



Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Klinikum rechts der Isar

p53 Signalweg in Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen

Marie Kristin Fritsche

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Kilian Eyerich

Prüfende/-r der Dissertation

1. apl. Prof. Dr. Andreas Knopf

2. Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Die Dissertation wurde am 03.09.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.04.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Einleitung	6
2.1 Kutane Melanome	6
2.1.1 Einteilung	6
2.1.2 Epidemiologie.....	7
2.1.3 Ätiologie und Pathogenese	7
2.1.4 Prognose und Therapie	8
2.2 Schleimhautmelanome	9
2.2.1 Einteilung	9
2.2.2 Epidemiologie.....	10
2.2.3 Ätiologie und Pathogenese	10
2.2.4 Prognose und Therapie	10
2.2 Cisplatin	11
2.3 Der Tumorsuppressor p53	13
2.4 p53-vermittelte Apoptose	14
2.5 Zellzyklus und die Rolle von p53	16
2.6 DNA-Reparaturmechanismen als Antwort auf die Behandlung mit Cisplatin	18
2.7 PUMA	20
2.7.1 PUMA Proteinabbau	20
2.8 miRNA	21
3. Fragestellung	23
4. Material und Methoden	24
4.1 Geräte	24
4.2 Verbrauchsmaterialien	25
4.3 Chemikalien	26
4.4 Assays, Enzyme, Kits und Marker	27
4.5 Software	29
4.6 Antikörper	30
4.7 Primer	31
4.8 Arbeitsvorbereitungen	32
4.9 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	32
4.9.1 Verwendete Zelllinien	32
4.9.2 Auftauen, Einfrieren und Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	33
4.9.3 miRNA Inhibition.....	34
4.9.4 Kristallviolett färbung	34

4.9.7 Zytometrische Analyse des Zellzyklus.....	35
4.10 Arbeiten mit Proteinen.....	36
4.10.1 Herstellung von Ganzzellextrakten	36
4.10.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels des Bradford Assays.....	36
4.10.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
4.10.4 Western Blot.....	38
4.10.5 Immundetektion mittels Antikörpern	39
4.10.6 Strippen der Membran.....	40
4.11 Arbeiten mit Nukleinsäuren	40
4.11.1 DNA Isolation mittels DNeasy.....	40
4.11.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen	41
4.11.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	41
4.11.4 Sequenzierung von DNA.....	42
4.11.5 RNA Isolierung mittels RNeasy® Mini Kit.....	42
4.11.6 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA-Lösungen.....	42
4.11.7 cDNA-Synthese	43
4.11.8 Quantitative Real- Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	43
4.11.9 RT ² Profiler™ PCR Array.....	44
4.11.10 Isolation von miRNA	46
4.11.11 cDNA-Synthese für miRNA.....	46
4.11.12 qRT-PCR für miRNA Proben	47
4.12 Klinische Untersuchungen	48
4.12.1 Patientenselektion.....	48
4.12.2 Immunhistochemie	48
4.12.3 Statistische Auswertung	49
5. Ergebnisse	50
5.1 Die Behandlung mit Cisplatin zeigt eine grundsätzliche Induzierbarkeit von p53 in Schleimhautmelanomen	50
5.2 Die Behandlung mit Cisplatin zeigt eine grundsätzliche Induzierbarkeit von p53 in kutanen Melanomen	53
5.3 Cisplatin führt in Schleimhautmelanomen nicht zur Induktion von Apoptose	56
5.4 Cisplatin führt in kutanen Melanomen nicht zur Induktion von Apoptose	58
5.5 Cisplatin führt zur Verschiebung des Zellzyklus in Schleimhautmelanomen	60
5.6 Cisplatin führt zur Verschiebung des Zellzyklus in kutanen Melanomen	63
5.7 Die Cisplatin-Behandlung hat keine Auswirkung auf die DNA-Reparatur in Schleimhautmelanomen	65

5.8 Die Cisplatin-Behandlung hat keine Auswirkung auf die DNA-Reparatur in kutanen Melanomen	67
5.9 In den untersuchten Zelllinien ist keine <i>BBC3</i> Mutation vorhanden	69
5.10 Die geringe PUMA Expression in Schleimhautmelanomen ist mit einer schlechten Prognose assoziiert.....	70
5.11 <i>BBC3</i> mRNA weist eine niedrige Stabilitätsdauer auf	71
5.12 miR-221 und miR-222 sind für die geringe PUMA Expression verantwortlich	74
6. Diskussion.....	77
6.1 p53 ist in kutanen und mukosalen Melanomen funktionell integer	77
6.2 Die Behandlung mit Cisplatin verlangsamt das Wachstum von kutanen und mukosalen Melanomen	81
6.3 DNA-Reparatur Mechanismen zeigen nach Cisplatin Behandlung ein geringes Ansprechen	84
6.4 miR-221 und miR-222 spielt eine Rolle bei der PUMA Regulation in Schleimhautmelanomen	86
6.4 Ausblick	91
7. Zusammenfassung	93
8. Abstract	94
9. Referenzen.....	95
10. Anhang	111
10.1 RT ² Profiler™ PCR Array Human Cell Cycle	111
10.2 RT ² Profiler™ PCR Array: Human DNA Repair	113
10.3 Vergleichende epidemiologische und Tumorrelevante Charakteristika der kutanen Melanom- und Schleimhautmelanom-Kohorte.....	115
11. Danksagung.....	116
12. Eidesstattliche Erklärung	117
13. Publikationen	118

1. Abkürzungsverzeichnis

(P)	Phospho-
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
Δ	delta
A	Ampere
A	Adenin
aa	Aminosäure
Ago	Argonaute
AK	Antikörper
AP-1	Activator Protein1 (Genname <i>JUN</i>)
Apaf-1	<i>apoptosis protease-activating factor 1</i>
APS	Ammonium Persulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATG	<i>Autophagy related gene</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related Protein</i>
b	Base
Bafi	Bafilomycin
BAX	<i>BCL-2-associated X protein</i>
<i>BBC3</i>	<i>BCL2 Binding Component 3</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BER	Basen-Exzisions Reparatur
BH3	BCL-2 Homologie Domäne
bp	Basenpaar
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal
CDC2	<i>cell-division cycle protein2</i>
CDK	<i>cyclin-dependend kinase</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A (Proteinname p21)</i>

Abkürzungsverzeichnis

CDKN2A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHK2	Checkpoint Kinase 2
Cip/Kip	<i>CDK interacting protein/kinase inhibitory protein</i>
Cis	Cisplatin
Ck2	Casein Kinase 2
CKI	CDK inhibitor
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
CTR-1	<i>High Affinity Copper Uptake Protein 1</i>
Da	Dalton
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
DDB	<i>damage specific DNA binding protein</i>
DDR	<i>DNA damage repair</i>
DFF	DNA Fragmentierungsfaktor
DMEM	<i>Dulbecco 's modified Eagles medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	<i>deoxyribonucleotide</i>
dsDNA	Doppelstrang DNA
dT	Deoxythymine
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoG	Endonuklease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCC1	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 1</i>
EtOH	Ethanol
Exo1	Exonuklease 1
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin

Abkürzungsverzeichnis

G1	Gap1-Phase
G2	Gap2-Phase
GADD45A	<i>Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha</i>
h	human
HDAC	<i>histone deacetylase</i>
HMT	<i>histone methyltransferase</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HRR	<i>homologous recombination repair</i>
IgG	Immunglobulin G
INF- α	Interferon α
M	Molar
M	Mitose
MDM2	<i>transformed mouse 3T3 cell double minute 2</i>
MHL1	MutL Homolog 1
miRNA	microRNA
MM	Maligne Melanom der Haut
MMR	<i>Mismatch</i> Reparatur
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MuM	Mukosales Melanom/Schleimhautmelanom
MW	Molekulargewicht
n	nano (10^{-6})
N-terminal	Amino-terminal
NER	Nukleodit Exzisions Reparatur
NF κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
OD	optische Dichte
p53	Tumorprotein p53 (Genname <i>TP53</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	<i>poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)</i>
PAX	Paired Box 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>

Abkürzungsverzeichnis

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
Pen/Strep	Pennicilin/Streptomycin
pH	negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	DNA Polymerase delta
pRB	phospho- Retinoblastoma Protein
pre-miRN	<i>precursor miRNA</i>
pri-miRNA	<i>primary miRNA</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription PCR</i>
Rb	Retinoblastoma Protein
RCF	<i>replication factor C</i>
RE	reponsives Element
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Synthese-Phase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	Thymin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIIH
US	<i>United States</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
UV- Strahlung	Ultraviolettstrahlung
XPA	<i>Xeroderma Pigmentosum complementation Group A</i>

Abkürzungsverzeichnis

XPC	<i>Xeroderma Pigmentosum complementation Group C</i>
XRCC1	<i>x-ray repair cross complementing group 1</i>
δ	Delta
ε	Epsilon
ζ	Zeta
κ	Kappa
μ	mikro (10^{-6})

2. Einleitung

2.1 Kutane Melanome

Melanome entstehen aus Entartungen der Melanozyten. Diese pigmentbildenden, aus der Neuralleiste hervorgehenden Zellen sind in der Basalschicht (*Stratum basale*) der Epidermis lokalisiert (Chudnovsky et al., 2005). Sie haben eine dendritische Morphologie, die dabei hilft, das endogen produzierte Pigment Melanin an die umgebenden Keratinozyten abzugeben. Stimuliert wird die Melaninproduktion durch verschiedene intrinsische und extrinsische Faktoren wie zum Beispiel hormonelle Veränderungen und UV-Licht. Die Lichtabsorbierende Eigenschaft des Melanins unterstützt die Thermoregulation und schützt vor negativen Einflüssen des UV-Lichts (D'Mello et al., 2016).

Während eines Stufenprozesses entwickeln sich atypische Melanozyten über ein auf die Epidermis beschränktes *Melanoma in situ* zu einem malignem Melanom, welches sich dann mehr vertikal über die epidermalen Grenzzonen ausbreitet und sich über die Infiltration in Blut- und Lymphgefäßen Tumorzellen in andere Organe ausbreiten kann (Gaggioli and Sahai, 2007).

2.1.1 Einteilung

Histologisch wurde das maligne Melanom entsprechend der pathologischen Merkmale in vier Hauptgruppen unterteilt: superfiziell spreitende Melanome, noduläre Melanome, Lentigo-maligna-Melanome sowie akral-lentiginöse Melanome (Scolyer et al., 2011). Das am häufigsten auftretende superfiziell spreitende Melanom ist charakterisiert durch ein langsames radiales Wachstum und unregelmäßige Pigmentierung mit unscharfer Abgrenzung (Shashanka and Smitha, 2012, Hasney et al., 2008). Im Gegensatz dazu weisen noduläre Melanome eine klare Abgrenzung auf (Smoller, 2006). Diese aggressivste Form demonstriert seltener eine radiale Wachstumsphase als vielmehr ein schnelles vertikales Voranschreiten. Die beste Prognose haben Patienten mit einem Lentigo-maligna-Melanom. Diese sehr seltene Form des Melanoms ist auf die Epidermis beschränkt. Das akral-lentiginöse Melanom wird am häufigsten bei afrikanisch stämmigen Amerikanern diagnostiziert und tritt an Handfläche und Fußsohle auf (Hasney et al., 2008). Im Kopf-Hals-Bereich treten kutane Melanome

vorwiegend im Gesicht und dort bevorzugt an der Wange auf. Seltener sind sie an Kopfhaut oder Nacken lokalisiert (Shashanka and Smitha, 2012).

2.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des kutanen Melanoms steigt jährlich um 3-7% für die kaukasische Weltbevölkerung. Diese im Vergleich zu anderen Tumorentitäten starke Steigerung ist auf eine frühere und bessere Erkennungsrate, durch ein gesteigertes öffentliches Bewusstsein und auf eine steigende Exposition durch natürliches oder künstliches UV-Licht zurückzuführen (Erdei and Torres, 2010). Am häufigsten tritt das kutane Melanom bei der weißen Bevölkerung in stark sonnenexponierten Ländern wie Australien und Neuseeland auf. In Europa ist der Durchschnitt auf 14 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner gestiegen (Rockberg et al., 2016). In den USA erhöhte sich die Inzidenz in den letzten Jahren auf bis zu 35 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern (Berwick et al., 2016, Thierauf et al., 2015, Lengyel et al., 2003). Das durchschnittliche Erkrankungsalter des kutanen Melanoms liegt bei 40-60 Jahren, die Geschlechterverteilung ist ausgeglichen (Vidwans et al., 2011).

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Initiation des abnormalen Wachstums ist hauptsächlich auf Schädigungen der DNA durch UV-Strahlung zurückzuführen. Die durch UV-Strahlung verursachten C>T Basen- oder CC>TT Tandembasenaustausche sind jedoch nur für eine Untergruppe, dem superfiziell spreitendem Melanom beschrieben, wenngleich epidemiologische Studien für alle kutanen Melanome UV-Strahlung als Risikofaktor beschrieben haben (Brash et al., 1991, Hutchinson, 1994). Einige Studien korrelieren andere Umwelteinflüsse, wie z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Benzole, andere Chemikalien aus der Print-Industrie oder ionisierende Strahlung, mit der Entstehung des Melanoms. Als Risikofaktoren gelten multiple Nävi, atypische Nävi und das Nävuszellensyndrom sowie Hellhäutigkeit und Sommersprossen. Aber auch genetische Aberrationen in dem zellzyklusregulierendem Gen *CDKN2A*, oder Defekte bei DNA-Reparaturgenen, insbesondere bei *Xeroderma pigmentosum*, spielen eine Rolle (Berwick et al., 2016). Die Identifizierung von molekularen Veränderungen, die den Melanomen einen Wachstums- und Überlebensvorteil bringen, sind vielfältig untersucht worden. Studien konnten zeigen, dass in 40-60% aller Melanome eine Mutation in *BRAF*

vorliegt, wobei die *missense* Mutation V600E die häufigste in metastasierenden Melanomen ist. Weitaus weniger häufig kommen Alterationen in *NRAS* oder *PI3K* vor. Die Rolle des Tumorsuppressors p53 ist in kutanen Melanomen stark diskutiert. Während eine veränderte Expressionsrate des p53 Proteins Mutationen vermuten lässt, zeigen Sequenzanalysen keine Mutationen im p53 Genlocus (Liu and Sheikh, 2014, Gwosdz et al., 2006).

