Cisplatin verstärkt exprimiert waren. Lediglich TU-MM 1 und SK-MEL-30 offenbarten keinerlei Nachweis für MDM2. IGR-37 zeigte analog zu p53 keinerlei p21-Expression, wohingegen SK-MEL-3 und SK-MEL-30 bei sehr schwachen Banden eine p21-Herabregulation erahnen ließen. GADD45A konnte in SK-MEL-3, SK-MEL-30 und COLO-849 gar nicht nachgewiesen werden, in den übrigen Zellen zeigte sich keine Regulation. Ein PUMA-Nachweis konnte in den Melanozyten und Schleimhautmelanomen nicht erbracht werden. Ein gleichbleibendes PUMA-Level ergab sich für IGR-37 und SK-MEL-30. Für SK-MEL-3 und MEL-JUSO konnte eine leichte Induktion und in COLO-849 eine deutliche Induktion nachgewiesen werden. BAX war in allen Zellen nachzuweisen. Die Melanozyten zeigten, wie TU-MM1, keine Regulation, wohingegen sich bei den übrigen Zellen eine minimale Induzierbarkeit darstellte. Für BCL2 war alleine in den Melanozyten eine Herunterregulation nachzuweisen. TU-MM 1 und IGR-37 zeigten keine Regulation. Demgegenüber wurde in TU-MM 2, SK-MEL-3 und SK-MEL-30 jeweils hochreguliert. In MEL-JUSO und COLO-849 war BCL2 überhaupt nicht nachzuweisen. Das letzte untersuchte Protein, CDK1, war wieder in allen Zellen vorhanden. Dabei zeigten nur die Melanozyten keine Regulation. Für beide Schleimhautmelanome und COLO-849 wurde eine Herabregulation nachgewiesen.

5.4 Sequenzanalyse

Um mögliche Einflüsse durch *C-KIT*-Mutationen auf das Verhalten bezüglich des p53-Signalwegs zu detektieren, wurden sämtliche Patientenproben sowie das Zellkulturmaterial auf Mutationen in den Exons 9, 11, 13 und 17 untersucht. Lediglich in einer Probe konnten *C-Kit*-Mutationen nachgewiesen werden. Bezogen auf das FFPE-Patientenkollektiv waren es 4,35 %, also deutlich unter den Literaturangaben von bis zu 25 %. Die Mutationen lagen in Exon 11 (COSM 41628) und in Exon 17 (COSM 1318). In den Zelllinien konnten ebenfalls keine *C-KIT*-Mutationen nachgewiesen werden. Somit konnten bezüglich einer Einflussnahme von *C-Kit* auf den p53-Signalweg keine Aussagen gemacht werden.

6 Diskussion

Auf Grund ihrer geringen Ansprechrate auf systemische Therapien und Bestrahlung stellen Melanome eine Tumorentität mit schlechter Prognose dar. Noch deutlich ungünstiger ist die Prognose für den Subtyp Schleimhautmelanom. Mögliche Gründe hierfür sind frühe Lokalrezidive sowie das Versagen von Chemo- bzw. Immuntherapien. Den Hauptgrund stellt möglicherweise die schlechte Operabilität dar, da eine ausreichende Resektabilität bei der anatomischen Nähe zu Augenhöhle, Schädelbasis und Gehirn in vielen Fällen nicht gewährleistet werden kann. Insbesondere beim Schleimhautmelanom ist die Prognose entscheidend vom Erreichen einer R0-Situation abhängig. Dabei ist es vor allem die Primärlokalisierung, die, abweichend von den metastasierungsfreudigen kutanen Melanomen, ausschlaggebend für das Gesamtüberleben ist (Gavriel *et al.*, 2011). In vorangegangenen Studien wurde die Störung zentraler Apoptosesignalwege als Ursache der schlechten Ansprechrate auf Therapien angesehen. Chemotherapeutika wie Cisplatin, die den Tumorsuppressor und Apoptoseinduktor p53 induzieren, erzielten keine Erfolge, obwohl eine Akkumulation von p53 bei fehlender proteinstabilisierender Mutation im Melanom gezeigt werden konnte (Li *et al.*, 2006). Cisplatin ist ein hochpotentes und gut etabliertes Chemotherapeutikum, das bei vielen soliden Tumorerkrankungen zum Einsatz kommt. Bei fast der Hälfte aller mit systemischer Chemotherapie behandelten Patienten kommt Cisplatin oder eine verwandte platinhaltige Substanz zum Einsatz (Galanski *et al.*, 2005). Abweichend dazu sind in Melanomen ausgeprägte Chemoresistenzen gegen Cisplatin beschrieben und sein Einsatz in deren Therapie dementsprechend begrenzt (Lee *et al.*, 1995). Mutationen von p53 scheiden als Ursache dafür aus, was bereits ausführlich vorbeschrieben wurde (Hartmann *et al.*, 1996). Vielmehr liegt eine konstitutionelle Akkumulation von Wildtyp-p53 sowohl in kutanen als auch in Schleimhautmelanomen vor, wie übereinstimmend in unseren Vorarbeiten (Gwosdz *et al.*, 2006) und in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Beim immunhistochemischen Vergleich der Kollektive von 16 kutanen Melanomen und 24 Schleimhautmelanomen zeigte sich häufiger eine Akkumulation in den kutanen Melanomen, was sich mit den Ergebnissen von Gwosdz *et al.* (Gwosdz *et al.*, 2006) deckt. Auf mRNA-Ebene konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kollektiven nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse allein lassen noch keinen

Rückschluss auf das Regulationsverhalten und seine möglichen Unterschiede in den verschiedenen Tumorentitäten zu. In den Stimulationsversuchen nach Cisplatinbehandlung ließ sich allerdings in beiden Tumorentitäten, außer der *knock-out*-Mutante IGR-37, eine deutliche Induzierbarkeit von p53 nachweisen. Dies deckt sich mit Literaturangaben, wonach eine p53-Induzierbarkeit nach DNA Schäden durch Bestrahlung oder Agenzien wie Cisplatin für Melanome schon mehrfach beschrieben wurde (Satyamoorthy *et al.*, 2000, Bowden *et al.*, 2010, Smith *et al.*, 1995). Das Fehlen einer Induktion von *TP53* auf mRNA-Ebene weist darauf hin, dass die Akkumulation von p53 in kutanen Melanomen und Schleimhautmelanomen weitestgehend transkriptionsunabhängig auf Proteinebene, beispielsweise durch posttranslationale Veränderungen abläuft. Einen ähnlichen Schluss ziehen Bode *et al.* (Bode & Dong, 2004) sowie unsere Vorarbeit (Knopf *et al.*, 2011) aus ihren Ergebnissen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Regulation von p53 begründet sein. Ein prominenter Vertreter, der direkt am Abbau von p53 beteiligt ist, ist MDM2. Bisher wurde nach Untersuchungen in Zelllinien kutaner Melanome eine gestörte MDM2 Funktion, die nicht auf Aberrationen beruht, als eine mögliche Ursache der p53 Akkumulation vermutet. Für mehrere solide Tumoren wurde eine Expressionserhöhung von MDM2 beschrieben (Tovar *et al.*, 2006, Ashcroft & Vousden, 1999). Auch HIPK2 ist an der Regulation von p53 entscheidend beteiligt. Physiologischerweise greift es nach Hochregulierung durch DNA-Schaden an zwei Stellen in die p53-Regulation ein. Zum einen führt es durch seine Aktivität als Serin/Threonin-Kinase zu einer stabilisierenden p53-Phosphorylierung an Ser46 (Di Stefano *et al.*, 2004, D'Orazi *et al.*, 2012). Zum anderen führt eine Erhöhung von HIPK2 indirekt zu einer Verminderung der MDM2-Proteinexpression und so zu einer Verminderung der MDM2-vermittelten Ubiquitinierung von p53 (Wang *et al.*, 2001). Die MDM2 Expression in den Patientenkollektiven zeigte ein uneinheitliches Expressionsverhalten, wohingegen HIPK2 vor allem in den Schleimhautmelanomen negative Färbungen aufwies. Daraus schlussfolgernd ist eine Überexpression von HIPK2 bzw. eine Herabregulation von MDM2 als Ursache für die Akkumulation von p53 unwahrscheinlich. Konkordant zu den Ergebnissen der Färbungen ließen sich für *HIPK2* keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression nachweisen. Nach Cisplatinbehandlung ergab sich eine Tendenz zur Repression der *HIPK2*-Transkription. In diesem Punkt scheinen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit der Literatur zu widersprechen (D'Orazi *et al.*, 2002, Hofmann *et al.*, 2002), wo eine

Expressionserhöhung von HIPK2 durch zellulären Stress beschrieben wird. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin bestehen, dass die Regulation von HIPK2 nicht auf Transkriptions- sondern auf Proteinebene stattfindet. Ein Mechanismus dafür ist die Translokation von HIPK2 ins Zytoplasma, was einer Inaktivierung entspricht (Bon *et al.*, 2009). Für *MDM2* ergab sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression im Schleimhautmelanomkollektiv. Bei konstitutiver p53-Expression ließe dies auf eine intakte, physiologische Induktion des p53-abhängigen *MDM2* schließen. Auch nach Cisplatinbehandlung zeigte sich eine Hochregulation der *MDM2*-mRNA-Expression, in den Schleimhautmelanomen im signifikanten Bereich, für Melanozyten und kutane Melanome zumindest deutliche Tendenzen. Da auch in IGR-37, der p53-*knock-out*-Mutante eine *MDM2*-Induktion stattfand, müssen auch p53-unabhängige Regulationsmechanismen in Betracht gezogen werden, wie sie von Phelps *et al.* (Phelps *et al.*, 2003) für Brustkrebszellen gezeigt wurden. Konkordant dazu waren nach Cisplatinbehandlung auch im Western blot erhöhte *MDM2*-Proteinlevel nachzuweisen. Die Induktion des direkten Zielgens *MDM2* und seiner Transkription durch p53-Erhöhung ist also, vor allem in Schleimhautmelanomen, physiologisch. Analog dazu verhält es sich mit dem bekanntesten direkten p53-Target p21. Auch hier zeigte das *CDKN1A*-Gen, welches p21 kodiert, im Vergleich der Patientenkollektive eine signifikant höhere Expression in Schleimhautmelanomen. Die physiologisch zu erwartende transkriptionelle Aktivierung im direkten *downstream* von p53 bei immunhistochemisch vermehrt vorliegendem p53 findet also zumindest im Vergleich zu kutanen Melanomen verstärkt in Schleimhautmelanomen statt. Auch im Stimulationsversuch konnte für *CDKN1A* eine signifikante Expressionssteigerung sowohl für Melanozyten als auch für beide Melanomentitäten nachgewiesen werden. Die Transkriptionsinduktion durch p53 scheint also auch in Bezug auf p21 intakt zu sein. Abgebildet werden konnten diese Ergebnisse auch im Western blot, in denen erwartungsgemäß in den Melanozyten, den Schleimhautmelanomen und einigen kutanen Melanomen eine deutliche Hochregulierung nach Cisplatinbehandlung gezeigt werden konnte. Dieses Ergebnis geht konform mit Untersuchungen von Kaufmann *et al.*, die eine Hochregulation von p21 als Folge von p53-Erhöhung nach DNA-Schaden, in dem Falle durch UV-Bestrahlung, beschrieben (Kaufmann *et al.*, 2008). Ein weiteres, direkt von p53 reguliertes Zielgen ist GADD45A. Als Stellvertreter für die DNA-Reparatur ist es ein gemeinsames Mitglied in mehreren Signalwegen. So wurden

beispielsweise Wechselwirkungen mit p21, BRCA1 (breast cancer 1, early onset), mit dem ATM/ATR-Signalweg (ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia and Rad3 related) und dem p38/MAPK-Signalweg beschrieben (Jang *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2011, Salvador *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Regulation nach Cisplatinbehandlung von *GADD45A* nachgewiesen werden, obwohl die Vorarbeit eine deutliche *GADD45A*-Expressionssteigerung zeigen konnte (Knopf *et al.*, 2011). Der Grund dafür könnten die unterschiedlich gewählten Cisplatin-Konzentrationen sein. Legt man die Daten von Urien *et al.* (Urien & Lokiec, 2004) zu Grunde, in denen sich bei täglicher Cisplatintherapie von 43 Patienten maximale Blutplasmakonzentrationen von rund 2,5 mg/l (umgerechnet 8,3 μ M) einstellten, zeigt sich, dass in der vorliegenden Arbeit, auf die therapeutische Konzentrationen bezogen, realistischere Mengen eingesetzt wurden. Natürlich ist die Übertragung von in vitro- auf in vivo-Daten oder umgekehrt problematisch, da viele für einen lebenden Organismus normale Regulationen über Zytokine, inflammatorische Faktoren, Hormone usw. nicht in der Zellkultur abgebildet werden können. Allerdings setzen viele in vitro-Untersuchungen aus klinischer Sicht zu hohe Cisplatinkonzentrationen ein (Mirmohammadsadegh *et al.*, 2007, Adjei *et al.*, 2001, Veal *et al.*, 2001). In der Folge war auch im Western blot keine *Gadd45A*-Regulation nachweisbar.