2.1.4 Prognose und Therapie

Die Prognose für Patienten mit kutanem Melanom, vor allem bei früher Erkennung, ist mit einer mittleren 5-Jahresüberlebensrate bei 81-85% sehr gut (Lengyel et al., 2003). Dennoch wird dem kutanen Melanom auf Grund der Entstehung von lokoregionalen und Fern-Metastasen ein hohes malignes Potential zugewiesen (Mervic, 2012). Die primäre Therapieoption beim kutanen Melanom ist die Exzision, entsprechend der jeweiligen Tumordicke mit unterschiedlichem Sicherheitsabstand, um die Lokalrezidivrate zu verkleinern und die Tumorfreiheit zu erreichen (Mario Santinami, 2013, Rager et al., 2005). Das Melanom gilt als strahlenresistenter Tumor, weshalb der Strahlentherapie keine größere Bedeutung zukommt. Jedoch kann diese in bestimmten Fällen, bei denen der chirurgische Eingriff begrenzt erfolgreich war, oder dieser selbst eine hohe Morbidität verursacht, angewendet werden. In Kombination mit systemischer Therapie oder Chirurgie findet diese Therapieoption zur Behandlung von Hirnmetastasen Anwendung (Bhatia et al., 2009, Khan et al., 2011). Unter allen Chemotherapie-Optionen ist Dacarbazin das einzige Medikament mit Zulassung der US-FDA (*United States Food and Drug Administration*) (Tarhini and Agarwala, 2006). Zusätzlich zu Dacarbazin können Chemotherapien mit Taxan, Vindesin und Cisplatin durchgeführt werden. Diese Alternativen weisen allein, aber auch in Kombination, nur ein sehr geringes Ansprechen auf (Liu and Sheikh, 2014). Des Weiteren wird die Gabe von hohen Dosen Interferon für die Behandlung des kutanen Melanoms vorgeschlagen. Auf Grund der positiven Auswirkungen auf die 5-Jahresüberlebensrate, das krankheitsspezifische und Gesamtüberleben gibt es keine verfügbaren Alternativen, welche das Gesamtüberleben im gleichen Maße verbessern könnten (Ascierto et al., 2017). In ca. der Hälfte der Melanomfälle liegt eine aktivierende *BRAF* Mutation vor, bei der zu 90% die Punktmutation V600E vorhanden ist (Ascierto et al., 2012). In diesem Fall ist eine Behandlung mit dem *BRAF*-Inhibitor Vemurafenib möglich. Seit einigen Jahren werden Antikörper gegen CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*; z.B. Ipilimumab) oder der PD-1 (*programmed cell death*

1 protein; z.B. *Nivolumab*) erfolgreich als Immuntherapie angewendet (Maverakis et al., 2015). Darüber hinaus konnte die Behandlung mit dem PD-1 Inhibitor Nivolumab, einer der ersten FDA zugelassenen Immuntherapie-Wirkstoffe, für metastatische oder nicht operierbare kutane Melanome gute Erfolge erzielen (Lugowska et al., 2018). So verlängerte sich das Gesamtüberleben durch Behandlung mit Ipilimumab auf 19,9 Monate und auf 37,6 Monate durch Behandlung mit Nivolumab. Für Patienten, welche eine Kombinationstherapie aus Ipilimumab und Nivolumab erhielten konnte ein deutlich längeres Gesamtüberleben beobachtet werden. Dieses lag wesentlich über dem Follow-up Zeitraum von minimal 36 Monaten (Wolchok et al., 2017).

2.2 Schleimhautmelanome

Während das Vorkommen der Melanozyten in der Haut durch die vor UV-Licht schützende Funktion erklärt wird, ist dies für die Schleimhäute weniger evident. Jedoch können beispielsweise Melanozyten ab der 20. Woche der Embryonalentwicklung in der oralen Mukosa gefunden werden (Lourenco et al., 2014). Die Funktion ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Man weist den Melanozyten in den Schleimhäuten antimikrobielle und immunologische Funktionen zu, so zum Beispiel Antigenpräsentation und Zytokin-Produktion (Mackintosh, 2001).

2.2.1 Einteilung

Zusätzlich zu den in 2.1.1 beschriebenen Hauptgruppen der Melanome gibt es weniger häufigere Subtypen, zu denen unter anderem das Schleimhautmelanom zählt. Diese können nahezu an allen mukosalen Geweben entstehen (Mihajlovic et al., 2012). Jedoch sind über die Hälfte der Fälle im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert (Kruse et al., 2010). Im Kopf-Hals-Bereich sind die Nasenhöhle, die Nasennebenhöhle und die Mundhöhle bevorzugt betroffen (Ascierto et al., 2017). Der Großteil der Patienten weist bei sinusalen Melanomen eine auf den Primarius beschränkte Erkrankung auf. Lymphknotenmetastasen, als auch Fernmetastasen sind trotz des häufig fortgeschrittenen Tumorstatus selten. Bei Auftreten von Fernmetastasen sind diese vielfältig lokalisiert, z.B. in der Lunge, den Knochen, dem Gehirn und der Haut (Fritsche et al., 2015, Thierauf et al., 2015, Mendenhall et al., 2005).

2.2.2 Epidemiologie

Mukosale Melanome stellen mit 1,5 Erkrankungen pro 1 Millionen Einwohner in Europa eine sehr seltene Untergruppe der Melanome dar (Ascierto et al., 2017). Damit sind nur ca. 1,4 % aller Melanome als Schleimhautmelanom klassifiziert wurden. Die Inzidenz für das Schleimhautmelanom steigt mit zunehmendem Alter, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter zwischen 60 und 70 Jahren liegt. Frauen sind dabei häufiger betroffen als Männer (Thierauf et al., 2015). Interessanterweise korreliert die Inzidenz invers zum kutanen Melanom. So ist die Inzidenz für das mukosale Melanom in Gebieten mit hohem Vorkommen des kutane Melanoms niedrig und umgekehrt (Bradley, 2006).

2.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Während die Ätiologie für das kutane Melanom hinreichend etabliert wurde, ist dies für das Schleimhautmelanom sehr unzureichend erforscht, was wesentlich auf die Seltenheit der Erkrankung zurückzuführen ist (Tanaka et al., 2001). Dennoch gibt es Studien, welche Gene und Signalwege identifizieren, die an der malignen Transformation beteiligt sind. So werden *NRAS* Mutationen für sinunasale oder die Beteiligung des Ras/Mek/Erk Signalweges für orale Schleimhautmelanome beschrieben (Ascierto et al., 2017, Amit et al., 2017). Am häufigsten werden Aberrationen in c-Kit beschrieben, die interessanterweise in kutanen Melanomen eine untergeordnete Bedeutung haben (Satzger et al., 2008). Allgemein ist die Mutationslast in Schleimhautmelanome fünf- bis zehnfach geringer als in kutanen Melanomen (Furney et al., 2013). Im Gegensatz zu den kutanen Melanomen sind mukosale Melanome nicht mit UV-Strahlung assoziiert. Jedoch werden inhalierte Karzinogene, wie Tabakrauch oder Formaldehyd durch industrielle oder berufliche Exposition als Risikofaktoren diskutiert (Lopez et al., 2016, Ascierto et al., 2017).

2.2.4 Prognose und Therapie

Das Schleimhautmelanom stellt eine aggressive Erkrankung mit einer schlechten Prognose dar. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt nur 20% (Ascierto et al., 2017). Eine klinische Erklärung ist die hohe Lokalrezidivrate, welche auf eine erschwerte chirurgische Resektion

mit engen Nachbarschaftsbeziehungen zu Hirn, Augenhöhle und Schädelbasis zurückzuführen ist (Fritsche et al., 2015, Moreno and Hanna, 2010). Eine generelle standardisierte Therapie gibt es für das Schleimhautmelanom auf Grund der Seltenheit der Erkrankung nicht (Spencer and Mehnert, 2016). Ein klarer Vorteil postoperativer Strahlentherapie ist bei widersprüchlichen Ergebnissen verschiedener Studien nicht erkennbar, wobei eine erhöhte lokale Kontrolle angenommen wird (Moreno and Hanna, 2010). Auf Grund der fehlenden standardisierten Therapieempfehlungen orientiert sich die medikamentöse Behandlung mit Zytostatika am malignen Melanom der Haut. Hinsichtlich der erhöhten c-Kit Mutationsrate in Schleimhautmelanomen ist eine Therapie mit Tyrosinkinase Inhibitoren, wie z.B. Imatinib, Dasatinib und Nilotinib möglich (Ascierto et al., 2017). Ebenso wie für das kutane Melanom konnte Nivolumab, in Kombination mit Ipilimumab, ein gutes Ansprechen für Schleimhautmelanoma aufweisen (Yde et al., 2018). Trotz der sich weiterentwickelnden therapeutischen Möglichkeiten wurde keine Verbesserung im Überleben dieser Patienten erreicht (Lazarev et al., 2014).

2.2 Cisplatin

Cisplatin ist eines der wirksamsten Antitumormedikamente (Siddik, 2003). Das Medikament platinum diamminodichloride (*cis*-platinum; DPP) hat eine klinische Wirkung auf eine Vielzahl solider Tumore (Williams and Whitehouse, 1979, Siddik, 2003). Die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle geschieht über den Kupfer Transporter CTR-1 (*High Affinity Copper Uptake Protein 1*), dessen genetischer Knockout zur Cisplatin Resistenz führt (Dasari and Tchounwou, 2014). Der neutrale quadratisch-planare Komplex mit zweiwertigem Platin enthält zwei labile Chloridgruppen sowie zwei inerte Aminliganden (Abbildung 1 A). Hauptsächlich wirkt Cisplatin auf die DNA. Bei der Bindung von Cisplatin an die DNA werden die Chlorid-Liganden durch Guanin substituiert, wobei das Platinatom eine kovalente Bindung mit der N⁷ Position der Purinbase eingeht (Abbildung 1 B). Die dabei entstehenden Inter- und Intrastrang Vernetzungen führen zur Veränderung der DNA-Struktur und verhindern das Ablesen der DNA durch Polymerasen und DNA-Reparaturenzyme (Basu and Krishnamurthy, 2010). Neben der dadurch inhibierten DNA-Replikation und des daraus resultierenden Zelltods wirkt Cisplatin auf weitere Mechanismen. Diese beinhalten die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und den dadurch vermittelten oxidativen Stress, Zellzyklus-Arrest, Herunterregulation von Protoonkogenen und anti-apoptischen Proteinen

sowie die Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Signalweges (Dasari and Tchounwou, 2014). Die selektive Wirkung von Cisplatin bzw. DNA schädigenden Agenzien auf Tumorzellen und nicht auf normale Zellen begründet sich in den geschwächten Zellzyklus-Kontrollpunkten und der damit einhergehenden reduzierten Sensitivität gegenüber proliferationsinhibierenden Signalwegen. Dadurch können Tumorzellen, im Gegensatz zu normalen Zellen, unter proliferationslimitierenden Bedingungen ihren Zellzyklus nicht anhalten, um die DNA-Replikation vor der Toxizität DNA schädigender Agenzien zu schützen (Shi et al., 2012).

In Melanomen erreicht die Behandlung mit der Einzelgabe von Cisplatin in Serum-Konzentrationen nur eine Ansprechrates von 10-20% (Bhatia et al., 2009, Yang and Chapman, 2009). Dabei korrelieren Dosen über 80mg/m² mit einer geringeren und Dosen darüber mit einer erhöhten Ansprechrates. Dosen über 150mg/m² sind nicht mehr mit einer verbesserten Ansprechrates assoziiert (Yang and Chapman, 2009). Um den Therapieerfolg zu verbessern, sind verschiedene Kombination mit Vinblastine, Dacarbazine oder INF α 2-b möglich (Megahed and Koon, 2014).

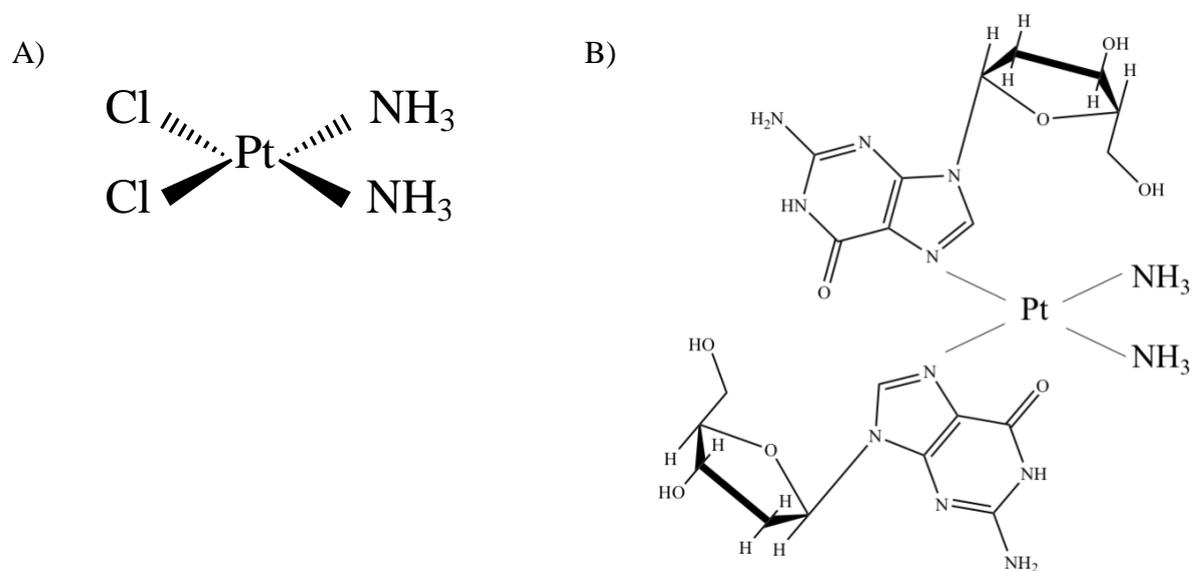


Abbildung 1: Chemische Struktur von Cisplatin. A) Der Komplex besteht aus zweiwertigem Platin mit zwei Chloridgruppen und zwei Aminliganden. B) Substitution der Chloridliganden durch kovalente Bindung der N⁷ Position des Guanins in der DNA.

2.3 Der Tumorsuppressor p53

Das p53 Protein wurde 1979 das erste Mal beschrieben und ist noch heute Mittelpunkt zahlreicher zellbiologischer und onkologischer Forschungsgruppen. Der „Wächter des Genoms“ war der erste beschriebene Tumorsuppressor und spielt auf Grund seiner Funktionen eine bedeutende Rolle in der Tumorbilogie. Der p53-Kontrolle unterliegen zahlreiche Gene, welche Funktionen wie DNA-Replikation, Apoptose, Zellzyklus-Regulation, Seneszenz, Angiogenese, Immunantwort, Zelldifferenzierung, Zell-Motilität und Migration regulieren (Oren, 1999, Menendez et al., 2009, Lane, 1992). Das Protein besteht aus einer aminoterminalen Transaktivierungsdomäne (TAD), welche in die zwei Subdomänen TAD1 und TAD2 aufgeteilt werden kann. Daran schließt sich eine Prolin-reiche Region, an welche sich die DNA bindende Domäne anreicht. Vor der letzten Domäne, der Carboxy-terminalen regulatorischen Domäne befindet sich die Tetramerisationsdomäne (Joerger and Fersht, 2010). Das humane p53 Gen (*TP53*) enthält nur einen Promoter und kodiert durch alternatives Splicing an Exon 9 für drei Splice-Varianten. Insgesamt wird p53 durch 11 Exons kodiert (Bourdon et al., 2005). Innerhalb des *TP53* Promotors befinden sich Binde-Motive für verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1 (*Activator Protein 1*), PAX (*Paired Box 1*), E2F1 und NFκB (*Nuclear Factor Kappa B*) (Saldana-Meyer and Recillas-Targa, 2011). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die *TP53*-Transkription und damit die *TP53* mRNA-Konzentration zur S-Phase ansteigt, um auf mögliche DNA-Schäden während der S-Phase schnell zu reagieren (Reisman et al., 2012). Während die Induktion des Tumorsuppressors durch transkriptionelle, post-transkriptionelle und post-translationale Mechanismen (PTM) nach DNA-Schäden vermittelt werden kann, ist die Aktivierung von p53 durch post-translationale Modifikationen und den damit einhergehenden Funktionen entscheidend (Kruse and Gu, 2009, Menendez et al., 2009). Eine Reihe von Modifikationen, welche unter anderem Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und Neddylierung beinhalten, regulieren an den verschiedenen Domänen diverse Funktionen, wie die Translokation, Stabilisierung, Antirepression, transkriptionelle Aktivierung und DNA-Bindung (Gu and Zhu, 2012). Primär wird Serin 15 als erstes Ziel der DNA-Schädigungsantwort durch die Proteinkinasen ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) und ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related Protein*) phosphoryliert. Dies wiederum aktiviert die Interaktion mit Acetyltransferasen, welche durch Acetylierung von Lysinresten die Ubiquitinierung inhibieren und damit zur p53-Stabilisierung beitragen. Darüber hinaus löst die Serin 15 Phosphorylierung eine Reihe weiterer Phosphorylierungen aus, welche an

der Aktivierung mitwirken. Hieraus ergibt sich die bedeutende Rolle der Serin 15 Phosphorylierung bei der Aktivierung von p53 (Loughery et al., 2014). Primär agiert p53 als Transkriptionsfaktor, in dem er als Tetramer an die responsiven Elemente (RE) der Zielgene bindet. Die ersten beschriebenen Zielgene von p53 waren *CDKN1A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*), *GADD54A* (*Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha*) und *MDM2* (*transformed mouse 3T3 cell double minute 2*), zu denen bis heute über 3500 weitere hinzugekommen sind (Fischer, 2017). MDM2 ist Teil verschiedener Feedback loops und spielt somit eine bedeutende Rolle bei der p53-Aktivierung (Harris and Levine, 2005). Der MDM2-p53 Feedback loop reguliert die p53-Funktion durch die p53-induzierte MDM2-Expression, welche wiederum als Ubiquitin Ligase den proteasomalen Abbau von p53 vermittelt (Nag et al., 2013).

2.4 p53-vermittelte Apoptose

Die Apoptose ist ein von den Zellen selbst gesteuerter Zelltod, welcher eine entscheidende Funktion bei der Gewebemöostase während der Entwicklung und des Alterns übernimmt. Darüber hinaus agiert die Apoptose als Abwehrmechanismus bei Immunreaktionen, Erkrankungen oder Kontakt mit schädlichen Agenzien. Es ist eine Vielzahl an Stimuli und Agenzien bekannt, welche Apoptose induzieren. Dazu gehören viele konventionelle Chemotherapeutika oder auch die Strahlentherapie, welche die p53 vermittelten Apoptose Signalwege aktivieren. Dieser wird als intrinsischer Signalweg bezeichnet, welcher im Vergleich zu dem Todesrezeptor vermitteltem extrinsischem Signalweg die Mitochondrien mit einbezieht (Elmore, 2007). Die Behandlung von Zellen mit Cisplatin kann den intrinsischen Apoptose-Signalweg induzieren (Abbildung 2).

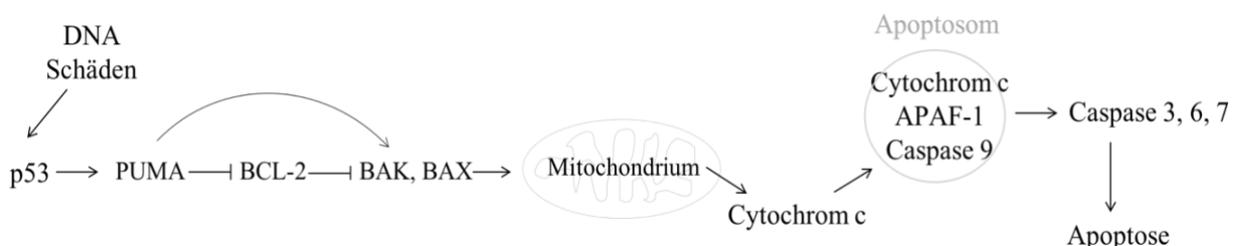


Abbildung 2: vereinfachte Darstellung des intrinsischen p53-vermittelten Apoptose Signalweges.

Nach Induktion von DNA-Schäden wird p53 aktiviert, welches wiederum als Transkriptionsfaktor die Expression von PUMA induziert. PUMA aktiviert direkt oder indirekt durch die Inhibierung des anti-apoptotischen BCL-2 die pro-apoptotischen Proteine BAK und/oder BAX. Diese verursachen die Cytochrom c Freisetzung aus dem Mitochondrium, woraufhin das Apoptosom durch Bindung von Cytochrom c, Apaf-1 und Caspase 9 gebildet wird. Dadurch wird die Aktivierung von Caspase 9 verursacht und die Spaltung und Aktivierung der Caspasen 3,6 und 7 initiiert. Damit werden die DNA-Fragmentierung und der Zelltod eingeleitet.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Zellen auf die Schädigungen der DNA durch Cisplatin mit der Aktivierung der Proteinkinase ATR reagieren, welches indirekt über CHK2 (Checkpoint Kinase 2) oder direkt p53 an Serin 15 phosphoryliert und zu dessen Aktivierung beiträgt (Damia et al., 2001, Pabla et al., 2008). p53 aktiviert als Transkriptionsfaktor unter anderem die Expression einer Reihe von Genen der BCL-2 Familie, wie z.B. *BAX (BCL-2 Associated X)*, *NOXA* und *BBC3 (BCL-2 Binding Component 3, PUMA)*, welche den intrinsischen Apoptose Signalweg dominieren (Haupt et al., 2003). Noxa spielt in den meisten Fällen eine untergeordnete Rolle. Dahingegen ist PUMA nahezu für die gesamte pro-apoptotische Funktion von p53 verantwortlich. Primär aktiviert es indirekt die pro-apoptotischen Proteine BAX und/oder BAK, in dem es an anti-apoptotische Proteine der BCL-2 Familie, wie z.B. BCL-2, BCL-X_L und Mcl-1, bindet. Eine direkte Aktivierung von BAX und/oder BAK wurde ebenfalls beschrieben (Yu and Zhang, 2008). Diese Proteine oligomerisieren nach ihrer Aktivierung und bilden Poren in der äußeren mitochondrialen Membran, welche Cytochrom c freisetzen (Westphal et al., 2011). Nach der *mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)* und der Ausschüttung des Cytochrom c aus dem Zwischenmembranraum ins Zytoplasma, stimuliert Cytochrom c zusammen mit dATP (Deoxyadenosintriphosphat) die Oligomerisierung des Apoptosoms. Dieser Proteinkomplex besteht aus Cytochrom c und Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*), welche Caspase 9 über die in beiden Proteinen vorhandenen Caspase Rekrutierungsdomänen (CARD) rekrutieren. Es bilden sich Caspase 9 Homo- und Heterodimeren, welche einer Spaltung unterliegen. Die gespaltene Caspase 9 ist dann primär für die Aktivierung der unterhalb liegenden Caspase 3 verantwortlich (Wu et al., 2016). Auch Caspase 7 wird von Caspase 9 initiiert, hat aber keine weitere spaltende Funktion. Caspase 3 dagegen führt die Kaskade weiter durch proteolytische Spaltung und Aktivierung der Caspasen 2 und 6. Zusätzlich kann Caspase 3 als positiver Feedback loop die Prozessierung von Caspase 9 weiter fördern. In der weiteren Caspase-Kaskade katalysiert Caspase 6 die Aktivierung von Caspase 8 und 10 (Logue and Martin, 2008). Ein weiteres Kennzeichen der

Apoptose ist die Spaltung und Aktivierung von PARP (*poly (ADP-ribose) polymerase-1*), welche durch nahezu alle Caspasen ausgeführt werden kann. Das kleinere der beiden dabei entstehenden Fragmente bindet irreversibel an eingekerbte DNA und inhibiert DNA-Reparaturenzyme (Chaitanya et al., 2010). Schlussendlich wird die DNA Fragmentierung initiiert, welche durch die Nukleasen EndoG (*Endonuclease G*) und DFF (DNA Fragmentierungsfaktor) ausgeführt wird (Kitazumi and Tsukahara, 2011). Eine Änderung der Zellmorphologie wird sichtbar. Die Zelle schrumpft zusammen und verliert den Kontakt zu ihren Nachbarzellen bis sie in die membranumschlossene Vesikel, den *apoptotic bodies*, fragmentiert und schließlich von Makrophagen aufgenommen wird (Saraste and Pulkki, 2000).

2.5 Zellzyklus und die Rolle von p53

Sich teilende Zellen durchlaufen eine Reihe verschiedener Phasen, welche in die Mitose und die Interphase gegliedert sind. Die Mitose (M-Phase), dem Prozess der nuklearen Teilung wird in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase geteilt. Die Interphase wiederum besteht aus drei Abschnitten. Somit gliedert sich die Zeitspanne zwischen zwei Mitosen in Gap1 (G1)-, Synthese (S)- und Gap2 (G2)- Phase. Die beiden Gap-Phasen dienen der Vorbereitung auf die DNA-Synthese (G1), welche in der S-Phase stattfindet sowie der Vorbereitung auf die Mitose (G2) (Vermeulen et al., 2003). Die korrekte Progression durch diese Phasen wird durch Kontrollpunkte überwacht, um rechtzeitig Defekte, die bei der DNA-Synthese und der Chromosomensegregation auftreten können, festzustellen. Treten diese auf, werden die Kontrollpunkte aktiviert und es kommt zu einem Zellzyklusarrest, um die Defekte zu beheben. Bei zu großen Defekten oder unzureichender Reparatur unterziehen sich die Zellen der Apoptose oder der Seneszenz. Die Seneszenz beschreibt einen Status des irreversiblen Zellzyklusarrests (Malumbres and Barbacid, 2009, Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Das Fortschreiten des Zellzyklus wird durch die CDKs (*cyclin dependent kinases*) reguliert. Für deren Aktivität ist die Bindung einer regulatorischen Untereinheit, den Cyclinen, notwendig. Sie regulieren Phasen-spezifisch den Zyklus und werden entsprechend synthetisiert und degradiert, während die CDK-Proteinkonzentrationen über den gesamten Zellzyklus stabil bleiben (Malumbres and Barbacid, 2009, Vermeulen et al., 2003). Für den Eintritt in die G1-Phase ist die CDK4 und CDK6 Aktivierung durch Cyclin D1, D2, D3 notwendig. Der Übergang von der G1-Phase zur S-Phase wird durch Cyclin E- CDK2 reguliert, während die Bindung von Cyclin A an CDK2 in der S-Phase benötigt wird. In der

späten G2- und frühen M-Phase bindet Cyclin A an CDK1, um den Eintritt in die Mitose voranzutreiben, wobei die weitere Progression von Cyclin B-CDK1 reguliert wird (Vermeulen et al., 2003). Der Tumorsuppressor p53 spielt eine Rolle im G1/S, als auch im G2/M Kontrollpunkt (Senturk and Manfredi, 2013) (Abbildung 3). Als Transkriptionsfaktor initiiert er die Expression des CDK-Inhibitors p21, welcher die Aktivität von Cyclin E-CDK2 und Cyclin A-CDK2, welche für die G1/S Transition notwendig sind, inhibiert. Dadurch bleibt Rb (Retinoblastoma Protein) hypophosphoryliert und der Transkriptionsfaktor E2F1 an diesen gebunden. E2F1 reguliert die Expression von Genen, die für den Übergang von G1- in die S-Phase notwendig sind, vermitteln. (Cazzalini et al., 2010). Die Inhibierung der G2/M Transition erfolgt durch p53 Zielgene. p21 und Gadd45 (*growth arrest and DNA Damage-inducible 45 alpha*) inhibieren den Cyclin B-CDK1 Komplex, welcher das für den G2/M Übergang notwendige CDC25C phosphoryliert und aktiviert. Außerdem führt die Bindung von 14-3-3 σ an CDC25C zur Relokalisierung von CDC25C ins Zytoplasma, was wiederum den Cyclin B -CDK1 Komplex vor Dephosphorylierung schützt und dadurch einen G2 Arrest verursacht. Die transkriptionelle Repression von CDC25C und Cyclin B durch p53 wurde ebenso beschrieben. (Senturk and Manfredi, 2013, Donzelli and Draetta, 2003).