Im Vergleich der Patientenkollektive allerdings zeigte sich sowohl eine signifikant geringere *GADD45A*-mRNA-Expression in Schleimhautmelanomen, als auch ein deutliches Überwiegen von positiven Färbungen für kutane Melanome. Es ergeben sich also Hinweise, dass DNA-Reparatur eher in kutanen als in Schleimhautmelanomen stattfindet. Zumindest konnte in Untersuchungen von Maeda *et al.* gezeigt werden, dass eine funktionierende DNA-Reparatur in Keratinozyten nicht ohne *GADD45A* Expression stattfinden konnte (Maeda *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu scheint der führende Mechanismus in Schleimhautmelanomen bei p53-Akkumulation der Zellzyklusstopp zu sein. Hinweise darauf liefert das Verhalten von *CDC2* bzw. seinem Genprodukt CDK1. Die aktivierte Form von CDK1 ist ein phosphorylierter Komplex mit Cyclin A bzw. B und als solcher essentiell für die Zellzyklusprogression von G1- zur S- sowie G2- zur M-Phase (Satyanarayana & Kaldis, 2009). Es wurde beschrieben, dass p53 die Transkription von *CDC2* hemmen kann und so auch über diesen Mechanismus zum Zellzyklusarrest führt (Yun *et al.*, 1999). Dazu konkordant konnte in der Immunhistochemie der beiden Patientenkollektive ein hoher Anteil an negativen Färbungen in

Schleimhautmelanomen nachgewiesen werden. In den kutanen Melanomen hingegen wurde nur rund ein Drittel negativer Färbungen detektiert. Viele weitere CDK1-reprimierende Interaktionen, unter anderem mit GADD45A (Dissoziation des CDK1/CyklinB-Komplexes) und p21 (direkte Inhibition von CDK1) sind in der Literatur beschrieben (Fayolle *et al.*, 2006). In wie weit diese eine Rolle im vorliegenden Patientenkollektiv spielen, muss weiter untersucht werden. Abdullah *et al.* konnten als mögliche Ursache des vorangetriebenen Zellzyklus zeigen, dass Melanome gehäuft CDK1 exprimieren (Abdullah *et al.*, 2011). Abweichend davon scheinen die Schleimhautmelanome in diesem Signalweg mehr zum Zellzyklusstopp, also der physiologischen Regulation, zu tendieren. Allerdings fiel bei der Untersuchung von *CDC2* in den Patientenkollektiven auf, dass eine fast identische mRNA-Expression in beiden Gruppen vorlag. Das Ergebnis bezüglich der CDK1 Expression kann hier also nicht durch Unterschiede auf Transkriptionsebene erklärt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Cisplatinbehandlung in Schleimhautmelanomen eine signifikante Abnahme der *CDC2*-Expression, wohingegen für kutane Melanome und auch für Melanozyten keine Regulationstendenz nachzuweisen war. Die Proteinebene verhielt sich konkordant dazu. Für Melanozyten war keine Regulation, für kutane Melanome mit Ausnahme von COLO-849 sogar eine Hochregulation von CDK1 nachweisbar. Aus den bisherigen Experimenten konnten, obwohl sie in weiten Teilen durchaus den zu erwartenden Regulationen entsprachen, keine hinreichenden Gründe für eine konstitutionelle p53-Expression durch aberrante p53-Regulation gefunden werden. Deshalb müssen weitere Signalwege als mögliche Ursache herangezogen werden. Ein möglicher Kandidat hierfür ist ATM mit seinem nahen Verwandten ATR. Diese Proteine sind Mitglieder der PIKK (Phosphoinositide-3-kinase-related kinase)-Familie und werden nach DNA-Schaden aktiviert (Abraham, 2001). Durch Phosphorylierung an Serin 15, die wiederum weitere posttranslationale Veränderungen auslöst, sind sie in der Lage, p53 zu stabilisieren, indem eine Dissoziation von MDM2 - mit der Konsequenz des verminderten Abbaus - stattfindet (Freedman *et al.*, 1999, Dumaz *et al.*, 1999, Chao *et al.*, 2006). Der gleiche Mechanismus wird durch ATM/ATR-vermittelte Aktivierung von CHK2 (CHEK2, checkpoint kinase 2) bedient, das seinerseits wiederum p53 an Serin 20 phosphoryliert und damit direkt zur Dissoziation des p53-MDM2-Komplexes führt (Chehab *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (MDM2-Induktion ohne Abfall, sogar mit Zunahme der p53-Konzentration) könnte beispielsweise in einer

konstitutiven ATM/ATR-Aktivität begründet sein. CHK2 hat zusammen mit dem ebenfalls durch ATM/ATR aktivierten CHK1 (CHEK1, checkpoint kinase 1) auch bei der Regulation von CDK1 via CDC25 (cell division cycle 25C) eine entscheidende Rolle. Sie besitzen nämlich als Kinasen die Fähigkeit, CDC25 zu phosphorylieren und damit für seinen Transport aus dem Zellkern über die Bindung an 14-3-3-Proteine zu sorgen. Damit ist eine CDC25-abhängige Dephosphorylierung an Tyrosin 15 und Threonin 14 von CDK1, was einer Aktivierung am Anfang der Mitose entspricht, nicht mehr möglich. Im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus kann CDC25 wiederum über den CDK1/CyklinB-Komplex phosphoryliert und damit aktiviert werden (Taylor & Stark, 2001). Die weiteren Interaktionsmechanismen mit anderen Signalwegen sind schier unermesslich verzweigt. In der vorliegenden Arbeit wurden als Effektor-Signalwege von p53 Teile der mitochondrialen Apoptose näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Regulationen, je weiter sie im *downstream* entfernt von p53 liegen, mehr und mehr uneinheitlich werden. Während unmittelbare p53 Zielgene wie MDM2, PUMA und GADD45A in der Immunhistochemie nachweisbar waren, fielen die Ergebnisse für den Verlauf der durch p53 getriggerten Apoptose bei sukzessive zusätzlich interferierenden Signalwegen weniger greifbar aus. Interessanterweise unterschieden sich die kutanen Melanome von den Schleimhautmelanomen durch einen deutlich höheren Anteil BAX positiver Zellen. Jedoch ist eine Erhöhung für den Zelltod nicht ausreichend, es muss noch die Aktivierung von BAX durch Interaktion mit BID (BH3 interacting domain death agonist), BIM (BCL2L11, BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)) und weiteren Bestandteilen der äußeren Mitochondrienwand stattfinden, die dann zur Oligomerisierung von BAX, Porenbildung und Cytochrom C-Freisetzung führt (Kuwana *et al.*, 2002). Dieser Prozess kann durch antiapoptotische Mitglieder der BCL2-Familie verhindert werden (Anvekar *et al.*, 2011). Apoptoseinhibitoren wie BCL2 oder BCL2A1 sollten erwartungsgemäß in Tumorzellen zum Selbsterhalt hochreguliert sein (Anvekar *et al.*, 2011). Die immunhistochemische Färbung dieser Proteine fiel ähnlich wie die der Apoptoseinduktoren negativ aus. Überraschend ist dieser Umstand nicht, da ein Fehlen proapoptotischer Faktoren eine antiapoptotische Gegenregulation unnötig macht. Analog zu BAX ist der größere Anteil BCL2A1 positiver Fälle in den kutanen Melanomen im Vergleich zu den Schleimhautmelanomen auffällig. Man sieht hier, dass das Apoptosesignal zwar im Bereich des mitochondrialen Apoptosesignalwegs

terminiert, aber nicht seine funktionelle Endstrecke erreicht (Anvekar *et al.*, 2012). Im weiteren Signalweg initiiert die Cytochrom C- Freisetzung ins Cytoplasma die Caspasekaskade und führt zur Apoptose. In der vorliegenden Arbeit konnte immunhistochemisch in beiden Gruppen kaum Caspase 9 nachgewiesen werden, was entsprechend der proliferationserhöhten Eigenschaft eines malignen Tumors nahelegt, dass die Apoptose nicht eintritt. Die Apoptoseinduktion auf Ebene von p53 und PUMA scheint in Schleimhautmelanom grundsätzlich physiologisch intakt zu sein, verliert sich jedoch auf das Niveau der kutanen Melanome bei der Aktivierung direkter Apoptoseinduktoren, sprich den Caspasen. Analog dazu zeigte sich in den Regulationen der Apoptose über die BCL2-Familie, wie schon in den immunhistochemischen Untersuchungen auch in der PCR ein heterogenes Bild zwischen kutanen und Schleimhautmelanomen. Für *PUMA*, *BCL2A1* und *Caspase 9* konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede nachgewiesen werden. Dies entspricht dem Ergebnis der Immunhistochemie, die für die entsprechenden Proteine auch keine nennenswerten Unterschiede detektieren konnte. Nur das proapoptotische *BAX* zeigte wie das antiapoptotische *BCL2* jeweils eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in den Schleimhautmelanomen. Ein Überwiegen von Überlebens- oder Apoptosesignalen konnte im p53-induzierten Teil nicht nachgewiesen werden. Ob allerdings bei so komplexen Feinabstimmungen innerhalb der BCL2-Familie eine wirksame transkriptionelle Regulation ausschlaggebend ist, oder ob die entscheidenden Interaktionen vermehrt auf Proteinebene liegen, z.B. Komplexbildung, und welche Signale sich durchsetzen, muss in weiteren Untersuchungen wie Apoptoseassays überprüft werden. Unter stimulierten Bedingungen nach Cisplatinbehandlung bleibt das Bild ähnlich uneinheitlich. Unter den Mitgliedern der BCL2-Familie konnten auf mRNA-Ebene keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden. Dabei zeigte sich allerdings in allen drei Zellentitäten eine Tendenz zur Hochregulation der proapoptotischen Faktoren (*PUMA* und *BAX*) nach Cisplatinbehandlung wohingegen *BCL2A1* tendenziell herabreguliert wurde. Bei diesem Regulationsschema würde man den Eintritt in den programmierten Zelltod erwarten. Doch ein weiteres Mal war für *Caspase 9* keine Expressionszunahme nachweisbar. Die Proteinebene stützte dieses Ergebnis teilweise, eine Zunahme von *PUMA* war zumindest für die kutanen Melanomzelllinien ableitbar. Auch für *BAX* ließ sich eine ähnliche Regulation nachweisen, allerdings nicht auf signifikantem Niveau. Die Antiapoptose vertreten durch *BCL2A1* ließ auf Proteinebene keine Induktion bzw.

Repression erkennen. Zusammengefasst würde man also einen Übergang der Zellen (v.a. der kutanen Melanome, die als einzige eine Regulation der BCL2-Familie auf Proteinebene zeigten) in die Apoptose erwarten. In wie fern die Apoptosemechanismen tatsächlich greifen und ein Absterben von Zellen auslösen, bleibt unklar. Beispielsweise ist das Vorhandensein von BID und BIM wichtig für die Aktivierung von BAX, sprich allein eine Hochregulierung von BAX, selbst wenn eine erhöhte Proteinkonzentration im Plasma erreicht wird, benötigt noch die Aktivierung auf Proteinebene um tatsächlich zur Freisetzung von Cytochrom C zu führen (Chipuk *et al.*, 2008, Letai, 2008). Für Melanome wurde die Fähigkeit, BID und BIM zu blockieren, als antiapoptotischer Mechanismus gegen Chemotherapeutika beschrieben (Hocker *et al.*, 2008). Diese beiden Mitglieder der BCL2-Familie stellen beispielsweise ein Bindeglied zum PI3K-AKT-Signalweg dar, da sie unter anderem neben MDM2 und p21 durch AKT3 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3) phosphoryliert werden können (Madhunapantula *et al.*, 2011). Die Verflechtungen und Interaktionsmöglichkeiten in diesem Bereich sind vielschichtig und bedürfen weiterer Klärung.

Zusammenfassend gesehen sind also Teile (v.a. direkte Zielgene von p53) der p53-abhängigen Regulationen von Apoptose und Zellzyklusregulation in Melanomen noch intakt. Es ergab sich kein Nachweis einer grundsätzlich aggressiveren Regulationsstruktur im Vergleich zu kutanen Melanomen, im Gegenteil: Oft zeigten Schleimhautmelanome in Bezug auf den p53- Signalweg die physiologischeren Mechanismen. Warum trotzdem ein Tumorprogress stattfindet kann in anderen Signalwegen begründet sein, die in der Zukunft untersucht werden müssen. Zudem wären klinische Studien, z.B. mit Fokus auf Resektabilität, Diagnosestadium und allgemeinem Gesundheitszustand der Patienten zur weiteren Einschätzung der Tumorentität Schleimhautmelanom hilfreich.

7 Zusammenfassung

Das Melanom stellt eine Tumorentität mit ausgesprochen schlechter Prognose dar. Die Untergruppe Schleimhautmelanom übertrifft klinisch dabei das aggressive Verhalten der anderen Melanomsotypen noch. Die vorliegende Arbeit verglich Schleimhaut- und kutane Melanome des Kopf-Hals-Bereichs hinsichtlich Faktoren des p53-Signalwegs, um zu überprüfen, welche Melanomentität aus molekularbiologischer Sicht die aggressivere ist. Dazu wurden Patientenproben von Melanompatienten auf mRNA- und Proteinebene verglichen. Außerdem wurde *in vitro* die Induzierbarkeit von p53 und seinen Zielgenen durch Cisplatin in Melanozyten, Schleimhaut- und kutanen Melanomzellen ebenfalls sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene untersucht. Die Ergebnisse wiesen zum einen darauf hin, dass Cisplatin in allen Zellen zu einer Induktion von p53 sowie seiner direkten Zielgene führt, allerdings im weiteren *downstream* die Regulationsmechanismen diffuser werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Schleimhautmelanome im Vergleich zu kutanen Melanomen häufig ein physiologischeres Profil des p53-Signalwegs zeigen und sie in ihren Regulationen den Melanozyten ähnlicher sind als die kutanen Melanome. Ein biologisch aggressiveres Verhalten als kutane Melanome konnte also zumindest für den p53-Signalweg nicht nachgewiesen werden. Weitere Studien hinsichtlich anderer Signalwege bzw. klinischer Gründe für die schlechtere Prognose von Schleimhautmelanomen für das bessere Verständnis dieser Tumorentität werden benötigt.