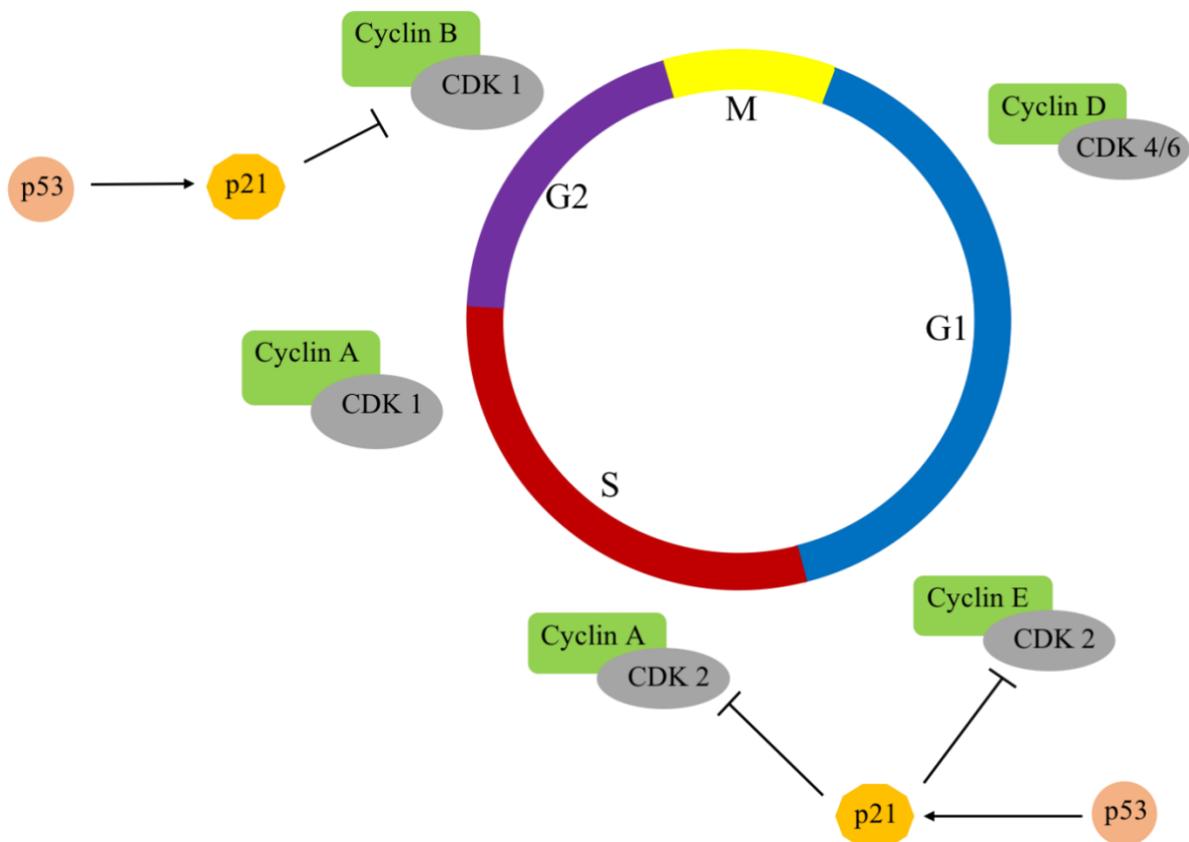


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Zellzyklus und der p53 Kontrollpunkte. Für den Eintritt in die G1 Phase ist Cyclin D-CDK4/6 verantwortlich. Der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase wird durch Cyclin E-CDK2 reguliert. In der S-Phase wird Cyclin A-CDK2 und für den Austritt aus dieser in die G2-Phase Cyclin A-CDK1 benötigt. Für den Übergang von der G2-Phase in die Mitose ist Cyclin B-CDK1 verantwortlich. Die Kontrollpunkte G1/S und G2/M können durch p53 reguliert werden. Die p53 vermittelte Expression von p21 führt zu Inhibition von CDK2, wodurch der Übergang in die S-Phase und dessen Progression inhibiert wird. Darüber hinaus führt p21 zur Inhibition von Cyclin B-CDK1 und somit zum G2-Arrest.

2.6 DNA-Reparaturmechanismen als Antwort auf die Behandlung mit Cisplatin

Die Integrität und Stabilität der DNA ist für die Aufrechterhaltung der Vitalität der Zelle entscheidend. Zellen haben verschiedene DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, um sich vor DNA-Schäden zu schützen. Diese sind notwendig während der normalen Zellzyklusprogression, da DNA-Schäden während der Replikation, Kondensierung und Dekondensierung entstehen können (Hustedt and Durocher, 2016). Aber auch als Schutz vor genotoxischen Einflüssen, wie z.B. Cisplatin, spielen die DNA-Reparaturmechanismen eine wichtige Rolle.

Cisplatin ist eines von vielen DNA-schädigenden Mitteln, welches als Chemotherapeutikum für verschiedene Krebsentitäten eingesetzt wird. Die Antitumoraktivität von Cisplatin beruht auf der Interaktion mit DNA. Jedoch wird die Effektivität des Chemotherapeutikums auch von der Fähigkeit der Zellen auf DNA-Schäden zu reagieren bestimmt. Die durch Cisplatin verursachten Inter- und Intrastrang Vernetzungen stören die DNA-Replikation, Transkription und führen zur Zerstörung deren Struktur, was von Proteinen erkannt wird, die die Reparaturmechanismen aktivieren. Da hauptsächlich Inter- und Intrastrang Vernetzungen durch die Cisplatin-Behandlung entstehen, wird in erster Linie die Nukleotid Exzisions Reparatur (NER), aber auch der *Mismatch* Reparatur Signalweg (MMR) initiiert (Basu and Krishnamurthy, 2010). Die NER beginnt mit der Erkennung der DNA-Läsion durch die Proteinkomplexe XPC-Rad23B (*Xeroderma Pigmentosum complementation Group C-Rad23B*) und DDB1-DDB2 (*damage specific DNA binding protein*) (Ray et al., 2013). Anschließend interagiert TFIIH (Transkriptionsfaktor IIH) mit diesem Komplex und öffnet mit seiner Untereinheit XPB die DNA, so dass XPD entlang der DNA den Schaden und dessen chemische Modifikation aufspüren kann. Das geschieht mit Hilfe der ATPase-Aktivität der Untereinheiten XPB und XPA. Es erfolgt die Rekrutierung von RPA, welches den unbeschädigten DNA-Strang umhüllt. Die Rekrutierung des ERCC1-XPF (*Excision Repair Cross-Complementation Group 1-XPF*) Komplexes durch Interaktion mit XPA führt

zum Einschneiden der DNA an der 5'-Seite. Die DNA-Reparatur wird dann durch Pol δ und Pol κ oder Pol ϵ (DNA Polymerase) und dessen assoziierten Faktoren initiiert. Die DNA-Polymerasen werden durch PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) rekrutiert. Daraufhin wird der DNA-Strang an der 3'-Seite durch XPG geschnitten. Der beschädigte Abschnitt wird innerhalb eines 20-22 Nukleotid langen Fragments entfernt. Die Reparatur wird abgeschlossen durch die Auffüllung der entstandenen Lücke durch Pol δ und Pol κ oder Pol ϵ und der anschließenden Ligation der geschnittenen Enden durch DNA-Ligase 1 oder DNA-Ligase 3 (Scharer, 2013, Marteijn et al., 2014). Der MMR Signalweg, welcher normalerweise durch Erkennung nicht übereinstimmender Basen (Mismatch) die Zellviabilität erhöht, ist mit einer Cisplatin-vermittelten Zytotoxizität assoziiert (Basu and Krishnamurthy, 2010). Die Erkennung des Mismatch erfolgt durch MutS, welcher MutL rekrutiert. Der Komplex fährt entlang der DNA bis er auf eine einzelsträngige DNA-Lücke stößt, an welcher PCNA und RFC (*replication factor C*) gebunden sind. RFC wird daraufhin abgelöst und dies erlaubt die Rekrutierung von Exo1 (Exonuklease 1). Exo1 degradiert den DNA-Strang im Bereich des Mismatch. Nachdem die fehlgepaarte DNA ausgeschnitten ist, erfolgt die Neusynthese des Stranges mit Hilfe der DNA-Polymerase komplementär zum gegenüberliegenden Strang (Martin et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen mit kompetenter MHL1 (MutL Homolog 1) Expression sensitiver auf Cisplatin reagiert haben. Der Cisplatin induzierte Zelltod wurde zurückgeführt auf eine Proteolyse von MHL1 und daraus resultierender Caspase Aktivierung (Basu and Krishnamurthy, 2010). XRCC1 (*x-ray repair cross complementing group 1*) ist ein Regulator der DNA-Doppelstrangreparatur, welcher eine Rolle bei der NER und der Basen-Exzisionsreparatur (BER) einnimmt (Xu et al., 2014). Im Vergleich zur NER, bei dem defekte einzelsträngige Nukleotidfragmente repariert werden, werden vom BER kleine Nukleobasenläsionen korrigiert. XRCC1 wird dabei benötigt, um die DNA-Doppelstrangbrüche zu stabilisieren (Kim and Wilson, 2012). Eine Antwort auf die Induktion von DNA-Schäden durch Cisplatin kann mit XRCC1 assoziiert werden, da eine erhöhte XRCC1 Expression mit einer erhöhter Cisplatin-Resistenz in Verbindung gebracht wurde (Xu et al., 2014). RAD51 ist ein Protein, welches essentiell für die meiotische und mitotische Rekombination ist. Es spielt jedoch auch eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination (Augusto Nogueira, 2011). Ebenso wie XRCC1 ist RAD51 an der Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden beteiligt, da RAD51 mit einer Cisplatin-Resistenz assoziiert werden konnte (Adam-Zahir et al., 2014, Huang and Mazin, 2014).

2.7 PUMA

Der *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) wurde 2001 von Nakano et al. identifiziert. Er wurde als Protein beschrieben, welches eine BH3 (BCL-2 Homologie) Domäne und eine hohe apoptotische Aktivität besitzt (Nakano and Vousden, 2001). Damit wurde er der Gruppe der BCL-2 Familie zugeordnet, deren Mitglieder sich in der Anzahl der BCL2-Homologie Domänen unterscheiden. Der Genlocus enthält drei kodierende Exons und zwei nicht kodierende Exons. Die PUMA Expression ist normalerweise sehr niedrig, wird aber sehr schnell als Antwort auf verschiedene Stress Stimuli induziert. Der Transkriptionsfaktor p53, welcher am häufigsten als PUMA Induktor genannt wird, bindet als Tetramer an die beiden p53-reponsiven Elemente im PUMA Promotor, wodurch die Acetylierung von Histonen zur Öffnung der Chromatinstruktur initiiert und die Transkription aktiviert wird. Neben p53 sind p73, FoxO3a, CHOP, E2F1, CREB, c-Jun und andere an der Expression von PUMA beteiligt. Hauptsächlich wird die PUMA Aktivität durch Transkription reguliert und übernimmt nahezu vollständig die pro-apoptotische Funktion von p53 (Yu and Zhang, 2008). Neuere Studien zeigen, dass PUMA durch post-translationale Modifikation reguliert wird. Dabei spielt die Phosphorylierung von Serin 10 eine Rolle bei der Proteindegradierung, reduziert die pro-apoptotische Funktion und fördert das Zellüberleben (Fricker et al., 2010). PUMA ist der potenteste Apoptose Induktor unter allen Mitgliedern der BH3-Gruppe der BCL-2 Proteinfamilie, welche an die anti-apoptotischen Proteine der BCL-2 Familie binden und dadurch eine Freisetzung der pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK verursachen. Eine direkte Aktivierung von BAK und BAX durch PUMA und anderer BH3 Proteine wird auch beschrieben (Yu and Zhang, 2008, Vela et al., 2013, Westphal et al., 2011).