8 Danksagung

Ich danke PD Dr. med. Andreas Knopf für die Überlassung der Doktorarbeit vor allem aber für seine Betreuung, Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt die Vorarbeiten aus Düsseldorf als Grundlage, die mir die Anfertigung der vorliegenden Arbeit erst ermöglicht haben.

Desweiteren möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr.med. Henning Bier bedanken, der sein Labor mit den entsprechenden Reagenzien zur Verfügung stellte.

Vielen Dank auch an Marie Kristin Fritsche für die fruchtbaren Gespräche und die zahlreichen Korrekturversionen meiner Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an Guido Piontek und Peter Strzelczyk, die mir mit ihrer Erfahrung, ihrem Engagement und ihrer Geduld jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe: PD Dr. med. Anja Pickhard, Dr. med. Carolin Beck, Dr. med. Carlotta Schiefler, Dr. med. Isabelle Ayx, Dr. med. Anna Haug, Johannes Döscher, Christian Jacobi, Michael Siegl, Lena Gebel, Dominik Schüttler, Alexander Baumann und den nachfolgenden Doktoranden möchte ich mich für die aufmunternden Worte, gemeinsamen Pausen und vor allem die vielen Stunden außerhalb des Labors aufs Herzlichste bedanken.

Ein weiterer wichtiger Unterstützer war meine Familie, der ich auf diesem Wege danken möchte.

9 Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentuale Aufteilung der histologischen Subtypen des Malignen Melanoms nach Garbe <i>et al.</i> (Garbe <i>et al.</i> , 1995).....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus, Zusammenfassung des Kapitels 1.6.....	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Färbereaktion	25
Abbildung 4: Die Genexpression verschiedener p53-Regulatoren bzw. von p53 regulierter Gene ist im Vergleich von MuM zu MM alteriert. Dargestellt ist die x-fache Über-/Herabregulation der auf GAPDH normalisierten Werte in Schleimhautmelanomen verglichen mit kutanen Melanomen.....	37
Abbildung 5: Übersicht zur p53-Immunhistologie, es zeigt sich eine Anfärbbarkeit für beide Melanomgruppen. Dabei Überwiegen die positiven Färbungen für kutane Melanome deutlich.	38
Abbildung 6: Keine wegweisenden Unterschiede in der MDM2-Immunhistologie	39
Abbildung 7: Übersicht zur HIPK2-Immunhistologie	40
Abbildung 8: Die p21-Immunhistologie zeigt kaum Unterschiede zwischen den Melanomentitäten bei hauptsächlich negativen Färbeergebnissen.	41
Abbildung 9: In der GADD45A-Immunhistologie zeigen alle kutanen Melanome eine Färbung, Schleimhautmelanome bleiben in über einem Drittel der Fälle ungefärbt.	42
Abbildung 10: Auch in der PUMA-Immunhistologie ist ein deutliches Überwiegen von positiven Färbungen in kutanen Melanomen nachweisbar.	43
Abbildung 11: Insgesamt hauptsächlich negative Ergebnisse in der BAX-Immunhistologie, mit einem deutlichen Überwiegen der Schleimhautmelanome	44
Abbildung 12: Casp9-Immunhistologie ist fast ausschließlich negativ	45
Abbildung 13: Für beide Melanomentitäten zeigt die BCL2-Immunhistologie hauptsächlich negative Färbungen.....	46
Abbildung 14: Uneinheitliches Ergebnis der BCL2A1-Immunhistologie mit mehr positiven Färbungen auf Seiten der kutanen Melanome	47
Abbildung 15: Es zeigt sich ein deutliches Überwiegen von positiven CDC2-Immunhistologien in kutanen Melanomen	48
Abbildung 16: Ähnliches, allerdings wenig aussagekräftiges C-Kit-Immunhistologieergebnis in beiden Melanomentitäten.....	49

Abbildung 17: Die Grafik zeigt die relative Expression verschiedener Gene der mit 8µM Cisplatin für 24h behandelten Zellen im Vergleich zur Expression des Gens in unstimulierten Melanozyten. Ab 2,5-fachem Expressionsunterschied ist von signifikanten Veränderungen auszugehen, ab 2,0-fachem Expressionsunterschied wird in der vorliegenden Arbeit von Tendenzen gesprochen..... 51

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Entwicklung der Erkrankungs- und Sterbefälle des Malignen Melanoms in Deutschland von 1999 bis 2008 (Krebsregisterdaten des Bundeskrebsregister für das Maligne Melanom, 2010): Es zeigt sich eine steigende Erkrankungsrate bei weitgehend gleichbleibender Sterberate für beide Geschlechter.....	2
Tabelle 2: Stadieneinteilung des Malignen Melanoms (Balch <i>et al.</i> , 2001).....	5
Tabelle 3: Stadieneinteilung des Schleimhautmelanoms (Sobin & Compton, 2010)	6
Tabelle 4: Nachsorgeschema für Melanompatienten (Pflugfelder <i>et al.</i> , 2013)	9
Tabelle 5: Verwendete Geräte.....	17
Tabelle 6: Verwendete Software.....	17
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 8:Verwendete Chemikalien und Reagenzien	19
Tabelle 9: Verwendete Zellkultur-Reagenzien	19
Tabelle 10: Für Immunhistochemie verwendete Antikörper.....	20
Tabelle 11: Für Western blot verwendete Primärantikörper.....	20
Tabelle 12: Verwendete Inhibitoren	21
Tabelle 13: Für Western blot verwendete Sekundärantikörper.....	21
Tabelle 14: Verwendete Real-time-PCR-Primer.....	21
Tabelle 15: Verwendete C-KIT-Primer.....	22
Tabelle 16: Verwendete Assays, Kits, sonstige Reagenzien	22
Tabelle 17: Verwendete Zelllinien bzw. Primärkulturen	27
Tabelle 18: Plattenbelegung der Customer Plates	30
Tabelle 19: Übersicht über die Zusammensetzung der Gele.....	32
Tabelle 20: Die Zellen wurden für 24 h mit 8µM Cisplatin behandelt. Eine deutliche p53 Induzierbarkeit mit konsekutiver Hochregulation der klassischen	

p53 targets p21 und MDM2 ist zu sehen. Das Verhalten im weiteren
downstream des p53-Signalweges ist uneinheitlich. 52

9.3 Literaturverzeichnis

- Abdullah, C., Wang, X. & Becker, D. (2011). "Expression analysis and molecular targeting of cyclin-dependent kinases in advanced melanoma." *Cell Cycle* **10**, 977-988.
- Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." *Genes & development* **15**, 2177-2196.
- Adjei, A. A., Davis, J. N., Bruzek, L. M., Erlichman, C. & Kaufmann, S. H. (2001). "Synergy of the protein farnesyltransferase inhibitor SCH66336 and cisplatin in human cancer cell lines." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**, 1438-1445.
- Allen, A. C. & Spitz, S. (1953). "Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis." *Cancer* **6**, 1-45.
- Anvekar, R. A., Asciolla, J. J., Lopez-Rivera, E., Floros, K. V., Izadmehr, S., Elkholi, R., Belbin, G., Sikora, A. G. & Chipuk, J. E. (2012). "Sensitization to the mitochondrial pathway of apoptosis augments melanoma tumor cell responses to conventional chemotherapeutic regimens." *Cell death & disease* **3**, e420.
- Anvekar, R. A., Asciolla, J. J., Missert, D. J. & Chipuk, J. E. (2011). "Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment." *Frontiers in oncology* **1**.
- Armstrong, B. K. & Kricger, A. (1994). "Cutaneous melanoma." *Cancer surveys* **19-20**, 219-240.
- Ashcroft, M. & Vousden, K. H. (1999). "Regulation of p53 stability." *Oncogene* **18**, 7637-7643.
- Autier, P., Dore, J. F., Eggermont, A. M. & Coebergh, J. W. (2011). "Epidemiological evidence that UVA radiation is involved in the genesis of cutaneous melanoma." *Current opinion in oncology* **23**, 189-196.
- AWMF (Version 09/2007). Leitlinie Malignes Melanom 2010.
- Bachar, G., Loh, K. S., O'Sullivan, B., Goldstein, D., Wood, S., Brown, D. & Irish, J. (2008). "Mucosal melanomas of the head and neck: experience of the Princess Margaret Hospital." *Head & neck* **30**, 1325-1331.
- Balch, C. M., Buzaid, A. C., Soong, S. J., Atkins, M. B., Cascinelli, N., Coit, D. G., Fleming, I. D., Gershenwald, J. E., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J. M., McMasters, K. M., Mihm, M. F., Morton, D. L., Reintgen, D. S., Ross, M. I., Sober, A., Thompson, J. A. & Thompson, J. F. (2001). "Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **19**, 3635-3648.
- Bataille, V. (2000). "Genetics of familial and sporadic melanoma." *Clinical and experimental dermatology* **25**, 464-470.
- Bataille, V. (2003). "Genetic epidemiology of melanoma." *Eur J Cancer* **39**, 1341-1347.
- Batsakis, J. G., Regezi, J. A., Solomon, A. R. & Rice, D. H. (1982). "The pathology of head and neck tumors: mucosal melanomas, part 13." *Head & neck surgery* **4**, 404-418.

- Bentzen, S. M., Overgaard, J., Thames, H. D., Overgaard, M., Vejby Hansen, P., von der Maase, H. & Meder, J. (1989). "Clinical radiobiology of malignant melanoma." *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **16**, 169-182.
- Bergmann, A. (2002). "Survival signaling goes BAD." *Developmental cell* **3**, 607-608.
- Beroud, C. & Soussi, T. (1998). "p53 gene mutation: software and database." *Nucleic acids research* **26**, 200-204.
- Bode, A. M. & Dong, Z. (2004). "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis." *Nature reviews. Cancer* **4**, 793-805.
- Bon, G., Di Carlo, S. E., Folgiero, V., Avetrani, P., Lazzari, C., D'Orazi, G., Brizzi, M. F., Sacchi, A., Soddu, S., Blandino, G., Mottolose, M. & Falcioni, R. (2009). "Negative regulation of beta4 integrin transcription by homeodomain-interacting protein kinase 2 and p53 impairs tumor progression." *Cancer research* **69**, 5978-5986.
- Bowden, N. A., Ashton, K. A., Avery-Kiejda, K. A., Zhang, X. D., Hersey, P. & Scott, R. J. (2010). "Nucleotide excision repair gene expression after Cisplatin treatment in melanoma." *Cancer research* **70**, 7918-7926.
- Brochez, L. & Naeyaert, J. M. (2000). "Understanding the trends in melanoma incidence and mortality: where do we stand?" *European journal of dermatology : EJD* **10**, 71-75; quiz 76.
- Burlacu, A. (2003). "Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins." *Journal of cellular and molecular medicine* **7**, 249-257.
- Burton, R. C., Coates, M. S., Hersey, P., Roberts, G., Chetty, M. P., Chen, S., Hayes, M. H., Howe, C. G. & Armstrong, B. K. (1993). "An analysis of a melanoma epidemic." *International journal of cancer. Journal international du cancer* **55**, 765-770.
- Carvajal, R. D., Antonescu, C. R., Wolchok, J. D., Chapman, P. B., Roman, R. A., Teitcher, J., Panageas, K. S., Busam, K. J., Chmielowski, B., Lutzky, J., Pavlick, A. C., Fusco, A., Cane, L., Takebe, N., Vemula, S., Bouvier, N., Bastian, B. C. & Schwartz, G. K. (2011). "KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma." *JAMA : the journal of the American Medical Association* **305**, 2327-2334.
- Chang, A. E., Karnell, L. H. & Menck, H. R. (1998). "The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade." *Cancer* **83**, 1664-1678.
- Chang, L. & Karin, M. (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* **410**, 37-40.
- Chao, C., Herr, D., Chun, J. & Xu, Y. (2006). "Ser18 and 23 phosphorylation is required for p53-dependent apoptosis and tumor suppression." *The EMBO journal* **25**, 2615-2622.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M. & Halazonetis, T. D. (2000). "Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53." *Genes & development* **14**, 278-288.
- Chen, Y. J., Wu, C. Y., Chen, J. T., Shen, J. L., Chen, C. C. & Wang, H. C. (1999). "Clinicopathologic analysis of malignant melanoma in Taiwan." *Journal of the American Academy of Dermatology* **41**, 945-949.
- Chipuk, J. E., Fisher, J. C., Dillon, C. P., Kriwacki, R. W., Kuwana, T. & Green, D. R. (2008). "Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20327-20332.

- Cohen, L. M. (1995). "Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma." *Journal of the American Academy of Dermatology* **33**, 923-936; quiz 937-940.
- Curtin, J. A., Busam, K., Pinkel, D. & Bastian, B. C. (2006). "Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**, 4340-4346.
- 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. (2002). "Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis." *Nature cell biology* **4**, 11-19.
- D'Orazi, G., Rinaldo, C. & Soddu, S. (2012). "Updates on HIPK2: a resourceful oncosuppressor for clearing cancer." *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **31**, 63.
- Demitsu, T., Nagato, H., Nishimaki, K., Okada, O., Kubota, T., Yoneda, K. & Manabe, M. (2000). "Melanoma in situ of the penis." *Journal of the American Academy of Dermatology* **42**, 386-388.
- Dennis, L. K., Vanbeek, M. J., Beane Freeman, L. E., Smith, B. J., Dawson, D. V. & Coughlin, J. A. (2008). "Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter?" *Annals of epidemiology* **18**, 614-627.
- Di Stefano, V., Blandino, G., Sacchi, A., Soddu, S. & D'Orazi, G. (2004). "HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function." *Oncogene* **23**, 5185-5192.
- Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J. & Reed, S. I. (1994). "p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest." *Cell* **76**, 1013-1023.
- Dumaz, N., Milne, D. M. & Meek, D. W. (1999). "Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15." *FEBS letters* **463**, 312-316.
- el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y. & et al. (1994). "WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis." *Cancer research* **54**, 1169-1174.
- 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. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* **75**, 817-825.
- Elwood, J. M. & Jopson, J. (1997). "Melanoma and sun exposure: an overview of published studies." *International journal of cancer. Journal international du cancer* **73**, 198-203.
- Fayolle, C., Pourchet, J., Cohen, A., Pedoux, R., Puisieux, A., Caron de Fromentel, C., Dore, J. F. & Voeltzel, T. (2006). "UVB-induced G2 arrest of human melanocytes involves Cdc2 sequestration by Gadd45a in nuclear speckles." *Cell Cycle* **5**, 1859-1864.
- Fornace, A. J., Jr., Jackman, J., Hollander, M. C., Hoffman-Liebermann, B. & Liebermann, D. A. (1992). "Genotoxic-stress-response genes and growth-arrest genes. gadd, MyD, and other genes induced by treatments eliciting growth arrest." *Annals of the New York Academy of Sciences* **663**, 139-153.
- Freedman, D. A., Wu, L. & Levine, A. J. (1999). "Functions of the MDM2 oncoprotein." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **55**, 96-107.

- Fritsche, M. K., Metzler, V., Becker, K., Plettenberg, C., Heiser, C., Hofauer, B. & Knopf, A. (2015). "Cisplatin fails to induce puma mediated apoptosis in mucosal melanomas." *Oncotarget*.
- Galanski, M., Jakupec, M. A. & Keppler, B. K. (2005). "Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches." *Current medicinal chemistry* **12**, 2075-2094.
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M. S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P. & Melchi, C. F. (2005). "Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure." *Eur J Cancer* **41**, 45-60.
- Garbe, C. & Blum, A. (2001). "Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide." *Skin pharmacology and applied skin physiology* **14**, 280-290.
- Garbe, C., Buttner, P., Ellwanger, U., Brocker, E. B., Jung, E. G., Orfanos, C. E., Rassner, G. & Wolff, H. H. (1995). "[The Malignant Melanoma Central Register of the German Society of Dermatology 1983-1993. Epidemiologic developments and current therapeutic management of malignant melanoma of the skin]" *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **46**, 683-692.
- Garbe, C. & Leiter, U. (2009). "Melanoma epidemiology and trends." *Clinics in dermatology* **27**, 3-9.
- Garbe, C. & Orfanos, C. E. (1992). "Epidemiology of malignant melanoma in central Europe: risk factors and prognostic predictors. Results of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society." *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **Suppl 2**, 285-294.
- Gavriel, H., McArthur, G., Sizeland, A. & Henderson, M. (2011). "Review: mucosal melanoma of the head and neck." *Melanoma research* **21**, 257-266.
- Gilligan, D. & Slevin, N. J. (1991). "Radical radiotherapy for 28 cases of mucosal melanoma in the nasal cavity and sinuses." *The British journal of radiology* **64**, 1147-1150.
- Graeber, T. G., Peterson, J. F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A. J., Jr. & Giaccia, A. J. (1994). "Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status." *Molecular and cellular biology* **14**, 6264-6277.
- Guo, J., Si, L., Kong, Y., Flaherty, K. T., Xu, X., Zhu, Y., Corless, C. L., Li, L., Li, H., Sheng, X., Cui, C., Chi, Z., Li, S., Han, M., Mao, L., Lin, X., Du, N., Zhang, X., Li, J., Wang, B. & Qin, S. (2011). "Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 2904-2909.
- Gwosdz, C., Scheckenbach, K., Lieven, O., Reifemberger, J., Knopf, A., Bier, H. & Balz, V. (2006). "Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas." *International journal of cancer. Journal international du cancer* **118**, 577-582.
- Hainaut, P. & Milner, J. (1993). "Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro." *Cancer research* **53**, 4469-4473.
- 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. (1996). "Overexpression and mutations of p53 in metastatic malignant melanomas." *International journal of cancer. Journal international du cancer* **67**, 313-317.

- Hinds, P. W., Mitnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I. & Weinberg, R. A. (1992). "Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins." *Cell* **70**, 993-1006.
- Hocker, T. L., Singh, M. K. & Tsao, H. (2008). "Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside." *The Journal of investigative dermatology* **128**, 2575-2595.
- Hofmann, T. G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H. & Schmitz, M. L. (2002). "Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2." *Nature cell biology* **4**, 1-10.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. (1991). "p53 mutations in human cancers." *Science* **253**, 49-53.
- Holmstrom, M. & Lund, V. J. (1991). "Malignant melanomas of the nasal cavity after occupational exposure to formaldehyde." *British journal of industrial medicine* **48**, 9-11.
- Honda, R. & Yasuda, H. (1999). "Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53." *The EMBO journal* **18**, 22-27.
- Hormia, M. & Vuori, E. E. (1969). "Mucosal melanomas of the head and neck." *The Journal of laryngology and otology* **83**, 349-359.
- Jahn, T., Seipel, P., Urschel, S., Peschel, C. & Duyster, J. (2002). "Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt." *Molecular and cellular biology* **22**, 979-991.
- Jang, E. R., Choi, J. D., Park, M. A., Jeong, G., Cho, H. & Lee, J. S. (2010). "ATM modulates transcription in response to histone deacetylase inhibition as part of its DNA damage response." *Experimental & molecular medicine* **42**, 195-204.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. (2010). "Cancer statistics, 2010." *CA: a cancer journal for clinicians* **60**, 277-300.
- Kamb, A. (1995). "Cell-cycle regulators and cancer." *Trends in genetics : TIG* **11**, 136-140.
- Kaufmann, W. K., Nevis, K. R., Qu, P., Ibrahim, J. G., Zhou, T., Zhou, Y., Simpson, D. A., Helms-Deaton, J., Cordeiro-Stone, M., Moore, D. T., Thomas, N. E., Hao, H., Liu, Z., Shields, J. M., Scott, G. A. & Sharpless, N. E. (2008). "Defective cell cycle checkpoint functions in melanoma are associated with altered patterns of gene expression." *The Journal of investigative dermatology* **128**, 175-187.
- Knopf, A., Plettenberg, C., Pickhard, A., Bas, M., Reifemberger, J., Bier, H. & Balz, V. (2011). "Analysis of the functional integrity of the p53 tumor-suppressor gene in malignant melanoma." *Melanoma research* **21**, 380-388.
- Krebsregisterdaten des Bundeskrebsregister für das Maligne Melanom (2010). edited by Z. f. K. d. R. K. Instituts.
- Krengli, M., Masini, L., Kaanders, J. H., Maingon, P., Oei, S. B., Zouhair, A., Ozyar, E., Roelandts, M., Amichetti, M., Bosset, M. & Mirimanoff, R. O. (2006). "Radiotherapy in the treatment of mucosal melanoma of the upper aerodigestive tract: analysis of 74 cases. A Rare Cancer Network study." *International journal of radiation oncology, biology, physics* **65**, 751-759.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D. R. & Newmeyer, D. D. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." *Cell* **111**, 331-342.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**, 680-685.

- Langley, R. G. & Sober, A. J. (1997). "A clinical review of the evidence for the role of ultraviolet radiation in the etiology of cutaneous melanoma." *Cancer investigation* **15**, 561-567.
- Lassam, N. J., From, L. & Kahn, H. J. (1993). "Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma." *Cancer research* **53**, 2235-2238.
- Lee, S. M., Betticher, D. C. & Thatcher, N. (1995). "Melanoma: chemotherapy." *British medical bulletin* **51**, 609-630.
- Lee, S. P., Shimizu, K. T., Tran, L. M., Juillard, G. & Calcaterra, T. C. (1994). "Mucosal melanoma of the head and neck: the impact of local control on survival." *The Laryngoscope* **104**, 121-126.
- Lee, Y. H., Bedford, M. T. & Stallcup, M. R. (2011). "Regulated recruitment of tumor suppressor BRCA1 to the p21 gene by coactivator methylation." *Genes & development* **25**, 176-188.
- Lehmann, A. R., McGibbon, D. & Stefanini, M. (2011). "Xeroderma pigmentosum." *Orphanet journal of rare diseases* **6**, 70.
- Letai, A. G. (2008). "Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis." *Nature reviews. Cancer* **8**, 121-132.
- Li, W., Sanki, A., Karim, R. Z., Thompson, J. F., Soon Lee, C., Zhuang, L., McCarthy, S. W. & Scolyer, R. A. (2006). "The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma." *Pathology* **38**, 287-301.
- Liang, X., Wisniewski, D., Strife, A., Shivakrupa, Clarkson, B. & Resh, M. D. (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase and Src family kinases are required for phosphorylation and membrane recruitment of Dok-1 in c-Kit signaling." *The Journal of biological chemistry* **277**, 13732-13738.
- Linke, S. P., Clarkin, K. C., Di Leonardo, A., Tsou, A. & Wahl, G. M. (1996). "A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage." *Genes & development* **10**, 934-947.
- Madhunapantula, S. V., Mosca, P. J. & Robertson, G. P. (2011). "The Akt signaling pathway: an emerging therapeutic target in malignant melanoma." *Cancer biology & therapy* **12**, 1032-1049.
- Maeda, T., Hanna, A. N., Sim, A. B., Chua, P. P., Chong, M. T. & Tron, V. A. (2002). "GADD45 regulates G2/M arrest, DNA repair, and cell death in keratinocytes following ultraviolet exposure." *The Journal of investigative dermatology* **119**, 22-26.
- Maltzman, W. & Czyzyk, L. (1984). "UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells." *Molecular and cellular biology* **4**, 1689-1694.
- Manolidis, S. & Donald, P. J. (1997). "Malignant mucosal melanoma of the head and neck: review of the literature and report of 14 patients." *Cancer* **80**, 1373-1386.
- McGregor, J. M., Yu, C. C., Dublin, E. A., Barnes, D. M., Levison, D. A. & MacDonald, D. M. (1993). "p53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic naevi." *The British journal of dermatology* **128**, 606-611.
- McIntyre, A., Summersgill, B., Grygalewicz, B., Gillis, A. J., Stoop, J., van Gurp, R. J., Dennis, N., Fisher, C., Huddart, R., Cooper, C., Clark, J., Oosterhuis, J. W., Looijenga, L. H. & Shipley, J. (2005). "Amplification and overexpression of the KIT gene is associated with progression in the seminoma subtype of testicular germ cell tumors of adolescents and adults." *Cancer research* **65**, 8085-8089.
- Minamiguchi, H., Kimura, T., Urata, Y., Miyazaki, H., Bamba, T., Abe, T. & Sonoda, Y. (2001). "Simultaneous signalling through c-mpl, c-kit and CXCR4 enhances

- the proliferation and differentiation of human megakaryocyte progenitors: possible roles of the PI3-K, PKC and MAPK pathways." *British journal of haematology* **115**, 175-185.
- Mirmohammadsadegh, A., Mota, R., Gustrau, A., Hassan, M., Nambiar, S., Marini, A., Bojar, H., Tannapfel, A. & Hengge, U. R. (2007). "ERK1/2 is highly phosphorylated in melanoma metastases and protects melanoma cells from cisplatin-mediated apoptosis." *The Journal of investigative dermatology* **127**, 2207-2215.
- Moore, E. S. & Martin, H. (1955). "Melanoma of the upper respiratory tract and oral cavity." *Cancer* **8**, 1167-1176.
- Moreno, M. A., Roberts, D. B., Kupferman, M. E., DeMonte, F., El-Naggar, A. K., Williams, M., Rosenthal, D. S. & Hanna, E. Y. (2010). "Mucosal melanoma of the nose and paranasal sinuses, a contemporary experience from the M. D. Anderson Cancer Center." *Cancer* **116**, 2215-2223.
- Nelson, W. G. & Kastan, M. B. (1994). "DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways." *Molecular and cellular biology* **14**, 1815-1823.
- Osterlind, A., Hou-Jensen, K. & Moller Jensen, O. (1988). "Incidence of cutaneous malignant melanoma in Denmark 1978-1982. Anatomic site distribution, histologic types, and comparison with non-melanoma skin cancer." *British journal of cancer* **58**, 385-391.
- Panje, W. R. & Moran, W. J. (1986). "Melanoma of the upper aerodigestive tract: review of 21 cases." *Head & neck surgery* **8**, 309-312.
- Pathan, N., Aime-Sempe, C., Kitada, S., Basu, A., Haldar, S. & Reed, J. C. (2001). "Microtubule-targeting drugs induce bcl-2 phosphorylation and association with Pin1." *Neoplasia* **3**, 550-559.
- Pavletich, N. P., Chambers, K. A. & Pabo, C. O. (1993). "The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots." *Genes & development* **7**, 2556-2564.
- Petro, A., Schwartz, J. & Johnson, T. (2004). "Current melanoma staging." *Clinics in dermatology* **22**, 223-227.
- Pflugfelder, A., Kochs, C., Czeschik, C., Schadendorf, D. & Garbe, C. (2013). Malignes Melanom S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“. [Leitlinie]
- Phelps, M., Darley, M., Primrose, J. N. & Blaydes, J. P. (2003). "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 research* **63**, 2616-2623.
- Platz, A., Ringborg, U. & Hansson, J. (2000). "Hereditary cutaneous melanoma." *Seminars in cancer biology* **10**, 319-326.
- Plotnick, H., Rachmaninoff, N. & VandenBerg, H. J., Jr. (1990). "Polypoid melanoma: a virulent variant of nodular melanoma. Report of three cases and literature review." *Journal of the American Academy of Dermatology* **23**, 880-884.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., Cordon-Cardo, C. & DePinho, R. A. (1998). "The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53." *Cell* **92**, 713-723.
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. (1995). "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest." *Cell* **83**, 993-1000.

- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 3116-3120.
- Riedl, S. J. & Shi, Y. (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 897-907.
- Salvador, J. M., Brown-Clay, J. D. & Fornace, A. J., Jr. (2013). "Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis." *Advances in experimental medicine and biology* **793**, 1-19.
- Sanki, A., Li, W., Colman, M., Karim, R. Z., Thompson, J. F. & Scolyer, R. A. (2007). "Reduced expression of p16 and p27 is correlated with tumour progression in cutaneous melanoma." *Pathology* **39**, 551-557.
- Satyamoorthy, K., Chehab, N. H., Waterman, M. J., Lien, M. C., El-Deiry, W. S., Herlyn, M. & Halazonetis, T. D. (2000). "Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells." *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 467-474.
- Satyanarayana, A. & Kaldis, P. (2009). "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms." *Oncogene* **28**, 2925-2939.
- Siddik, Z. H. (2003). "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance." *Oncogene* **22**, 7265-7279.
- Slebos, R. J., Lee, M. H., Plunkett, B. S., Kessis, T. D., Williams, B. O., Jacks, T., Hedrick, L., Kastan, M. B. & Cho, K. R. (1994). "p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5320-5324.
- Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., O'Connor, P. M. & Fornace, A. J., Jr. (1995). "Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage." *Oncogene* **10**, 1053-1059.
- Sobin, L. H. & Compton, C. C. (2010). "TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer." *Cancer* **116**, 5336-5339.
- Stiewe, T. & Putzer, B. M. (2001). "p73 in apoptosis." *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **6**, 447-452.
- Taylor, W. R. & Stark, G. R. (2001). "Regulation of the G2/M transition by p53." *Oncogene* **20**, 1803-1815.
- Thorn, M., Bergstrom, R., Adami, H. O. & Ringborg, U. (1990). "Trends in the incidence of malignant melanoma in Sweden, by anatomic site, 1960-1984." *American journal of epidemiology* **132**, 1066-1077.
- Tovar, C., Rosinski, J., Filipovic, Z., Higgins, B., Kolinsky, K., Hilton, H., Zhao, X., Vu, B. T., Qing, W., Packman, K., Myklebost, O., Heimbrook, D. C. & Vassilev, L. T. (2006). "Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1888-1893.
- Urien, S. & Lokiec, F. (2004). "Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients." *British journal of clinical pharmacology* **57**, 756-763.
- Veal, G. J., Dias, C., Price, L., Parry, A., Errington, J., Hale, J., Pearson, A. D., Boddy, A. V., Newell, D. R. & Tilby, M. J. (2001). "Influence of cellular factors and pharmacokinetics on the formation of platinum-DNA adducts in leukocytes

- of children receiving cisplatin therapy." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**, 2205-2212.
- Vestergaard, M. E., Macaskill, P., Holt, P. E. & Menzies, S. W. (2008). "Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting." *The British journal of dermatology* **159**, 669-676.
- Wang, Y., Debatin, K. M. & Hug, H. (2001). "HIPK2 overexpression leads to stabilization of p53 protein and increased p53 transcriptional activity by decreasing Mdm2 protein levels." *BMC molecular biology* **2**, 8.
- Weber, C. O. (1859). "Chirurgische Erfahrungen und Untersuchungen, nebst zahlreichen Beobachtungen aus der chirurgischen Klinik und dem evangelischen Krankenhause zu Bonn."
- Wei, Q., Lee, J. E., Gershenwald, J. E., Ross, M. I., Mansfield, P. F., Strom, S. S., Wang, L. E., Guo, Z., Qiao, Y., Amos, C. I., Spitz, M. R. & Duvic, M. (2003). "Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma." *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 308-315.
- Weinstock, M. A. & Sober, A. J. (1987). "The risk of progression of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma." *The British journal of dermatology* **116**, 303-310.
- Williams, L. H., Shors, A. R., Barlow, W. E., Solomon, C. & White, E. (2011). "Identifying Persons at Highest Risk of Melanoma Using Self-Assessed Risk Factors." *Journal of clinical & experimental dermatology research* **2**.
- Yu, J. & Zhang, L. (2008). "PUMA, a potent killer with or without p53." *Oncogene* **27 Suppl 1**, S71-83.
- Yun, J., Chae, H. D., Choy, H. E., Chung, J., Yoo, H. S., Han, M. H. & Shin, D. Y. (1999). "p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor." *The Journal of biological chemistry* **274**, 29677-29682.
- Zerp, S. F., van Elsas, A., Peltenburg, L. T. & Schrier, P. I. (1999). "p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis." *British journal of cancer* **79**, 921-926.
- Zhang, Y. & Xiong, Y. (1999). "Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53." *Molecular cell* **3**, 579-591.

10 Anhang

Cisplatin fails to induce puma mediated apoptosis in mucosal melanomas

Marie Kristin Fritsche¹, Veronika Metzler¹, Karen Becker², Christian Plettenberg³, Clemens Heiser¹, Benedikt Hofauer¹, Andreas Knopf¹

¹Technische Universität München, Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik, 81675 München, Germany

²Universität München, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, 81675 München, Germany

³Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Hals-Nasen-Ohrenklinik, 40225 Düsseldorf, Germany

ABSTRACT

Objectives

Mucosal melanomas (MM) are aggressive subtypes of common melanomas. It remains unclear whether limitations in their resectability or their distinctive molecular mechanisms are responsible for the aggressive phenotype.

Methods

In total, 112 patients with cutaneous melanomas (CM) and 27 patients with MM were included. Clinical parameters were analysed using Chi square, Fisher exact and student's *t*-test. Survival rates were calculated by Kaplan–Meier. Analysis of p53, p21, Mdm2, Hipk2, Gadd45, Puma, Bax, Casp9 and Cdk1 via quantitative PCR and immunohistochemistry (IHC) was performed. *TP53* induction after cisplatin treatment was analysed in 10 cell lines (melanocytes, four MM and five CM) using western blot (WB) and qPCR.

Results

The overall/recurrence-free survival differed significantly between MM (40 months and 30 months) and CM (90 months and 107 months; $p < 0.001$). IHC and WB confirmed high p53 expression in all melanomas. Hipk2 and Gadd45 showed significantly higher expressions in CM ($p < 0.005$; $p = 0.004$). QPCR and WB of wild-type cell lines demonstrated no differences for p53, p21, Mdm2, Bax and Casp9. WB failed to detect Puma in MM, while Cdk1 regulation occurred exclusively in MM.

Conclusions

The aggressive phenotype of MM did not appear to be due to differential expressions of p53, p21, Mdm2, Bax or Casp9. A non-functional apoptosis in MM may have further clinical implications.

INTRODUCTION

In Europe, 18 of 100,000 people are annually diagnosed with malignant melanoma, and the incidence is continuously increasing. Earlier detection by intensive clinical efforts have led to an enhanced five-year survival rate of 89%–94% [1]. Mucosal melanomas represent an infrequent subtype representing 1% of the overall cohort [2]. The majority of MM originates in the sinonasal region. Other tumour sites such as the oral cavity, uvea, or the urogenital and gastrointestinal tracts occur infrequently [3]. In contrast to their cutaneous counterparts, MM present a highly aggressive subtype with a poor five-year survival rate of approximately 17% [4]. The sinonasal region is a difficult site to access surgically, often preventing a radical surgical approach with sufficient R-status. Therefore, locoregional recurrent disease might be a possible explanation for the limited survival. Molecular mechanisms underlying the highly aggressive phenotype remain unclear. While the aetiology of MM is still unclear, molecular changes that may contribute to tumour development in CM are widely discussed [5–10]. While *TP53* is mutated in many solid tumours, mutations in CM and MM are rare [11]. However, accumulation of wild-type p53 can be detected in the majority of CM and MM. The mechanisms explaining the p53 protein stabilisation remain unclear. Mutations in p53-modifying proteins Mdm2 (*mouse double minute 2*) and Hipk2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*) can be excluded [12]. Cellular stress, such as damage induced by UV light and cytotoxic agents, leads to p53 stabilisation by blocking its degradation through Mdm2 and

posttranslational modifications [13]. Once p53 is activated, it functions as a transcription factor in the expression of a broad variety of target genes involved in cell cycle regulation, DNA repair and apoptosis [14]. *MDM2* is a direct target gene, which mediates p53 degradation. Under stress conditions, this feedback loop is inhibited by phosphorylation of p53 on Thr18 through Ck1 (*casein kinase 1*) thereby disrupting Mdm2-p53 binding [15]. Stabilised and activated p53 can induce cell cycle arrest by enhancing the expression of p21 which itself inhibits Cdk1 (*cyclin dependent kinase 1*) and other Cdks, decelerating cell cycle progression [16]. The influence of p53 in DNA repair was explored by inducing the expression of *GADD45A* (*growth arrest and DNA damage-inducible 45*). In addition, *GADD45A* is involved in cell cycle regulation, survival and apoptosis [17]. The p53-induced apoptosis is accomplished by expressing the target genes *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) and *BAX*. Through its BH3 domain, Puma binds the anti-apoptotic proteins Bcl-X_L and Bcl-2 prohibiting their inhibitory function on Bax [18]. Active Bax permeabilizes the mitochondrial membrane, releasing cytochrome c. This leads to caspase activation resulting in apoptosis [19]. Despite missing *TP53* mutations in CM and MM, the *in vivo* and *in vitro* response of classical p53-inducing chemotherapeutic agents such as cisplatin is poor [20].

We give a detailed assessment of the clinical characteristics of 139 patients with malignant melanoma of the head and neck, including 112 CM and 27 MM. To investigate whether or not the aggressive phenotype in MM is due to an aberrant p53 pathway we analysed the protein and mRNA expression of p53 and its targets. Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples of 40 patients with head and neck CM and MM were differentially analysed using immunohistochemistry and real-time (RT-) PCR (qPCR). Furthermore, we investigated the functional integrity of p53 in CM and MM melanoma cell cultures by cisplatin incubation. Experimental data was put into clinical context.

RESULTS

Epidemiology

A total of 139 patients with malignant melanoma of the head and neck, treated in the Department of Otorhinolaryngology, Technical University Munich, were included in the current study. There were 112 patients with CM and 27 patients with MM. Twenty-five patients with MM demonstrated a sinonasal tumour manifestation, and two patients had tumours in the oral cavity. Patients with CM were significantly younger (mean age of 58 years, SD: 15) than patients with MM (70 years, SD: 12, $p < 0.001$). Concordant with the UICC classification system, the majority of MM was classified as T3 tumours. At the time of diagnosis two patients (7%) with MM showed locoregional lymph node involvement, as compared to 15 patients (13%) with CM ($p < 0.396$). Lymph node involvement in MM exclusively occurred in oral MM. In contrast, MM tended to exhibit less frequent distant metastases at the time of diagnosis ($p < 0.064$) (Table 1).

Survival analysis

Recurrent disease was demonstrated in 10 (40%) MM and 30 (19%) CM ($p < 0.001$). The mean disease-free survival time in MM was significantly reduced (30 months) when compared with CM (107 months) ($p < 0.001$). After a mean follow-up of 89 months, the median overall survival (OS) differed significantly between both groups (MM: 40 months; CM: 99 months; $p < 0.001$) (Figure 1).

p53 mutation status in MM cells and CM cell lines

Sequence analysis of the DNA-binding domain, comprising exon 5–8, of *TP53* revealed no aberration in MM cells (TU-MM1-TU-MM4). The identification of aberrations in CM cell lines (one missense mutation SK-MEL 3: R267W and one frameshift deletion IGR-37: C229DelTG) was previously described [21]. Whereas IGR-37 expresses mutant transcript only, SK-MEL 3 retains *p53* wild-type transcript. Sequence analysis revealed wild-type p53 in SK-MEL 30, MEL JUSO and COLO-849 (Data not shown).