2.7.1 PUMA Proteinabbau

Auf Grund der pro-apoptotischen Aktivität von PUMA ist eine Regulation der Proteininstabilität durch Proteinabbau für die Zellviabilität interessant. Im Rahmen der Untersuchung zu PTMs konnte gezeigt werden, dass das Proteasom eine Bedeutung für die PUMA Stabilität hat (Fricker et al., 2010). Neuere Studien weisen nach, dass Autophagie die PUMA Konzentrationen in Cervixtumorzellen reduziert, um die mitochondriale Apoptose zu kontrollieren (Thorburn et al., 2014). Im Allgemeinen umschreibt der Begriff Autophagie den Abbau von zytoplasmatischen Komponenten im Lysosom. Jedoch umfasst die Autophagie

eine Vielzahl an physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen, unter anderem Anpassung an Nährstofflimitierte Bedingungen, intrazelluläre Abbau von Proteinen und Organellen, Eliminierung von Mikroorganismen, Zelltod, Tumorsuppression und Antigenpräsentation (Mizushima, 2007, Glick et al., 2010). Für Melanome konnte eine Beteiligung der Autophagie am PUMA Abbau nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Chloroquin, welchem eine Autophagie inhibierende Wirkung zugeschrieben wird, konnte die PUMA Expression aktiviert und Apoptose induziert werden (Lakhter et al., 2013, Amaravadi, 2013).

2.8 miRNA

miRNAs (microRNA) gehören zu den nicht-kodierenden RNAs. Die Produkte der miRNA sind kleine, ca. 20bp große Nukleotidsequenzen, welche als Antisense Regulatoren anderer RNAs fungieren (Ambros, 2001). Die miRNAs werden durch die RNA Polymerase II transkribiert (Cai et al., 2004). Die daraus entstandene pri-miRNA (*primary-miRNA*) wird im Zellkern durch die Endonuklease Drosha zur pre-miRNA (*precurser-miRNA*) prozessiert. Dabei wird die Haarnadelstruktur am Ende gespalten, so dass ein ca. 60-70bp langes Haarnadelfragment entsteht. Mit Hilfe von Exportin-5 wird dieses aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert und dort durch die Endonuklease DICER weiter zur *mature* miRNA bearbeitet. Der entstandene miRNA Doppelstrang wird in einen Ago (Argonaute) Proteinkomplex aufgenommen, um den *RNA-induced silencing complex* (RISC) zu bilden. In den meisten Fällen wird ein Strang abgebaut, so dass eine die einzelsträngige *mature* miRNA an mRNA (*messenger RNA*, 5p) binden kann. In einigen Fällen kann der komplementäre Strang (*passenger strand*, miRNA*, 3p) in den RISC Effektor Komplex eingebaut werden und bleibt dadurch funktional (Wahid et al., 2010). miRNAs regulieren die Expression verschiedener Gene, indem sie die Proteinexpression inhibieren. Sie binden Sequenzspezifisch an die 3' UTR (untranslatierte Region) der mRNA. Eine perfekte Komplementarität ist dabei nicht nötig und daher hat eine miRNA potentiell eine große Anzahl an Zielgenen. Die Inhibition der Proteinexpression erfolgt entweder durch Blockierung der Translation oder durch Degradierung der mRNA (Christopher et al., 2016, Macfarlane and Murphy, 2010). Sie übernehmen eine wesentliche Rolle bei der Regulierung verschiedener biologischer Prozesse, wie der Immunmodulation, der Kontrolle metabolischer Prozesse, in der Neuronalentwicklung, im Zellzyklus, der Muskeldifferenzierung und der Stammzellendifferenzierung (Christopher et al., 2016). Eine Störung der miRNA Expression

wurde für verschiedene Erkrankungen beschrieben. In Tumoren wurden diese Störungen vor allem auf die Assoziation von miRNAs mit SNP (*single nucleotide polymorphism*), epigenetischer Regulation der miRNA Expression und Defekte Signalweg der miRNA Biogenese zurückgeführt (Reddy, 2015). Fehlregulierte miRNAs können, je nach Zielgen, als Tumorsuppressor oder Onkogen fungieren. Diese beinhalten proliferative Signalgebung, das Ausbleiben der Wachstumsunterdrückung, Widerstand gegen den Zelltod, replikative Unsterblichkeit, die Aktivierung von Migration und Invasion und die Angiogenese (Peng and Croce, 2016).

3. Fragestellung

Schleimhautmelanome entstehen genau wie kutane Melanome aus Melanozyten. Sie unterscheiden sich durch ihre Lokalisation, wobei Schleimhautmelanome im Kopf-Hals-Bereich mit dem Sinunasaltrakt und der Mundhöhle bevorzugt betroffen sind. Im Vergleich zu kutanen Melanomen zeichnen sich die Schleimhautmelanome durch eine deutlich schlechtere Prognose aus. Klinisch wird diese Prognose auf Grund der schlechten Operabilität und hohen Lokalrezidivrate erklärt. Molekularbiologisch konnte bisher keine Begründung für die deutlich schlechtere Prognose gefunden werden. Ein besonderes Augenmerk liegt auf dem Wächter des Genoms p53. Während dieser in vielen soliden Tumoren mutiert ist und auch in Melanomen eine erhöhte Expression des p53 Proteins beschrieben wird, sind Mutationen in Melanomen selten. Und dennoch können insbesondere p53-ansprechende Chemotherapeutika das Überleben nicht verbessern. Bislang konnte gezeigt werden, dass die geringe Ansprechrate auf Apoptose induzierende Chemotherapeutika nicht auf Veränderungen der transkriptionellen Funktion von p53 zurückzuführen ist (Fritsche et al., 2015).

Ziel dieser Arbeit ist es dies zu bestätigen, Defekte in den Zelltod induzierenden Mechanismen aufzudecken und Auswirkungen der Chemotherapie auf den Zellzyklus und die DNA-Reparatur zu untersuchen.

4. Material und Methoden

4.1 Geräte

Blotapparatur	Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophoreseapparatur (vertikal)	Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH,
Elektrophoreseapparatur (horizontal)	Mini Horizontal Gel System, PerfectBlue™ Gel System Mini L	Peqlab (VWR Life Science Competence Center), Erlangen, Deutschland
Filmentwickler	ChemiDoc XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH,
Mikroskope	Mikroskop Leica DMI 6000B Leica DFC 425C	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Waage	Scaltec Rezeptureinwaage SBC21	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	5430R Rotor: FA - 45 - 30 – 11 F - 35 - 6 – 30 Universal 320R 5	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Thermocycler	CFX96™ C1000 Thermo Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
Tischzentrifugen	Universal 320R 5	Hettich GmbH & Co.KG,
Power Supply	Power Pac 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH
Wasserbad		GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Sterilwerkbank	Hera safe KS	Thermo Fisher Scientific
Wärmeschränke	CO2-Inkubator Hera Cell 150i Wärmeschränk	Thermo Fisher Scientific Binder GmbH, Tuttlingen

Material und Methoden

	Absaugpumpe Vacuubrand LE2	Vacuubrand GmbH & Co.KG, Wertheim, Deutschland
Multiwell Reader	Multiscan™ FC Microplate Photometer	Thermo Fisher Scientific
Pipetten	Peqette	PeqLab
Mikroskop	Leica DFC 425C	Leica Microsystems
pH-Messgerät	pH-Meter 766, Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Mischgeräte	Magnetrührer RCT basic	IKA Werke GmbH& Co. KG, Staufen, Deutschland
	MS2 Minishaker	IKA Werke GmbH& Co. KG,
	Taumel-Rollenmischer	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Durchflusszytometer	BD LSRFortessa™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
 <u>4.2 Verbrauchsmaterialien</u>		
Petrischalen		Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
PVDF Membran	Immobilon™-P membrane (0.45 µm) PVDF Western Blotting Membranes	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Reaktionsgefäße	0,5; 1,5 und 2 ml 15 und 50 ml 96-well low profile Platte PCR	Thermo Fisher Scientific SARSTEDT AG&Co. KG, Nümbrecht, Deutschland Bio-Rad Laboratories GmbH
Zellkultur Schalen	Cellstart® 100x20mm, und 6-& 24- well	Greiner Bio-One

Zellschaber	Zellschaber 39 cm	SARSTEDT AG&Co. KG
-------------	-------------------	--------------------

4.3 Chemikalien

3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Acrylamidlösung (30% ige)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Actinomycin D	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bafilomycin A1	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Vereinigte Staaten
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Coomassie Brilliantblau G-250	Serva Electrophoresis GmbH
Coomassie Brilliantblau R-250	Merck Millipore
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol 98% pa (EtOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck Millipore
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG
MG-132	Selleckchem, München, Deutschland
Milchpulver (~1% Fett)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
N,N,N',n'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumacetat (NaAc)	Carl Roth GmbH & Co. KG

Material und Methoden

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Nocodazole	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Penicillin-Streptomycin Lösung	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Propidium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure (HCl) 37%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris Base	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG
β -Mercaptoethanol	Merck Millipore

4.4 Assays, Enzyme, Kits und Marker

Enzyme	RNase A (DNase-free)	AppliChem GmbH
	Trypsin 0,5 %/EDTA (15400-054)	Life Technologies
HRP-Substrate	SignalFire™ ECL Reagent	Cell Signalling Technology (CST), Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Marker	Biotinylated Protein Ladder	CST
	GeneRuler™ 50bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Medien	Gibco® Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
	Gibco® RPMI 1640	Life Technologies
	Opti-MEM® I Reduced Serum Media	Life Technologies
	Melanocyte Growth Medium M2	PromoCell GmbH, Heidelberg Deutschland
	FCS (fetales Kälberserum)	Life Technologies

Material und Methoden

Nukleinsäureaufreinigung	RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
	DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH
PCR	M-MLV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific
	DNTP Polymerisation Mix	Roche, Mannheim
	KAPA SYBR® Fast Universal	Kapa Biosystems
	Taq Polymerase	Life Technologies
	Hexanukleotid mix 10x conc.	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
	First Strand Kit	Qiagen GmbH
	RT ² Profiler™ PCR Array: Human Cell Cycle PCR Array Human DNA Repair PCR Cycle	SABioscience Corporation, Qiagen GmbH
miRNA Isolation	miRNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH
miRNA qRT-PCR	miScript II RT Kit	Qiagen GmbH
	miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen GmbH
	miScript Primer Assays: Hs_miR-222_2 miScript Primer Assay Hs_RNU6-2_11 miScript Primer Assay	Qiagen GmbH
Transfektion	Lipofecamine™ RNAiMAX Transfection Reagent	Life Technologies
	mirVana™ miRNA Inhibitor, Negative Control #1	Life Technologies
	mirVana™ miRNA Inhibitor: hsa-miR-221-5p hsa-miR-222-5p	Life Technologies

Bestimmung Protein- konzentration	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH
	Quick Start Bovine Serum Albumin	Bio-Rad Laboratories GmbH
<u>4.5 Software</u>		
Leica Application Suite LAS V4.7		Leica Microsystems
Chemdraw Professional 16.0.0.82.		PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
FlowJo®		FLOWJO, LCC, BD Bioscience
Flowlogic™		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
GraphPad Prism		GraphPad Software, Inc., STATCON GmbH, Witzenhausen
ImageLab™ Software		Bio-Rad Laboratories GmbH
Photoshop CS5		Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
SnapGene		GSL Biotech LLC, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
SPSS 22		IBM, Armonk, New York, Vereinigte Staaten
Windows Office 2016		Microsoft Deutschland GmbH, München, Deutschland

4.6 Antikörper

4.6.1 Primäre Antikörper

	Hersteller	Verdünnung	Verdünnungs- lösung
Anti-Maus Tubulin	Cell Signaling Technology (CST)	1: 5 000	Milch
Anti- Kanninchen Caspase 3 (8G10)	CST	1: 1 000	Milch
Anti- Kanninchen Caspase 9	CST	1: 1 000	Milch
Anti- Kanninchen PARP	CST	1: 1 000	Milch
Anti- Kanninchen p53Ser15	CST	1: 500	BSA
Anti- Mausp53 (DO-7)	Dako Omnis	1: 2 000	Milch
Anti- Kanninchen p21 (12D1)	CST	1: 2 000	Milch
Anti- Kanninchen Rb pSer780 (84F6)	CST	1: 1 000	BSA
Anti- Kanninchen CyclinD1 (92G2)	CST	1: 1 000	Milch
Anti- Kanninchen CDC2	CST	1: 1 000	Milch
Anti- Kanninchen GADD45A	CST	1: 1 000	Milch
Anti- Kanninchen BCL-2 (50E3)	CST	1: 1 000	BSA
Anti- Kanninchen PUMA	CST	1: 2 000	Milch
Anti- Kanninchen BAX (D2E11)	CST	1: 2 000	Milch
Anti- Kanninchen ERCC1 (D6G6)	CST	1: 1 000	BSA
Anti- Kanninchen Cyclin B1 (D5C10)	CST	1: 1 000	Milch
Anti- Maus Cyclin E (HE12)	CST	1: 500	BSA
Anti- Maus Cyclin A2 (BF683)	CST	1: 1 000	BSA
Anti- Kanninchen Cyclin D1 (92G2)	CST	1: 1 000	BSA
Anti- Kanninchen Rad 51 (D4B10)	CST	1: 1 000	BSA
Anti- Kanninchen DDB2 (D4C4)	CST	1: 1 000	Milch
Anti- Kanninchen XPC (D1M5Y)	CST	1: 1 000	BSA
Anti- Kanninchen XRCC1	CST	1: 750	BSA
Anti- Kanninchen Lc3A/B (D3U4C)	CST	1: 1 000	BSA

4.6.2 Sekundäre Antikörper

	Hersteller	Verdünnung	Verdünnungs lösung
Anti-Mouse HRP	CST	1: 10 000	Milch
Anti-Rabbit HRP	CST	1: 5 000	Milch

4.7 Primer

		bp Fragment	Annealing Temperatur
<i>BBC3</i> Exon 2	for CACACACACCTCCACTCTTCTC rev CCTCTCTCTTCCCGGCTCCTAT	447	65°C
<i>BBC3</i> Exon 3	for CAGTGGCTGGGAAAGAGGG rev CAGCTGCCGCACATCTGG	367	65°C +5% DMSO
<i>BBC3</i> Exon 4 I	for TGG AATAGGGTGGGCGAGAC rev CAGCCTTTCCTGAGATGGTGG	554	65°C +5% DMSO
<i>BBC3</i> Exon 4 II	for CTGATGGACTCAGCATCGGAA rev ACTCACAAGCAGGGCTCAC	832	65°C +5% DMSO
<i>TP53</i>	Cat. No. QT00060235, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>MDM2</i>	Cat. No. QT00056378, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>HIPK2</i>	Cat. No. QT01184694, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>CDKN1A</i>	Cat. No. QT00062090, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>GADD45A</i>	Cat. No. QT00014084, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>BBC3</i>	Cat. No. QT00082859, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>BAX</i>	Cat. No. QT00031192, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>CASP 9</i>	Cat. No. QT00036267, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>BCL2A1</i>	Cat. No. QT00044646, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>CDC2</i>	Cat. No. QT00042672, Qiagen	nicht bekannt	60°C
<i>GAPDH</i>	Cat. No. QT01192646, Qiagen	nicht bekannt	60°C
Human Cell Cycle PCR Array	Cat. No. PAHS-020Z, SABioscience	-	60°C
Human DNA Repair PCR Array	Cat. No. PAHS-042Z, SABioscience	-	60°C

4.8 Arbeitsvorbereitungen

Die Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentrationen. Die Herstellung steriler Lösungen erfolgte durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren.