Table 1: Epidemiological data of mucosal melanoma and cutaneous melanoma. MM Mucosal melanoma; CM Cutaneous melanoma

	All	MuM	CM	p-value
<i>n</i>	139	27	112	
Age at diagnosis (SD)	60 (15)	70 (12)	58 (15)	< 0.001
Sex (f/m)	65/74	16/11	49/63	= 0.126

	All	MuM	CM	p-value
<i>n</i>	139	27	112	
T1	24	0	24	< 0.032
T2	22	0	22	< 0.012
T3	25	21	15	< 0.001
T4	20	6	14	< 0.198
Tis	19	0	19	< 0.022
Tx	29	0	18	< 0.005
N+	17	2	15	< 0.396
M+	13	0	13	< 0.064

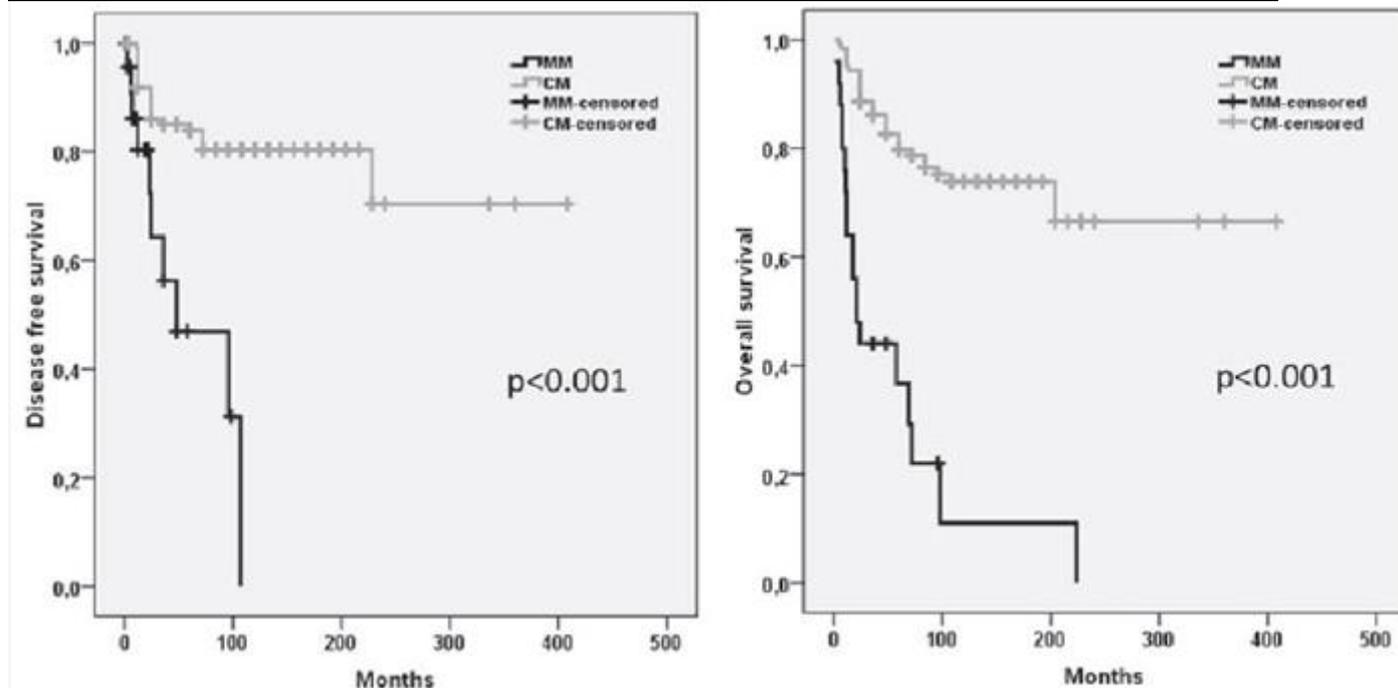


Figure 1: Kaplan–Meier estimates of the disease free and overall survival in patients with MM and CM. MM Mucosal melanoma; CM Cutaneous melanoma.

Proteins involved in the p53 pathway

Immunohistochemical staining revealed p53 positivity in 94% of the CM and 80% of MM with a significantly higher expression in CM. Mdm2 that is directly involved in the p53 protein stabilisation was positive in 71% of MM and 81% of CM without statistical significance. Immunohistochemical staining revealed a striking difference of Hipk2 staining patterns between the groups ($p < 0.005$). Hipk2, responsible for p53^{Ser46} phosphorylation therefore mediating enhancement of promoter-specific DNA binding, was negative in 88% of MM, whereas 44% of CM showed Hipk2 positivity. Despite the high number of p53-positive cases, the majority of MM (58%) and CM (63%) showed a weak p21 staining. CM demonstrated a significantly increased Gadd45a staining in 100% of analysed samples. Ninety-two percent of MM stained positive for Gadd45a ($p = 0.004$). Of the CM cases, 94% stained positive for Puma and 62% were positive for Bax; however, only 78% of the MM were positive for Puma and 42% for Bax. The observed tendency failed to reach statistical significance ($p = 0.08$; $p = 0.09$). In contrast to the high expression of pro-apoptotic proteins, the vast majority of CM (92%) and MM (81%) were negative for Casp9. Cell-cycle regulating protein Cdk1 was detected in 38% of CM and 63% of MM (Table 2).

Table 2: Immunohistochemical data of proteins involved in the p53 pathway. MM Mucosal melanoma; CM Cutaneous melanoma.

	< 10%	11–30%	31–70%	> 70%	p-value
<i>n</i> (%)					

		< 10%	11–30%	31–70%	> 70%	p-value
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
p53	MM (n = 24)	5 (21)	5 (21)	4 (17)	10 (42)	< 0.04
	CM (n = 16)	1 (6)	2 (13)	0 (0)	13 (81)	
p21	MM (n = 24)	14 (58)	6 (25)	4 (17)	0 (0)	= 0.58
	CM (n = 16)	10 (63)	2 (13)	2 (13)	2 (13)	
Mdm2	MM (n = 24)	7 (29)	1 (4)	5 (21)	11 (46)	= 0.68
	CM (n = 16)	3 (19)	0 (0)	7 (44)	6 (38)	
Hipk2	MM (n = 24)	21 (88)	2 (8)	1 (4)	0 (0)	< 0.005
	CM (n = 16)	9 (56)	1 (6)	2 (13)	4 (25)	
Gadd45	MM (n = 24)	8 (33)	2 (8)	3 (13)	10 (42)	= 0.004
	CM (n = 16)	0 (0)	1 (6)	1 (6)	14 (88)	
Puma	MM (n = 24)	5 (21)	2 (8)	1 (4)	16 (67)	= 0.08
	CM (n = 16)	1 (6)	0 (0)	0 (0)	15 (94)	
Bax	MM (n = 24)	14 (58)	1 (4)	4 (17)	5 (21)	= 0.09
	CM (n = 16)	6 (38)	0 (0)	2 (13)	8 (50)	
Casp9	MM (n = 24)	22 (92)	2 (8)	0 (0)	0 (0)	= 0.14
	CM (n = 16)	13 (81)	1 (6)	1 (6)	1 (6)	
Cdk1	MM (n = 24)	15 (63)	4 (17)	3 (13)	2 (8)	= 0.38
	CM (n = 16)	6 (38)	5 (31)	5 (31)	0 (0)	

Quantitative PCR of the p53 pathway in FFPE tumour samples

QPCR of FFPE tumour samples did not show significant differences in the expression of *TP53*, *BBC3*, *CASP9*, *BCL2A1*, and *CDK1*. *HIPK2*, *MDM2*, *CDKN1A*, and *BAX* mRNA expression was increased in MuM demonstrating differences from 2.6- to 4.2-fold. *GADD45* showed 2.4-fold decreased expression in MM (Figure 2).

Quantitative PCR of the p53 pathway in MM cells and CM cell lines

QPCR of untreated MM cells and CM cell lines revealed different expression patterns of analysed genes due to the underlying p53 mutation status. Primary MM cells and melanoma cell lines harbouring wild-type p53 demonstrated a significantly lower *TP53* mRNA expression when compared with primary melanocytes. The lowest *TP53* mRNA levels were determined for p53-knockout cell line IGR-37. Parallel with p53 mRNA levels, significantly decreased mRNA levels were detected for p53 stabilizing *HIPK2* in all p53 wild-type cell lines and IGR-37. No differences were observed for melanoma cell lines expressing mutated p53. Direct p53 target gene *CDKN1A* demonstrated significantly lower expressions for all tumour cell lines when compared with primary melanocytes. A significant and stepwise decrease can be observed in MM cells, from melanoma cell lines harbouring wild-type p53 to melanoma cell lines with mutated p53. *GADD45A* mRNA was expressed equally in primary melanocytes and MM cells; a significantly higher expression than that of CM cell lines. *BBC3* and *BAX* had significantly lower expression in MM and CM cells. The lowest levels demonstrated p53-knockout IGR-37. Analysis of *CASP9* demonstrated a significantly decreased mRNA expression when compared with primary melanocytes. No differences were observed for *CDK1* expression levels in MM and CM, except IGR-37 (Figure 3). To investigate the functional integrity of the p53 downstream, cells were treated with 8 μ M cisplatin. There was no regulation of *TP53* in the analysed cell lines. All cell lines harbouring wild-type p53 demonstrated an upregulation of *MDM2*, with the highest expression in melanocytes and MM. *HIPK2* was downregulated in melanocytes and CM cell lines that expressed mutated p53. Cell cycle regulation *CDKN1A* was

upregulated in all cell lines after treatment with cisplatin, while *GADD45A* was upregulated only in melanocytes. *BBC3* mRNA expression increased in CM cell lines with wild-type p53 and in MM. QPCR failed to demonstrate a regulation *BAX* or *CASP9*. A *CDK1* downregulation was exclusively seen in MM (Figure 3).

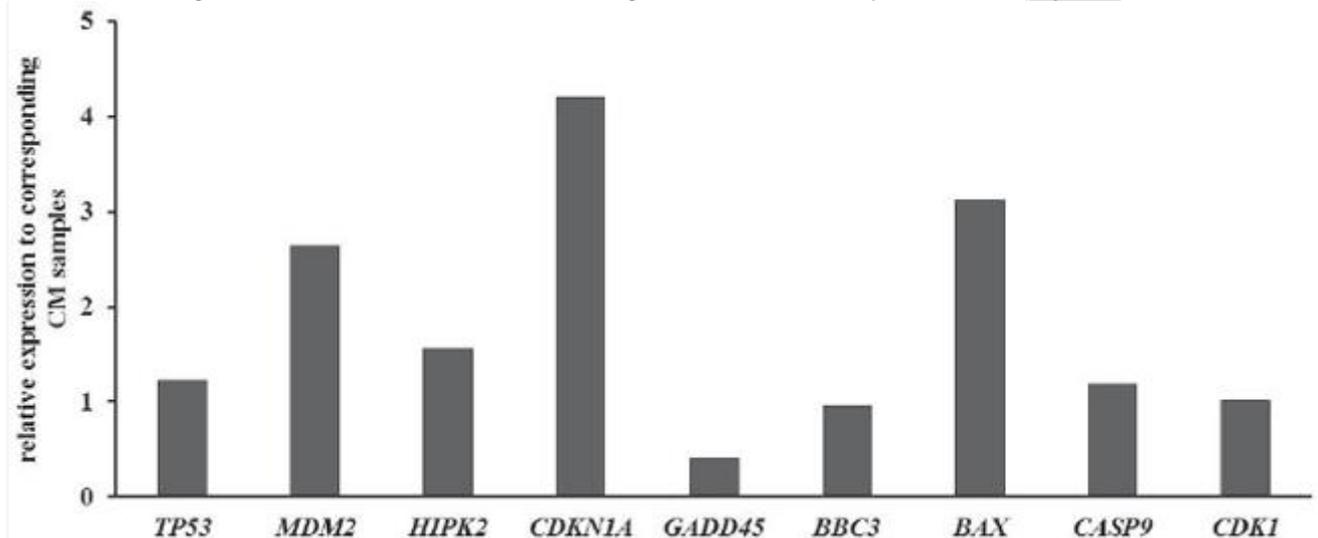


Figure 2: Quantitative PCR of the p53 pathway in FFPE tumor samples. Results were normalized to GAPDH and shown as fold induction compared to CM. MM: Mucosal melanoma; CM Cutaneous melanoma.

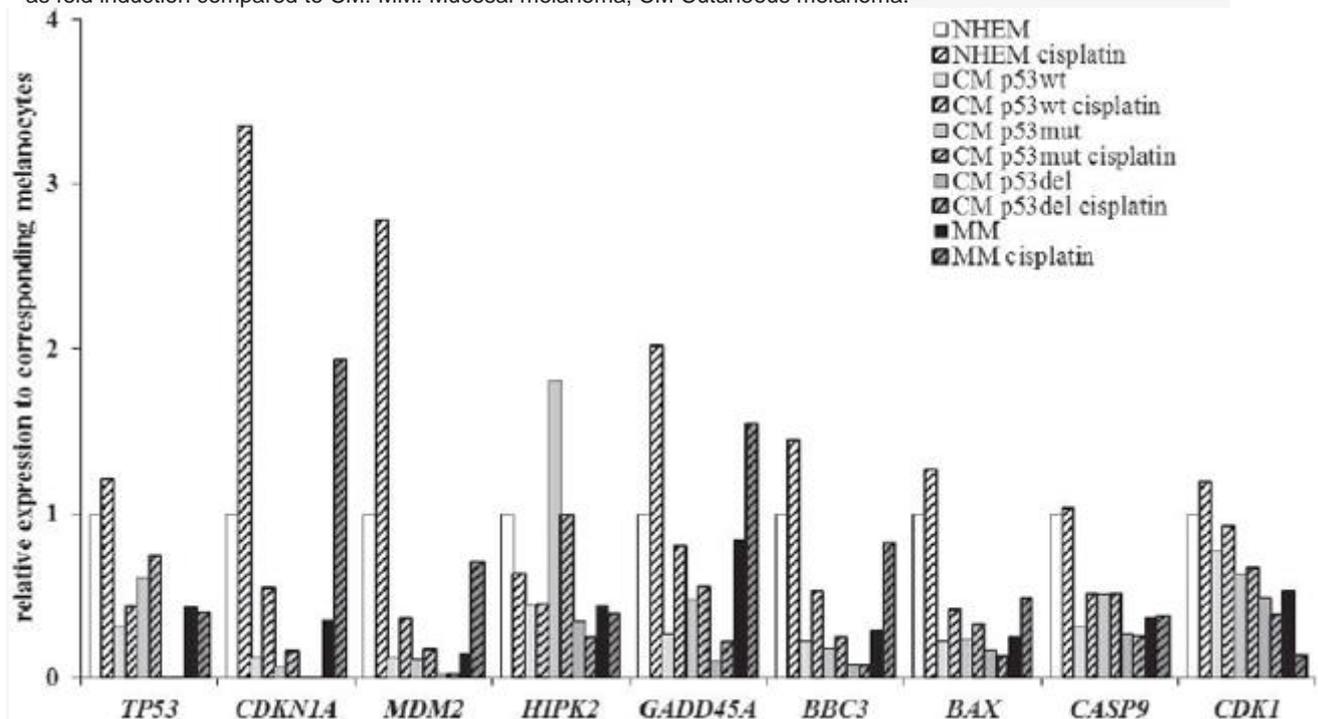


Figure 3: Quantitative PCR of the p53 pathway in primary cells and cell lines without treatment and after 24 h incubation with 8 μ M cisplatin. Results were normalized to GAPDH and shown as fold induction compared to CM. MM: Mucosal melanoma; CM: Cutaneous melanoma. Cis: Cisplatin.