4.9 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile, Puffer, Medien, Lösungen sowie Verbrauchsmaterialien verwendet.

4.9.1 Verwendete Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre und, soweit nicht anders beschrieben, unter Zugabe von 10% FCS, 1% Pen/Strep sowie 1% Glutamin (alles von Biochrom, Berlin, Deutschland) kultiviert. Die Zelllinie COLO-849 (ACC 216) wurde aus einem rechten axillären Lymphknoten eines 43-jährigen kaukasischen Mannes mit metastatischem malignem Melanom etabliert. Die im adhären Monolayer wachsenden Zellen zeichnen sich durch fibroblastische Morphologie aus. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI-Medium. Die Zelllinie MEL-JUSO (ACC 74) wurde aus einem Primärtumor einer 58-jährigen Frau etabliert. Die adhären im Monolayer wachsenden Zellen zeigen eine epitheliale Morphologie. Sie wurden in DMEM kultiviert. Ähnliche Morphologie und Zellwachstum zeigt die Zelllinie IGR-37 (ACC 237), welche aus einer Lymphknotenmetastase eines 26-jährigen Mannes mit malignem Melanom etabliert wurde. Sie wurde ebenfalls in DMEM kultiviert. Aus einer subkutanen Metastase eines 67-jährigen Mannes wurde die epitheliale und als adhären Monolayer wachsende Zelllinie SK-MEL30 (ACC 151) etabliert, welche in DMEM kultiviert wurde. Die Zelllinie SK-MEL3 (ACC 321) entstammt einer Lymphknotenmetastase einer 42-jährigen Frau mit malignem Melanom. Konkordant zu den anderen Zelllinien weist diese ebenfalls eine epitheliale Morphologie und ein Wachstum als Monolayer auf. Diese wurde in RPMI kultiviert.

Die Zelllinien TU-MM1, TU-MM2, TU-MM3 und TU-MM4 wurden aus Tumorproben eines Schleimhautmelanoms etabliert. Die aus einer Tumorprobe eines 47-jährigen Mannes

stammende TU-MM1 sowie die aus einer Probe einer 56-jährigen Frau etablierte TU-MM2 wurden in DMEM kultiviert. TU-MM3 wurde aus einer Probe einer 86-jährigen Frau kultiviert und TU-MM4 aus einer Probe einer 72-jährigen Frau. Beide wurden in RPMI kultiviert. Normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) wurden von Promocell (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Sie wurden in *Melanocyte Growth Medium* M2, bestehend aus dem Wachstumsmedium, dem Supplement Mix (Promocell) sowie 1% Pen/Strep kultiviert. Die Glioblastom-Zelllinie einer 60-jährigen Frau LN229 (ATCC® CRL-211™) und die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie eines 44-jährigen Mannes UD-SCC5 (UD5) (Ballo et al., 1999) wurden als Kontrollen nicht melanozytärem Ursprungs verwendet.

4.9.2 Auftauen, Einfrieren und Kultivierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem schnellen Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad wurde der Inhalt der Kryoampulle auf eine 10cm Zellkulturschale mit 10ml Medium überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese nach dem Trypsinieren in 8ml Medium aufgenommen, gezählt und anschließend zentrifugiert (5min, 500g). Das Pellet wurde in FCS mit 5% DMSO gelöst, so dass $1-3 \times 10^6$ Zellen/ml in einem Volumen von 1ml pro Kryoampulle eingefroren werden konnte. Die Kryoampullen wurden über Nacht im Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Während der Kultivierung wurden die Zellen vor Erreichen der stationären Phase umgesetzt, um sie in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3-4ml PBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgt mit 2ml Tryp-LE (Invitrogen) für wenige Minuten bei 37°C. Zu der entstandenen Zellsuspension wurden 4 ml Medium zugefügt und die Zellen resuspendiert. In Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit und des Zelltyps wurden die Zellen auf neue Zellkulturschalen verdünnt.

4.9.3 miRNA Inhibition

Für die Inhibition der miRNAs miR-221 und miR-222 wurden die Invitrogen™ *mirVana*™ miRNA Inhibitoren sowie die *mirVana*™ miRNA Inhibitor, Negative Control#1 und Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) verwendet. Im 6-Well wurden 200.000 Zellen ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Dafür wurden 3µl miRNA Inhibitor (30µM) in 150µl in OPTI-MEM (Invitrogen) als auch 9µl Lipofectamine in 150µl OPTI-MEM verdünnt. Die beiden Verdünnungen wurden gemischt und 10min bei RT inkubiert. 1,2ml Medium wurde in ein 6-Well vorgelegt und anschließend 300µl Transfektionsreagenz dazugegeben. Die Endkonzentration der miRNA Inhibitoren im Well betrug 60nM. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre bis zur weiteren Verwendung.

4.9.4 Kristallviolett färbung

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurde die Kristallviolett färbung angewendet. Dieser Triphenylmethanfarbstoff wurde 1989 als eine Methode zur Zellzählung entwickelt (Saotome et al., 1989). Zuerst wurden 50.000 Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 8µM Cisplatin behandelt bzw. erfolgte die Messung für Tag 0. Für die Messungen zu den erforderlichen Zeitpunkten wurde das Medium abgesaugt und die verbleibenden lebenden und damit adhärenen Zellen mit 2ml 4%iger Formaldehydlösung pro Well für 20min bei RT fixiert. Anschließend werden die Zellen mit 2ml 0,1% Triton X-100 in PBS und nachfolgend mit 2-mal je 2ml Aqua dest. gewaschen. Die Färbung erfolgte für 30min bei RT mit 2ml Kristallviolett-Lösung pro Well. Nach Absaugen der Färbelösung wurden die Wells 3-mal mit 2ml Aqua dest. gewaschen, bevor die Zellen mit 2ml 1%iger SDS-Lösung für 1h auf dem Schüttler lysiert wurden. Nach vollständiger Lyse wurden 100µl der Suspension auf eine 96-Well Platte übertragen und die Extinktion bei 595nm mit dem Multiwell-Reader gemessen. Zur Hintergrundmessung wurde SDS-Lösung verwendet. Ausgewertet wird die Gesamtmenge des Farbstoffes, welche mit der Anzahl der lebenden Zellen korreliert.

Formaldehydlösung:	4% Formaldehyd in PBS
Tritonlösung:	0,1% Triton X-100 in PBS
Kristalviolett-Lösung:	0,04% Kristalviolett in 4% igem Ethanol in Aqua dest.
SDS-Lösung:	1% SDS in Aqua dest.

4.9.7 Zytometrische Analyse des Zellzyklus

Zur Untersuchung des Zellzyklus wurden die Zellen nach der Behandlung mit Cisplatin oder Nocodazol mit Propidiumiodid gefärbt und zytometrisch analysiert. Die Zellen wurden mit 60% Konfluenz im 6-Well ausgesät und für 24-74h mit 8 μ M Cisplatin behandelt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit 100ng/ml Nocodazol für 24h behandelt. Nocodazol inhibiert die Polymerisierung der Mikrotubuli und induziert dadurch einen G2/M Arrest (Blajeski et al., 2002). Nach der Behandlungszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in 500 μ l PBS gewaschen, mit 500 μ l Tryp-LE abgelöst und in 2ml Medium aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zellzählung. 1×10^6 Zellen wurden in ein 15ml Falcon überführt und abzentrifugiert (5min, 600g). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1ml kaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren (5min, 600g) wurden der Überstand abgesaugt und die Zellen in 300ml kaltem PBS aufgenommen. Im Anschluss wurden 700ml kalter 100%iger Ethanol dazugegeben und die Zellen sofort resuspendiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte bei -20°C für mindestens 3h. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut pelletiert (5min, 855g, 4°C) und in 198 μ l Färbelösung resuspendiert und 45min bei 4°C inkubiert. Vor der zytometrischen Analyse wurden 2 μ l Propidiumiodid (30 μ g/ml) zu den Zellen hinzugegeben. Pro Probe wurden 100.000 Zellen analysiert, wobei forward scatter (FCS), sideward scatter (SCC) sowie PI gemessen wurden. Die Daten wurden mit FlowJo ausgewertet. Dieses Programm analysiert anhand publizierter Algorithmen (Ormerod et al., 1987, Watson, 1987) das Fluoreszenzhistogramm und gibt die prozentualen Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen (G1, S, G2/M) an.

Färbelösung: 100 μ g/ml RNase A
0,005% Triton-X100 in PBS

4.10 Arbeiten mit Proteinen

4.10.1 Herstellung von Ganzzellextrakten

Zur Proteinisolierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde pro 10cm Schale 500µl Lysepuffer auf die Zellkulturschale gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen geerntet und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit auf Eis wurde das Lysat bei 4°C und 10.000g für 15min zentrifugiert. Die im Überstand gelösten Proteine wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

Lysepuffer: 1x Cell Lysis Buffer Buffer (Cell Signaling Technology) in Aqua dest.
100mM PMSF

4.10.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels des Bradford Assays

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der nach dem amerikanischen Biochemiker benannte Bradford-Test verwendet. Dieser beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-brilliant-Blau nach Bindung an kationische unpolare Seitenketten der Proteine auf 595nm (Bradford, 1976).

Für die Messung wurden 2µl Proteinlysate in 198µl PBS verdünnt und mit 200µl 0,001%-iger Triton X-100 Lösung in PBS gemischt. Anschließend wurden 600µl 1:4 in Aqua dest. verdünntes Bradford-Reagenz (Bio-Rad) zugegeben und durchgemischt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurden Proben mit 0µg, 2µg, 4µg, 6µg und 8µg BSA verwendet. Die 0,2mg/ml Stocklösung wurde entsprechend der benötigten Konzentration in einem Endvolumen von 400µl in 0,001%-iger Triton X-100 Lösung in PBS verdünnt. Die Proben der Standardkurve wurden ebenso mit 600µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurden je 200µl der Proben in eine 96-Well U-Bottom Platte überführt. Die Messung der Extinktion bei 595nm erfolgte im Multiwellreader (Thermo Fisher). Anhand der Standardkurve und den daraus ermittelten Extinktionswerten konnte die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

4.10.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Nachweis einzelner Proteine in einem Proteingemisch werden diese elektrophoretisch ihres Molekulargewichts nach aufgetrennt und anschließend mittels einer immunologischen Nachweisreaktion (Western Blot) visualisiert. Erstmals wurde die Auftrennung von Proteinen mittels des diskontinuierlichen SDS-PAGE von Laemmli beschrieben (Laemmli, 1970). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierten Bedingungen. Durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT), welches eine reduktive Spaltung der Disulfidbrücken induziert, und dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgehoben. Die Eigenladung der Proteine wird durch die negative Ladung des SDS aufgehoben, wodurch diese unabhängig ihrer Ladung im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts in Richtung Anode wandern. Die Proteine durchlaufen im senkrecht stehenden Gelsystem zwei unterschiedliche Polyacrylamidgele. Diese unterscheiden sich im pH-Wert. Das obenliegende Sammelgel konzentriert die Proteinlysate in einem schmalen Band. Anschließend bewirkt die Änderung des pH-Wertes im Trenngel die Auftrennung der Proteine. Durch Veränderung der Konzentration des Polyacrylamids im Trenngel kann die Porengröße variiert werden, so dass eine optimale Auftrennung in verschiedenen Molekulargewichtsbereichen gegeben ist.

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

Die Proteinlysate wurden mit 5x-Ladepuffer versetzt und bei 95°C 10min denaturiert. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert (30sec, 500g, RT) und 15µg Proteinlysate pro Probe auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese startete zu Beginn mit 80V um sicherzustellen, dass sich die Proteine im Sammelgel in einem Band fokussieren.

Anschließend konnte die Auftrennung bei einer elektrischen Spannung von bis zu 150V fortgesetzt werden.

5x Ladepuffer: 10% SDS
50% Glycerol
250mM DTT
0,05% Bromphenol-Blue
mit Aqua dest. auf 10ml auffüllen, aliquotieren
Lagerung bei -20 °C

10xSDS-Laufpuffer: 250mM Tris
1,92M Glycine
1% SDS
mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen, Lagerung bei RT

4.10.4 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots werden die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen, um anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert zu werden. Die durch das SDS hervorgerufene negative Ladung der Proteine ermöglicht den Proteinen im elektrischen Feld aus der Gelmatrix hinaus Richtung Anode zu wandern und diese damit auf eine Membran zu übertragen.