Western blot of p53 and p53 target genes in cutaneous and mucosal melanoma cell lines

To further analyse the p53 activation capability after cisplatin treatment on protein level, the protein expression was analysed in western blot experiments. Despite unaltered *TP53* mRNA levels, a stabilisation of p53 protein could be observed in melanocytes and all MM cells. In SK-MEL 30, SK-MEL 3 and IGR-37 cisplatin incubation failed to induce the p53 protein. Cell lines that showed p53 induction demonstrated subsequent p21 upregulation. Independent of p53 or p21 expression, all cell lines, except SK-MEL30, showed an increased Mdm2 level, even though the protein amount of MM cells was difficult to detect. Treatment with cisplatin failed to induce a consistent response in the p53 downstream signalling. If detectable, Gadd45A and Puma showed no significant regulations. Bax stabilisation was seen in three out of four MM cells and weakly, but not significant, in all CM cells excluding COLO-849. MM and CM cells tended to regulate the cell-cycle regulating protein Cdk1 in a different

manner. While Cdk1 protein expression is downregulated by cisplatin in MM cells, it is enhanced in CM cells. All untreated cells demonstrated Casp9 expression. Cells did not regulate Casp9 after treatment with cisplatin, nor did they show any cleave products (Figure 4).

DISCUSSION

MM represents a small subgroup of malignant melanoma. The vast majority of MM originate in the sinonasal region and are clinically aggressive. This study includes 112 patients with CM and 27 with MM of the head and neck region. The high percentage of MM can be attributed to its sinonasal and oral origin and the subsequent admission to our otorhinolaryngology department. Similar to findings in the current literature, our study showed that patients with MM were significantly older than their cutaneous counterparts (MM 70 years, SD: 12, CM 58 years, SD: 15, $p < 0.001$) [4]. The prevalence of women was not determined in this study. According to the UICC staging system, most MM were classified as T3 tumours. At time of diagnosis no difference was seen in the locoregional metastasis rate (MM 7%, CM 13%, $p < 0.396$), but MM did demonstrate a tendency for less frequent distant metastases at the time of diagnosis ($p < 0.064$). A significant difference was seen in the disease-free and overall survival in favour of CM ($p < 0.001$). A multifocal tumor expansion and the difficult anatomic site in the sinonasal system often prevent resections with an appropriate R-status. Therefore, recurrence rates are estimated to be about 50%–90% [22]. While systemic therapeutic approaches failed to improve patients' prognoses in MM, it remains unclear whether the aggressive phenotype refers to a limited resectability in the sinonasal region or to distinct biological mechanisms. *TP53* is frequently mutated in solid tumours, whereas mutations in CM and MM are rare [12]. The mutation load in MM is estimated to be five- to ten-fold smaller than in CM [23]. Although protein stabilising mutations are rare, an accumulation of wild-type p53 can be demonstrated in the majority of CM and MM [24]. Recently, a disruption of cell-cycle regulating proteins, Bcl-2, p53 and p16, were associated with the carcinogenesis of primary oral mucosal melanomas [25]. While wild-type p53 demonstrates a short half-life of approximately 30 minutes, p53 is physiologically stabilised after cellular stresses by a broad variety of posttranslational modifications, including acetylation, phosphorylation and sumoylation, increasing its transcriptional activation, or enhancement of DNA and promoter specific binding [26, 27]. An accumulation of the p53 protein in untreated cells implies a disruption of its functional integrity indicating a p53 mutation or an interaction with viral oncogenes [28]. In the current cohort, all MM cells showed wild-type p53, while two mutations were detected in five CM cell lines. In contrast, western blot analysis demonstrated an accumulation of the p53 protein in all cells, except p53-knockout IGR-37. Immunohistochemical staining of 40 tumour samples confirmed the high p53 expression level in CM and MM. In our cohort, CM (92%) showed a significantly higher p53 expression level than MM (72%; $p < 0.04$). In the absence of protein stabilising mutations in seven of nine tumour cell lines, other mechanisms have to be considered to explain the abrogation of the p53 pathway, particularly the induction of apoptosis, resulting in the accumulation of wild-type p53. Blagosklonny constitutes a regulatory p53 feedback loop in which the loss of p53 function results in a 'compensatory' p53 upregulation by decreasing its degradation [28]. Therefore, the key point that leads to the disruption of the p53 pathway has to be assessed in our cohort. Recently, we demonstrated a functional p53 upstream in different melanoma cell lines [21]. In the current cohort, western blot experiments revealed cisplatin-induced p53 upregulation in all p53 wild-type cells, except SK-MEL 30. The high p53 base level did not result in further induction. Mdm2 and Hipk2 play a pivotal role in the p53 stabilisation via phosphorylation at serine residues. Overexpression of *MDM2* by enhanced protein translation was frequently observed in solid tumours and was associated with tumour progression [29–31]. However, qPCR experiments demonstrated a significantly higher expression of *Mdm2* mRNA expression of primary melanocytes when compared with CM and MM. QPCR analysis of FFPE samples and cells revealed a significantly higher *MDM2* mRNA expression in MM when compared with CM. Different qPCR levels did not result in a different protein level in IHC or WB analysis, most likely due to posttranslational mechanisms or a *TP53*-independent Mdm2 regulation. For example, a positive feedback loop is described for p53-induced Caspase2-mediated Mdm2 cleavage [32]. In addition, regardless of the *TP53* mutation status, *Mdm2* mRNA expression was upregulated after cisplatin treatment for CM and MM. Importantly, the Mdm2 up-regulation of IGR-37 suggested *TP53* independent mechanisms. The hepatocyte growth factor receptor and the insulin like growth factor 1 receptor were found to regulate *MDM2* translation by signalling through PI3K and mTOR. Furthermore, several RNA binding proteins were shown to interfere with *TP53* and *MDM2* [29]. In contrast, CM with mutated p53 showed a significantly higher *HIPK2* mRNA expression compared with wild-type cells. Pointing to an

enhanced mutational load in CM, IHC staining of 40 tumour samples validated the higher expression in favour for CM [21, 23]. Cell lines of a different mutational status failed to demonstrate a significant *HIPK2* mRNA regulation after cisplatin treatment, which points to regulatory mechanisms on protein levels. In agreement with the current literature, we hypothesized a loss of p53 function in SK-MEL 30 which resulted in an incapability to induce Mdm2, p21 and Gadd45a [27]. This most likely indicates an interaction with viral oncoproteins or cellular proteins that stabilise non-functional wild-type p53 [28]. *GADD45A*, which is involved in DNA repair and cell cycle regulation, demonstrated inconclusive expression patterns. In FFPE samples, qPCR and IHC detected a significantly higher expression in CM, while cell experiments showed opposite results. Untreated CM cell lines expressed Gadd45a in two of five cases, including p53-knockout IGR-37, suggesting *TP53*-independent mechanisms. FoxO3a, Egr-1, c-myc and ZBRK have been identified as modulators of Gadd45a expression [29]. *CDK1* represents another cell cycle regulation gene that is involved in the G2/M arrest. Immunohistochemical staining, WB analysis and qPCR of FFPE samples and cells revealed no differences in the constitutional *CDK1/Cdk1* expression. Interestingly, after treatment with cisplatin, only MM cells decreased mRNA and protein expression of *CDK1/Cdk1*, whereas CM cells tended to stabilize Cdk1 protein and therefore promote the maintenance of cell proliferation. Recently, the influence of epigenetics in cutaneous melanoma gained in importance. It was demonstrated that gene-specific hypermethylation silences genes involved in cell cycle regulation, DNA repair, apoptosis and cell signalling [33]. The potential impact of a distinct *CDK1* mediated cell cycle regulation in MM and CM remains elusive at this point. Immunohistochemistry of FFPE samples and tumour cells showed that the constitutional p53 expression resulted in a significantly higher *CDKN1A* expression in MM when compared with CM. Different *CDKN1A* mRNA levels did not result in a different constitutional protein expression as observed in IHC and WB. With respect to Blagosklonny's constitute of a compensatory upregulation of wild-type p53 due to functional loss, elevated *CDKN1A* mRNA levels are congruent with an accumulation of wild-type p53 but do not inevitably refer to a more 'physiological' behaviour, because a disruption of the apoptotic cascade will result in an increased regulatory feedback. *TP53* downstream genes *BBC3*, *BAX* and *CASP9* showed no difference in the mRNA expression in FFPE samples and untreated cells, except for a higher *BAX* expression for MM in FFPE samples. These results were verified on protein level. Immunohistochemical analysis of staining patterns showed no significant differences between the groups. Interestingly, despite a detectable mRNA level in FFPE and cell lines, MM failed to detect Puma in cell lines by WB experiments. Puma expression correlates inversely with the melanoma malignancy grade, and weak Puma expression is associated with poorer overall survival, suggesting Puma as a marker for disease aggressiveness [35, 36]. Recent studies demonstrated the regulation of Puma by oncogenic miRNAs [34]. In human oral squamous carcinoma cells, Puma was a direct target of miR-222 and mediated the diminished apoptosis after treatment with cisplatin [35]. Additionally, Puma degradation in melanoma cells could be inhibited with chloroquine, promoting apoptosis and demonstrating a significant role of Puma in apoptosis of melanoma cells [36]. In support of these results, we were not able to detect an upregulation of *CASP9* mRNA or protein after cisplatin treatment. Recently, the impact of Puma was highlighted in *BRAF* (*V600E*) melanoma cell lines. Unexpectedly, treatment with *MEK* inhibitors led to an inhibition of cisplatin-induced apoptosis in some cell lines via activation of the *PI3K/AKT* pathway [37]. The *PI3K-AKT* pathway was demonstrated to contribute to melanoma resistance as well as its tumour initiation [38]. While mutations in *BRAF* occur infrequently in MM, pAkt and pErk expression were demonstrated in sinonasal MM [9, 39]. Interestingly, primary melanocytes do not regulate pro-apoptotic proteins after cisplatin treatment. This phenomenon is described for many normal cell types, which are intrinsically apoptosis-resistant and results in chemo-resistant tumours after malignant transformation [40]. This may explain why melanoma is resistant to the majority of chemotherapeutics [41]. Furthermore, Apaf-1 inactivation is described for melanoma cells, supporting this hypothesis [42]. However, the disruption of Puma mediated apoptosis in MM may contribute, despite the challenging anatomic location, to the aggressive phenotype. Therapeutic strategies inhibiting the *PI3K-Akt-mTOR* pathway or activating the apoptotic capability of Puma are of major clinical import [39, 43].

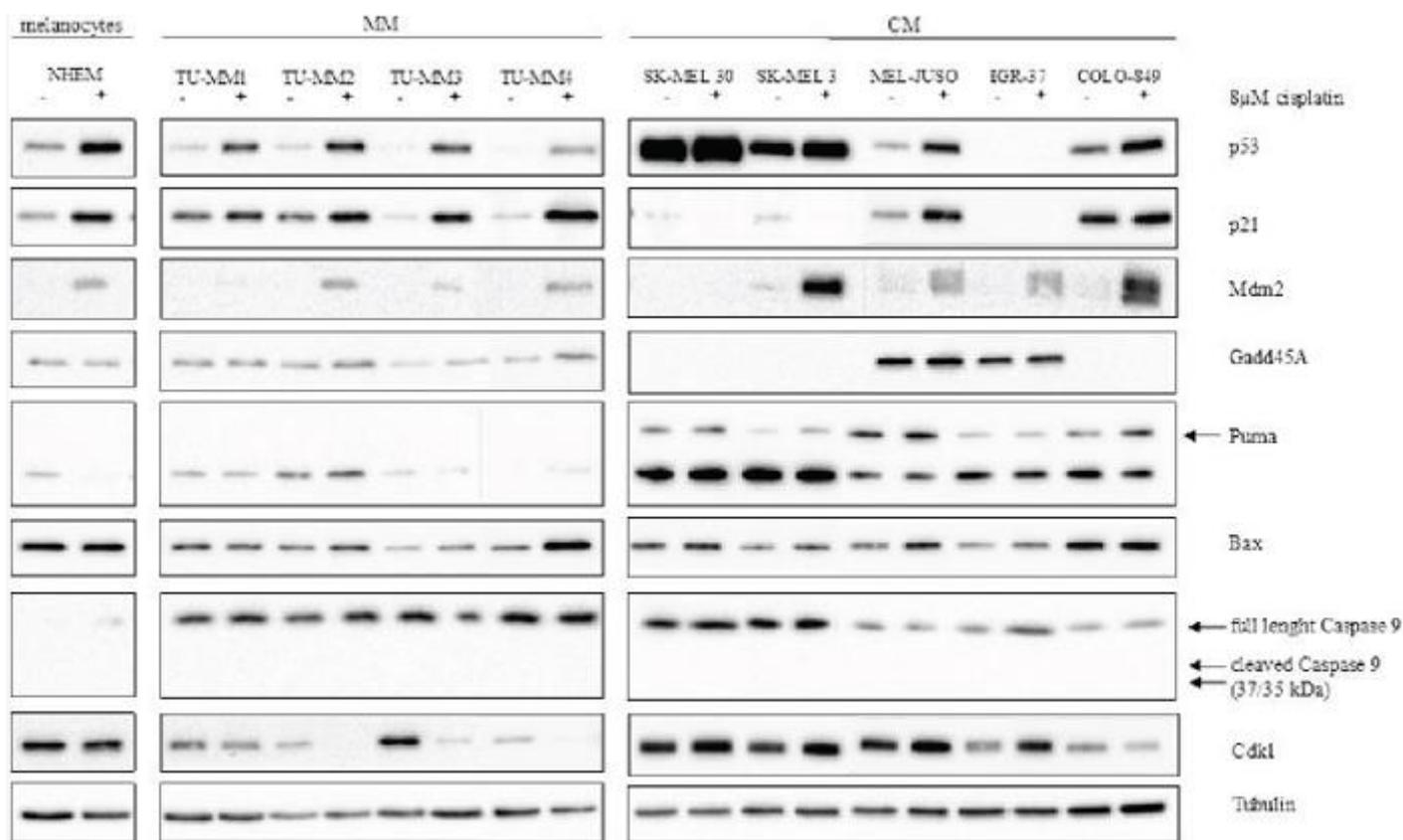


Figure 4: Cisplatin-induction of the p53 pathway in MM and CM cell lines. Protein was isolated from cells treated with either fresh medium or 8 μ M cisplatin for 24 hours. Tubulin served as loading control. MM: Mucosal melanoma; CM: Cutaneous melanoma. Cis: Cisplatin.