Die hier verwendete Semi-Dry Blot Methode erlaubt den Transfer von Proteinen zwischen zwei horizontalen Plattenelektroden. Die dafür verwendeten Membranen und Filterpapiere (Whatman-3MM Chromatographiepapier) wurden auf die benötigte Größe zugeschnitten. Für das diskontinuierliche Puffersystem werden sechs Filterpapiere mit Anodenpuffer I, drei Filterpapiere mit Anodenpuffer II und neun Filterpapiere mit Kathodenpuffer getränkt. Zur Aktivierung der Membran wird diese für ca. 5min in 100%igem Methanol inkubiert und anschließend in Anodempuffer II äquilibriert. Der Blot wurde von Anode aus beginnend mit sechs Anodenpuffer I getränkten Filterpapieren, drei Anodenpuffer I getränkten Filterpapieren, Membran, Gel und neun Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren von unten nach oben aufgebaut. Anschließend wurde ein zum Gel senkrecht gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine in Richtung Anode auf die PVDF-Membran übertragen

werden. Der Semi-Dry Blot erfolgte 1h 20min bei 225mA, wobei sich die Stromstärke aus der Größe des Gels errechnet (max. 5mA/cm²).

Anodenpuffer I: 0,3M Tris
20% Methanol
mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen, Lagerung bei RT

Anodenpuffer II: 25mM Tris
20% Methanol
mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen, Lagerung bei RT

Kathodenpuffer: 25mM Tris
20% Methanol
40mM amino-n-caprioic-acid
mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen, Lagerung bei RT

4.10.5 Immundetektion mittels Antikörpern

Diese sensitive Nachweismethode für Proteine beruht auf der Reaktion zwischen einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) mit seinem Antigen (Protein). Ein gegen den Primärantikörper gerichteter enzymgekoppelter Sekundärantikörper ermöglicht die Visualisierung. Zusätzlich zur hohen Sensitivität der Enzymreaktion führt die Verstärkung des entstehenden Signals durch Bindung mehrerer Sekundärantikörper an den Primärantikörper zu einer hohen Spezifität des Nachweises.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Primärantikörper in Kombination mit geeigneten Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern verwendet. Die Primärantikörper wurden entweder in 5% Magermilchpulver (Biomol) in TBST oder in 5% BSA (Carl Roth) in TBST verdünnt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in der Primärantikörperlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST für 7min auf dem Schwenktisch erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 2h bei 4°C. Die Membran wurde erneut dreimal für 7min mit TBST gewaschen um anschließend für die Nachweisreaktion mit dem SignalFire™ Plus ECL Reagent (Cell Signaling Technology) verwendet werden zu können. Dafür wurde die Membran in einer Lösung bestehend aus

gleichen Anteilen der Lösungen A und B eine Minute inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde anschließend mit dem Imager (Bio-Rad) detektiert.

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

4.10.6 Strippen der Membran

Das Strippen der Membran ermöglicht eine erneute Immundetektion, nachdem der Antikörper der ersten Immundetektion von der Membran entfernt worden war. Hierzu wurde die Membran zweimal 10min mit Stripping Puffer auf dem Schwenktisch inkubiert und anschließend zweimal 10min mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die erneute Inkubation mit Antikörper bis zur Detektion mit dem Imager.

Stripping Puffer:	10% Methanol 10% Eisessig 80% Aqua.dest.
-------------------	--

Mit der ImageLab™ Software (Bio-Rad) wurde die Intensität der Banden ermittelt und für die Quantifizierung verwendet.

4.11 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.11.1 DNA Isolation mittels DNeasy

Für die Isolierung von DNA aus Zellen wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Vor Beginn der Arbeiten wurde den Puffern AW1 und AW2 100%-iges Ethanol zugefügt. Die zuvor pelletierten Zellen wurden in 200µl PBS resuspendiert. Nach der Zugabe von 20µl Proteinase K und 15sec Vortexen erfolgte eine 10-

minütige Inkubation bei 56°C. Anschließend wurden 200µl 100 %igem Ethanol dazugegeben, gevortext, auf die Säule gegeben und bei 8000rpm eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach Zugabe von 500µl AW1 Puffer auf die Säule wurde erneut bei 8000rpm für eine Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem AW2 Puffer wiederholt. Hierbei wurde jedoch bei 14.000rpm für drei Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein 1,5ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 200µl AE Puffer gefüllt. Die DNA wurde dann durch Zentrifugieren bei 8000rpm für eine Minute eluiert.

4.11.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen

Mittels der spektralphotometrischen Messung mit Hilfe des Nanodrop (Thermo Fisher) kann die Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen bestimmt werden. Die Konzentration wird durch die Absorption bei 260nm bestimmt. Eine Verunreinigung der Lösung durch Proteine wird durch den Quotient OD260/OD280 ermittelt. Ein Wert um 1,8 spricht für ausreichend reine DNA.

4.11.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, aber auch PCR-Produkten wird eine Agarosematrix verwendet (Southern, 1979). Abhängig von der Größe der zu detektierenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,5 bis 2,0% in 1xTBE (UltraPure™ TBE Buffer 10x, Invitrogen™), verdünnt in A. dest., verwendet. Dafür wurde die entsprechende Menge Agarose (LE Agarose, Biozym) in 1xTBE gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde das Gel in die Form gegossen. Als Laufpuffer wurde 1-fach konzentrierter TBE Puffer verwendet. 8µl Probe wurden vor dem Beladen auf das Gel mit 2µl FluoDNA Gel Stain (Promocell) versetzt. Zum Abschätzen der DNA-Fragmentlängen wurde zusätzlich zu den Proben ein Größenmarker aufgetragen. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgt durch UV-Licht (312nm) im Geldokumentationsgerät (E-BoX VX2/20M, Peqlab).

4.11.4 Sequenzierung von DNA

Die Proben wurden zu MWG Eurofins zur Sequenzierung gesendet. Dafür wurden unaufgereinigte PCR Produkte sowie die entsprechenden Primer eingeschickt. Für die PCR wurde 2x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix verwendet. Das enthaltene SYBR Green interferiert nicht mit der Sequenzierungsreaktion.

4.11.5 RNA Isolierung mittels RNeasy® Mini Kit

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen) verwendet. Vor Beginn der Arbeiten wurde der RPE Puffer 1:5 mit 100%-igem Ethanol verdünnt. Der Lysepuffer wurde mit 1% Mercapthoethanol versetzt. Das Medium wurde von den Zellkulturschalen gesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 150µl Lysepuffer pro Well einer 6-Well Platte oder 500µl pro 10cm Schale bei RT für 10min inkubiert. Das Lysat wurde mit Hilfe von Zellschabern (SARSTEDT AG&Co. KG) von den Schalen gekratzt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Dem Lysat wurde 1 Volumen 70%-igen Ethanols zugefügt und die Lösung mittels Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Max. 700µl des Lysats wurden auf die Säule pipettiert. Diese wurde bei 12.000rpm für 15s bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule mit 700µl RW1 Puffer versetzt. Nach dem Zentrifugieren für 15s bei 12000rpm wurde die Säule mit jeweils zweimal mit 500µl RPE Puffer gewaschen. Nach dem ersten Waschschrift wurde für 15s, nach dem zweiten für eine Minute bei 12000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Die Säulen wurden auf 1,5ml Reaktionsgefäße gesetzt. Zum Eluieren der RNA wurde die Säule mit 100µl Nuklease-freiem Wasser versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Säule bei 12000rpm für eine Minute zentrifugiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.11.6 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA-Lösungen

Mittels der spektralphotometrischen Messung mit Hilfe des Nanodrop (Thermo Fisher) kann die Konzentration und Reinheit von RNA Lösungen bestimmt werden. Die Konzentration wird durch die Absorption bei 260nm bestimmt. Eine Verunreinigung der Lösung durch

Proteine wird durch den Quotient OD260/OD280 ermittelt. Ein Wert um 2,0 spricht für ausreichend reine RNA.

4.11.7 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde die M-MLV Reverse Transkriptase und den weiteren Produkten von Invitrogen™ verwendet. Es wurden 250ng RNA in 10µl Reaktion eingesetzt. Zudem wurden 1µl 10xHexamere und 1µl 10mM dNTP's pipettiert und bei 65°C für 5min inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben auf Eis gestellt. Nach Zugabe des Reverse Transkriptase Mixes wurde der Mix zwei Minuten bei 37°C inkubiert.

Reverse Transkriptase Mix: 4µl 5xFirst Strand Buffer
2µl 100mM DTT
1µl Aqua dest.

Anschließend wurde 1µl M-MLV Reverse Transkriptase hinzugefügt, 10min bei RT und dann 50min bei 37°C inkubiert. Zur Enzyminaktivierung wurden die Proben für 15min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde anschließend 1:2 verdünnt und bei -20°C gelagert.

4.11.8 Quantitative Real- Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient der quantitativen Bestimmung der Menge an mRNA zur Expressionsanalyse (Higuchi et al., 1993). Dazu wurde die zuvor in cDNA umgeschriebene RNA verwendet. Für die Amplifikation im Real-Time PCR Cycler wurde KAPA SYBR FAST (Peqlab) eingesetzt, welches nach dem SYBR Green Assay funktioniert. Darin ist ein fluoreszierender Nukleinsäure Farbstoff enthalten, welcher dsDNA während der Amplifikation bindet und detektiert. Das entstehende Fluoreszenzsignal ist proportional zur DNA-Konzentration (Wittwer et al., 1997).

1x qRT-PCR Ansatz (25 µl):	12.5µl 2xKAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix
	1µl Primer forward (10µM)
	1µl Primer reverse (10µM)
	8,5µl RNase- freies Wasser
	2µl cDNA (6,25ng/µl)

PCR-Programm:

	Temperatur	Zeit	
	95°C	3min	Denaturierung
45x	94°C	15s	Denaturierung
	55-65°C	15s	Annealing
	70°C	30s	Elongation
	65-96°C	0,05°C pro 5s	Schmelzkurve

Die Messungen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt. Zusätzlich wurde in jedem Lauf eine Negativkontrolle, in welcher die cDNA durch Wasser ersetzt wurde, mitgeführt. So konnte durch Analyse der Schmelzkurven die entstandenen Produkte nach Richtigkeit untersucht werden. Das Programm ermittelte einen Wert, bei dem das Fluoreszenzsignal signifikant über dem des Hintergrundes liegt (C_t -Wert). Dieser wurde mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl, 2001) gegen GAPDH normalisiert und im Diagramm aufgetragen.

4.11.9 RT² Profiler™ PCR Array

Die RT² Profiler™ PCR Array von SA Bioscience wurden verwendet, um eine Übersicht über die Regulation der DNA-Reparatur und Zellzyklus regulierenden Genen zu bekommen. Die verwendeten 96-well plate Array enthalten in jedem Well Primer für die Signalweg-spezifischen Gene als auch entsprechende Kontrollen. So wurde pro Zelllinie und Behandlung ein 96-well PCR Array verwendet. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem RNeasy Kit wie in Abschnitt 4.11.2.1 beschrieben. Für die cDNA-Synthese wurde das dafür empfohlene RT² First Strand Kit von Qiagen verwendet. Es wurden für die cDNA-Synthese 300ng RNA pro

Reaktion im *Genomic DNA elimination MIX* (DEM) eingesetzt, so dass pro PCR-Reaktion 2,5ng vorlagen.

DEM: 300ng RNA
 2µl Puffer GE
 xµl RNase-freies Wasser
 10µl Endvolumen

Der DEM wurde 5min bei 42°C inkubiert und anschließend für 1min auf Eis gestellt. Zu den 10µl DEM wurden 10µl *Reverse-transcription Mix* (RTM) dazu gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach kurzem Herunterzentrifugieren wurden die Proben 30min bei 42°C inkubiert.

RTM: 4µl 5xPuffer BC3
 1µl Control P2
 1µl cDNA Synthesis Enzyme Mix
 1µl RNase Inhibitor
 3µl RNase-freies Wasser

Anschließend wurde die Reaktion durch Inkubation für 5min bei 95°C gestoppt und die cDNA bei -20°C eingefroren oder direkt für die PCR verwendet.

Für die qRT-PCR wurde ein Mastermix pro 96-well PCR Array angesetzt:

PCR- Mastermix: 1350µl 2xSYBR Green Mastermix
 102µl cDNA
 1248µl RNase-freies Wasser

In jedes Well wurde 25µl des PCR-Mastermixes pipettiert. Die Platte wurde bei 1000g für eine Minute zentrifugiert, bevor sie in den PCR Cyclyer gestellt wurde.

PCR-Programm:

	Temperatur	Zeit	
	95°C	10min	Denaturierung
40x	95°C	15s	Denaturierung
	60°C	1min	Annealing & Elongation
	65-96°C	0,05°C pro 5s	Schmelzkurve

4.11.10 Isolation von miRNA

Für die Isolation von miRNA wurde das miRNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80% wurden diese pelletiert. Das Zellpellet wurde in 700µl Qiazol Lysis Reagent resuspendiert und für 1min gevortext. Nach einer Inkubation von 5min bei RT wurde 140µl Chloroform hinzugegeben und durch Schütteln für 15s gemischt. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 2-3min, bevor die Proben bei 12000g für 15min und bei 4°C zentrifugiert wurden. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1,5Volumen Ethanol und kurzem Vortexen wurde die Lösung auf die RNA Säulen übertragen. Die Säulen wurden bei 8000g für 15s bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Auf Die Säulen wurde 700µl RWT Puffer gegeben und erneut bei 8000g für 15s bei RT zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Es erfolgten dann zweimal das Waschen mit 500µl RPE Puffer und anschließendem Zentrifugieren bei 8000g und RT für 15s nach dem ersten und für 2min nach dem zweiten Waschschrift. Der Durchlauf wurde verworfen. Danach wurden die Säulen bei max. g für 1min zentrifugiert und auf neue Reaktionsgefäße gesetzt. Es erfolgte die Eluierung mit 50µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugieren bei 8000g für 1min bei RT. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte wie in Abschnitt 4.11.2.2 beschrieben. Die Gesamt-RNA wurde auf 50ng/µl in RNase-freiem Wasser verdünnt.