CONCLUSIONS

Our study confirmed the highly aggressive phenotype of MM. Comprehensive analysis of the p53 pathway in MM and CM revealed no differences in *TP53* and direct targets *CDKN1A* and *GADD45A* in wild-type cells that represent the majority of MM and CM. The regular induction of direct *TP53* target genes failed to induce apoptosis mediated by *CASP9*. A disruption of *BBC3* mediated apoptosis may result in the poor response of MM after treatment with cisplatin, and developing therapeutic approaches is of major clinical import. The potential influence of a distinctive *CDK1*-dependent cell cycle regulation has to be further investigated.

MATERIALS AND METHODS

Patient selection

The study included 139 patients with malignant melanoma of the head and neck, including 112 patients with CM and 27 patients with MM. Tumor samples were obtained from the tissue collection of the Institute of Pathology at the Technical University Munich. The tissue collection was approved by the local ethical committee. Tumor samples were histologically reviewed by at least two experienced pathologists. Clinical parameters and survival data were retrospectively collected including age at diagnosis, sex, TNM-staging, recurrence, death and loss to follow-up. Patients with lacking data, incomplete staging, and refused or unfinished treatment were excluded from survival analysis. The mean follow-up time was 89 months (range: 0–408 months). Paraffin-embedded tumour (FFPE) samples from 16 CM and 24 MM were randomly selected and analysed with qPCR and immunohistochemistry (IHC).

Statistical analysis

Differences between both groups were analysed using the Chi square test and Fisher exact test for categorical and the unpaired student's *t*-test for continuous variables. As main endpoints the overall survival (OS) and recurrence-free interval (RFI) were assessed measuring the time from treatment to locoregional recurrence

and death, and/or distant metastasis. Survival rates by the log-rank test for univariate analysis with p -values < 0.05 were considered statistically significant (SPSS Inc., Chicago, IL).

Mammalian cell culture and treatment

Primary cells were obtained from mucosal melanoma tumour tissue. The tumour tissue was cut into little pieces and dried on culture dishes upside down for 30 minutes before medium was added. After three to four days, the tissue was removed and adhered mucosal melanoma cells were cultured. The mucosal melanoma primary cells TU-MM1–TU-MM4, as well as the melanoma cell lines SK-MEL 30, IGR-37, MEL-JUSO, COLO-849 and SK-MEL 3 (DSMZ, Braunschweig, Germany) were cultured under standard conditions (37°C, 5% CO₂, fully humidified atmosphere) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium or Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (TU-MM3, TU-MM4, SK-MEL3), supplemented with 10% foetal calf serum (PAA Laboratories, Cölbe, Germany), 1% penicillin-streptomycin and 1% glutamine (all from Biochrom, Berlin, Germany). Normal human epidermal melanocytes (NHEM) were cultured in Melanocyte Medium 2 (PromoCell, Heidelberg, Germany). Cells were treated with 8 µM cisplatin (Teva, Ulm, Germany) for 24 hours before protein or RNA was isolated.

RNA extraction from cells and FFPE

Cells were harvested from culture dishes and RNA was prepared using the RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA from FFPE was isolated using the High Pure FFPE RNA Micro Kit (Roche, Mannheim, Germany). The RNA concentration and purity was determined with the NanoDrop system (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

DNA extraction from cells and p53 sequencing

Cells were harvested from culture dishes and DNA was isolated using the DNeasy-Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and purity was determined with the NanoDrop system (Thermo Fischer). For sequencing (Eurofins, Ebersberg, Germany) *TP53* exons 5–8 were amplified with KAPA SYBR[®] FAST (Kapa Biosystems, Woburn, United States) using 60 ng DNA. The following *TP53* primers were used: exon5 for 5'-atctgttcactgtgccctg, rev 5'-aaccagccctgt cgtctctc, exon 6 for 5'-agggtccccaggcctctgat, rev 5'-caccctaacccctcctccc, exon7 for 5'-ccaaggcgactg gcctcatc, rev 5'-cagaggctggggcacagcagg, exon8 for 5'-ttcctactgcctcttgctt, rev 5'-tgtcctgcttgcttacctcg.

Quantitative real-time PCR

250 ng of total RNA was reverse transcribed using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, NY, USA) or the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) for cultured cells or FFPE sections, respectively. QPCR was performed using KAPA SYBR[®] FAST (Kapa Biosystems) and primers from the QuantiTect Primer Assay (Qiagen). Results were evaluated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. A fold difference equal or larger than 2 was estimated to be statistically significant.

Protein extraction and western blotting experiments

Total protein extraction was performed using cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany) according to the manufacturer's instructions. The protein concentration in the supernatant was determined with a Bradford assay. Western blotting was performed using 15 µg protein per sample, which were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred on a polyvinylidene fluoride membrane (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) by electroblotting. Antibodies were incubated in 5% non-fat milk in TBST (0.1% Tween-20, 20 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7.6) overnight at 4°C. Proteins were detected with antibodies against p53 (DO-7, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany), p21 Waf1/Cip1 (12D1), Puma (D30C10), Gadd45a (D17E8), Bax (D2E11), CDK1 (8G10) (Cell Signaling Technology, Danvers MA, United States) and Mdm2 (SMP14, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) using the biotechnology SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher, Rockford IL, USA).

Immunohistochemistry

FFPE tumour sections (2.5–3 µm) were stained with antibodies against p53 (DO-7, Dako), p21 (9L524), GADD45A, HIPK2, MDM2 (US Biological, Massachusetts, USA), CDK1 (EPR165), PUMA (EP512Y), BAX (E63) (Epitomics, Burlingame, CA, USA) and visualized with the Bond Polymer Refine Detection Kit (Leica, Nussloch,

Germany). A positive staining was defined as greater than 10% stained cells. Tissues with known expression of the respective antigens were used as positive controls.

FUNDING

Authors did not receive any third party funding.

FINANCIAL DISCLOSURE

All authors state no financial disclosures.

CONFLICTS OF INTEREST

All authors state no conflict of interest.

REFERENCES

1. Godar DE. Worldwide increasing incidences of cutaneous malignant melanoma. *J Skin Cancer*. 2011; 2011:858425.
2. Lourenço SV, Bologna SB, Hsieh R, Sanguenza M, Fernandes JD, Nico MM. Establishment and characterization of an oral mucosal melanoma cell line (MEMO) derived from a longstanding primary oral melanoma. *Am J Dermatopathol*. 2013; 35:248–251.
3. Gavriel H, McArthur G, Sizeland A, Henderson M. Review: mucosal melanoma of the head and neck. *Melanoma Res*. 2011; 21:257–266.
4. Lengyel E, Gilde K, Remenár E, Esik O. Malignant mucosal melanoma of the head and neck. *Pathol Oncol Res*. 2003; 9:7–12.
5. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417:949–954.
6. Edwards RH, Ward MR, Wu H, Medina CA, Brose MS, Volpe P, Nussen-Lee S, Haupt HM, Martin AM, Herlyn M, Lessin SR, Weber BL. Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J Med Genet*. 2004; 41:270–272.
7. Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:2301s–2307s.
8. Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:559–570.
9. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005; 353:2135–2147.
10. Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J. A melanoma molecular disease model. *PLoS One*. 2011; 6:e18257.
11. Kandath C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MD, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013; 502:333–339.
12. Gwosdz C, Scheckenbach K, Lieven O, Reifemberger J, Knopf A, Bier H, Balz V. Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer*. 2006; 118:577–582.
13. Brooks CL, Gu W. New insights into p53 activation. *Cell Res*. 2010; 20:614–621.
14. Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao XD, Chew JL, Lee YL, Kuznetsov VA, Sung WK, et al. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*. 2006; 124:207–219.
15. Dumaz N, Milne DM, Meek DW. Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. *FEBS Lett*. 1999; 463:312–316.
16. Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:15209–15214.
17. Tront JS, Hoffman B, Liebermann DA. 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*. 2006; 66:8448–8454.
18. Wang P, Yu J, Zhang L. The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:4054–4059.
19. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004; 303:1010–1014.
20. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Seipp CA, Einhorn JH, White DE, Steinberg SM. Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b. *J Clin Oncol*. 1999; 17:968–975.

21. Knopf A, Plettenberg C, Pickhard A, Bas M, Reifenberger J, Bier H, Balz V. Analysis of the functional integrity of the p53 tumor-suppressor gene in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2011; 21:380–388.
22. Lee SP, Shimizu KT, Tran LM, Juillard G, Calcaterra TC. Mucosal melanoma of the head and neck: the impact of local control on survival. *Laryngoscope.* 1994; 104:121–126.
23. Furney SJ, Turajlic S, Stamp G, Nohadani M, Carlisle A, Thomas JM, Hayes A, Strauss D, Gore M, van den Oord J, Larkin J, Marais R. Genome sequencing of mucosal melanomas reveals that they are driven by distinct mechanisms from cutaneous melanoma. *J Pathol.* 2013; 230:261–269.
24. Avery-Kiejda KA, Bowden NA, Croft AJ, Scurr LL, Kairupan CF, Ashton KA, Talseth-Palmer BA, Rizos H, Zhang XD, Scott RJ, Hersey P. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC Cancer.* 2011; 11:203.
25. Prasad ML, Patel SG, Shah JP, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ. Prognostic significance of regulators of cell cycle and apoptosis, p16(INK4a), p53, and bcl-2 in primary mucosal melanomas of the head and neck. *Head Neck Pathol.* 2012; 6:184–190.
26. Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 1999; 274:36031–36034.
27. Gu B, Zhu WG. Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int J Boil Sci.* 2012; 8:672–684.
28. Blagosklonny MV. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene.* 1997; 15:1889–1893.
29. Zhang J, Chen X. Posttranscriptional regulation of p53 and its targets by RNA-binding proteins. *Curr Mol Med.* 2008; 8:845–849.
30. VanderBorghet 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.* 2006; 25:6672–6677.
31. Poremba C, Yandell DW, Metzger D, Kamanabrou D, Bocker W, Dockhorn-Dworniczak B. Immunohistochemical detection of p53 in melanomas with rare p53 gene mutations is associated with mdm-2 overexpression. *Oncol Res.* 1995; 7:331–339.
32. Oliver TG, Meylan E, Chang GP, Xue W, Burke JR, Humpton TJ, Hubbard D, Bhutkar A, Jacks T. Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop. *Mol Cell.* 2011; 43:57–71.
33. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:793–805.
34. Skaftnesmo KO, Prestegarden L, Micklem DR, Lorens JB. MicroRNAs in tumorigenesis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007; 8:320–325.
35. Jiang F, Zhao W, Zhou L, Liu Z, Li W, Yu D. MiR-222 Targeted PUMA to Improve Sensitization of UMI Cells to Cisplatin. *Int J Mol Sci.* 2014; 15:22128–22141.
36. Lakhter AJ, Sahu RP, Sun Y, Kaufmann WK, Androphy EJ, Travers JB, Naidu SR. Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation. *J Invest Dermatol.* 2013; 133:2247–2254.
37. Haydn JM, Hufnagel A, Grimm J, Maurus K, Schartl M, Meierjohann S. The MAPK pathway as an apoptosis enhancer in melanoma. *Oncotarget.* 2014; 5:5040–5053.
38. Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J.* 2012; 18:142–147.
39. Turri-Zanoni M, Medicina D, Lombardi D, Ungari M, Balzarini P, Rossini C, Pellegrini W, Battaglia P, Capella C, Castelnovo P, Palmedo G, Facchetti F, Kutzner H, Nicolai P, Vermi W. Sinonasal mucosal melanoma: Molecular profile and therapeutic implications from a series of 32 cases. *Head Neck.* 2013; 35:1066–1077.
40. Blagosklonny MV. Paradox of Bcl-2 (and p53): why may apoptosis-regulating proteins be irrelevant to cell death? *BioEssays.* 2001; 23:947–953.
41. Karst AM, Dai DL, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene.* 2005; 24:1111–1116.
42. Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature.* 2001; 409:207–211.
43. Amaravadi RK. PUMA: a puzzle piece in chloroquine's antimelanoma activity. *J Invest Dermatol.* 2013; 133:2133–2135.