4.11.11 cDNA-Synthese für miRNA

Für die reverse Transkription der miRNA enthaltenden gesamt RNA wurde das miScript II RT Kit (Qiagen) verwendet. Entsprechend dem Protokoll wurde keine der Substanzen gevortext. Es wurde zunächst der Reverse Transkriptase-Mix vorbereitet.

Reverse Transkriptase Mix: 4 μ l 5xmiScript HiSpec Buffer
2 μ l 10xmiScript Nucleics Mix
7 μ l RNase-freies Wasser
2 μ l miScript Reverse Transcriptase Mix
5 μ l RNA (50ng/ μ l)

Nach kurzem Herunterzentrifugieren wurden die Proben bei 37°C für 60min inkubiert. Die Umschreibung in cDNA erfolgt durch reverse Transkription mit oligo-dT priming zur Verlängerung der kurzen miRNA Sequenzen. Die Reaktion wurde durch 5-minütige Inkubation bei 95°C gestoppt. Die Proben wurden mit 200 μ l RNase-freiem Wasser verdünnt und anschließend für die qRT-PCR eingesetzt.

4.11.12 qRT-PCR für miRNA Proben

Diese qRT-PCR dient zur quantitativen Bestimmung der Menge an miRNA. Ebenso wie die Standard qRT-PCR (Abschnitt 4.11.2.3) wird zur Detektion der miRNA der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingesetzt, welcher während der Amplifikation an dsDNA bindet. Hier wurde das miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) als auch miScript Primer Assays (Qiagen) verwendet.

1x qRT-PCR Ansatz: 12,5 μ l 2xQuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
2,5 μ l 10xmiScript Universal Primer
2,5 μ l 10xmiScript Primer Assay
5,5 μ l RNase-freies Wasser
2 μ l cDNA

PCR-Programm:

	Temperatur	Zeit	
	95°C	15min	Denaturierung
45x	94°C	15s	Denaturierung
	55°C	30s	Annealing
	70°C	30s	Elongation
	65-96°C	0,05°C pro 5s	Schmelzkurve

Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 4.11.2.3 beschrieben.

4.12 Klinische Untersuchungen

4.12.1 Patientenselektion

In diese Untersuchung wurden 158 konsekutiv therapierte Patienten eingeschlossen, welche mit einem Melanom im Kopf- Hals Bereich in der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums rechts der Isar der Technischen Universität München diagnostiziert wurden. Die Kohorte teilt sich in 129 kutane Melanome und 29 Schleimhautmelanome auf und deren klinischen Parameter (Alter, Geschlecht, TNM Status, Therapie, Rezidive, Tod/ Ende des Follow-up) wurden retrospektiv ermittelt. Patienten mit fehlenden Daten, unvollständiges Staging und unvollendeter chirurgischer und/oder konservativer Behandlung wurden von den Überlebenskurven ausgeschlossen.

4.12.2 Immunhistochemie

Für die PUMA Immunhistochemie wurden 14 kutane Melanome und 17 Schleimhautmelanome aus der oben genannten Kohorte verwendet (Fritsche et al., 2015, Metzler, 2017). Die mit dem Anti-PUMA Antikörper (Epitomics, Burlingame USA; Verdünnung 1:400) gefärbten Proben wurden erneut nach Intensität der PUMA Expression und daher der Färbeintensität analysiert. Die zytoplasmatische Expressionslevel wurden wie folgt klassifiziert: 1- schwache, 2- moderate, 3- starke und 4- sehr starke Expression. Für die statistische Auswertung erfolgte die Gruppierung in PUMA negativ (Färbeintensität 1 und 2) und PUMA positiv (Färbeintensität 3 und 4).

4.12.3 Statistische Auswertung

Die Unterschiede in der PUMA-Expression wurden Mittels des Chi-Quadrat-Tests ermittelt. Die Überlebenskurven wurden mittels des Kaplan-Meier Verfahrens berechnet und dargestellt und weiter mit dem log-rank Test analysiert. Variablen, welche auf Einfluss auf die Prognose haben wurden durch die proportionale Cox Regression ausgewertet. Unterschiede tumorrelevanter und epidemiologischer Charakteristika zwischen den kutanen Melanomen und Schleimhautmelanomen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests und Fischers Exakter Test für kategoriale Variablen und der T-Test für kontinuierliche Variablen berechnet. Die statische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS (IBM).

5. Ergebnisse

5.1 Die Behandlung mit Cisplatin zeigt eine grundsätzliche Induzierbarkeit von p53 in Schleimhautmelanomen

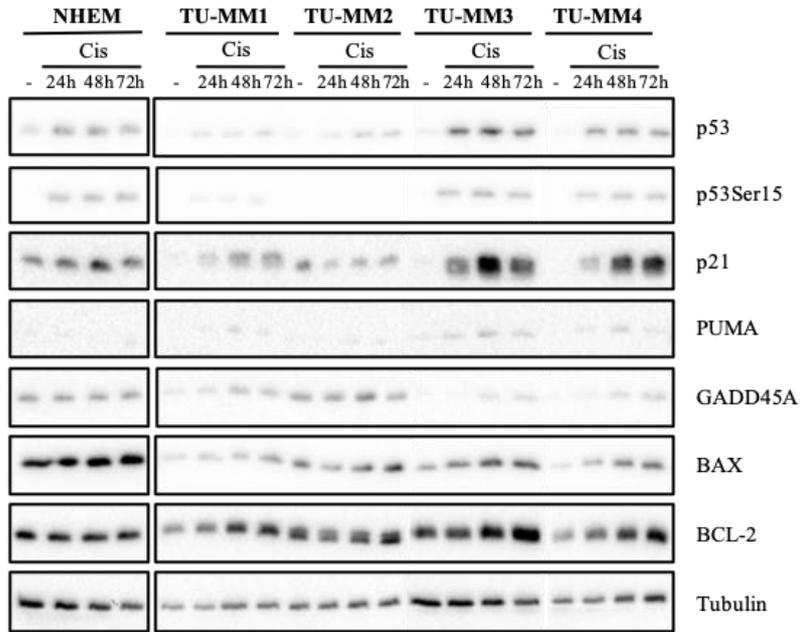
Durch Cisplatin induzierte DNA-Schäden aktivieren Signalwege, welche mit dem Tumorsuppressor p53 assoziiert sind (Siddik, 2003). In vielen bekannten soliden Tumoren können Mutationen in *TP53* nachgewiesen werden, während in der Mehrzahl der Schleimhautmelanome oder kutanen Melanome Wildtyp *TP53* vorliegt (Fritsche and Knopf, 2017). Dennoch sind die Ansprechraten auf Cisplatin sehr gering (Bhatia et al., 2009), wodurch die funktionale Integrität von p53 in Frage gestellt wird.

Um diese zu untersuchen, wurden die verwendeten Zelllinien mit Cisplatin (8 μ M) behandelt und die Expression von p53 und dessen Zielgenen auf mRNA und Proteinebene untersucht. Basierend auf Arbeiten von Urien und Lokiec, die bei 43 Patienten eine maximale Blutplamskonzentration von 2,5mg/l (8,3 μ M) Cisplatin (bei täglicher Gabe) gemessen haben, wurde für die vorliegende Arbeit eine Cisplatin-Konzentration von 8 μ M gewählt. Diese wird in der vorliegenden Arbeit als physiologische Cisplatin-Konzentration bezeichnet. (Urien and Lokiec, 2004, Metzler, 2017).

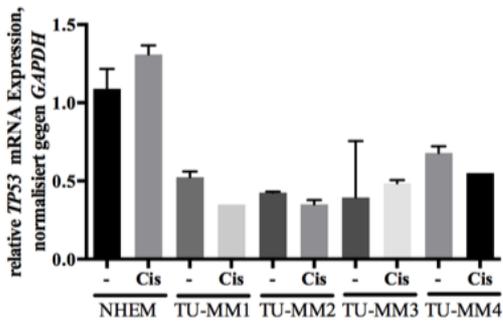
In dieser Arbeit wurde in den Melanozyten und den Schleimhautmelanomen TU-MM1-4 eine Induktion der p53 Expression auf Proteinebene nach 72h Behandlung mit Cisplatin beobachtet (Abbildung 4A). Eine Regulation der *TP53* mRNA Expression war dahingegen nicht detektierbar, wenngleich eine allgemein niedrigere mRNA Expression in den Schleimhautmelanomen auffällig wurde (Abbildung 4B). Die Stabilisierung von p53 wird durch vielfältige post-translationale Modifikationen erzielt, unter anderem durch Phosphorylierung an Serin 15 (p53Ser15) durch Stress induzierte Kinasen, wie ATM und ATR (Brooks and Gu, 2010). Diese konnte nach Stimulation in den Melanozyten, TU-MM1, TU-MM und TU-MM4 beobachtet werden. Für die TU-MM2 konnte, auf Grund der ausbleibenden Detektion von p53Ser15, keine Aussage getroffen werden (Abbildung 4A). Um einen Hinweis auf die funktionale Integrität von p53 als Transkriptionsfaktor zu erhalten, wurde die mRNA Expression von p53-Zielgenen untersucht. Für das p53 Zielgen *CDKN1A* konnten in den Melanozyten, als auch in allen verwendeten Schleimhautmelanomen eine signifikante, d.h. eine mindestens 2-fache Expressionssteigerung auf mRNA Ebene nach Cisplatin-Gabe festgestellt werden (Abbildung 4C). Diese war ebenso auf Proteinebene detektierbar. Im Vergleich zu Vorarbeiten (Fritsche et al., 2015), in denen eine Proteinstabilisierung für p21 nach 24h nachgewiesen werden konnte, wurde deutlich, dass die

Expressionssteigerung für die NHEM und die TU-MMs bis zu 48h anstieg und entweder leicht abfiel (NHEM, TU-MM3) oder auch nach 72h stabil blieb (Abbildung 4A). Der in den Vorarbeiten beobachtete Anstieg der p21 Expression nach 24h konnte in diesem Western Blot für NHEM und TU-MM2 nicht nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Expression des p53 Zielgenes *BBC3* konnte bis auf NHEM und TU-MM1 eine signifikante Steigerung der mRNA Expression detektiert werden (Abbildung 4D). Im Vergleich dazu war weder eine Regulation, noch die Proteinexpression gut zu detektieren (Abbildung 4A). Für die Detektion von *GADD45A* wurde auf Proteinebene nur eine leichte Induktion nach der Behandlung mit Cisplatin für 48h und 72h für TU-MM3 und TU-MM4 sichtbar. Diese unwesentliche Expressionssteigerung konnte in Vorarbeiten schon nach 24h beobachtet werden (Fritsche et al., 2015). Bei Betrachtung der qRT-PCR für *GADD45A* wurde eine Stimulation der Expression sichtbar, wenngleich diese das Signifikanzniveau nicht erreichte (Abbildung 4E). Eine nicht signifikante Stabilisierung des pro-apoptotischen Proteins BAX konnte nach 24h Cisplatin Behandlung bereits für TU-MM2, TU-MM3 und TU-MM4 gezeigt werden (Fritsche et al., 2015). Für die Melanozyten als auch die Schleimhautmelanome konnte darüber hinaus eine geringfügige Stabilisierung auch bis zu 72h detektiert werden (Abbildung 4A). Dahingegen war die Induktion der *BAX* mRNA Expression nicht deutlich detektierbar (Abbildung 4F). Interessanterweise war die Proteinexpression des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 nach Cisplatin-Behandlung gleichermaßen reguliert wie die des Gegenspielers BAX. Ausgenommen der Melanozyten war eine mit der Behandlungsdauer steigenden Induktion der Proteinexpression erkennbar (Abbildung 4A). Auffällig war die nicht detektierbare mRNA Expression des Genes der BCL-2 Proteinfamilie *BCL2A1* in den Schleimhautmelanomen. Für die Melanozyten konnte eine Expression, jedoch keine Regulation nach Cisplatin-Gabe nachgewiesen werden (Abbildung 4G).

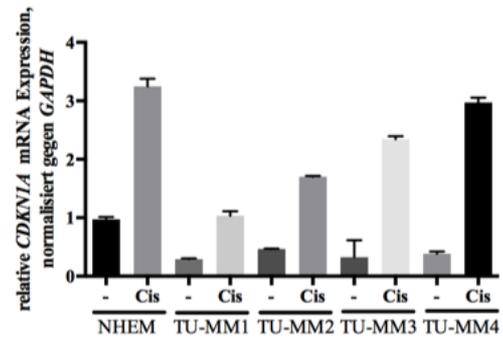
A



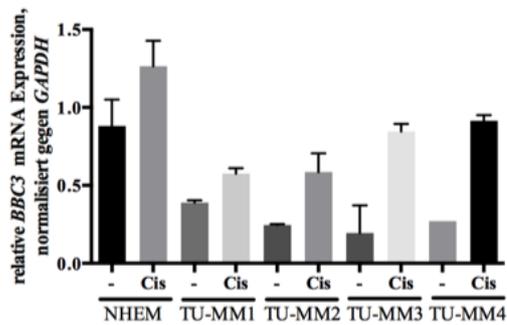
B



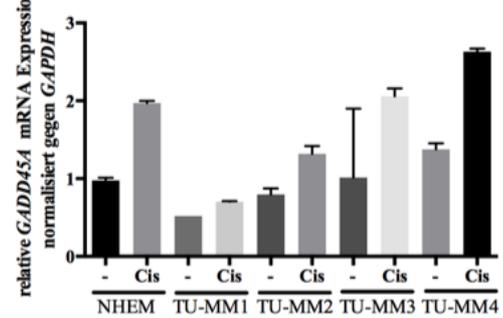
C



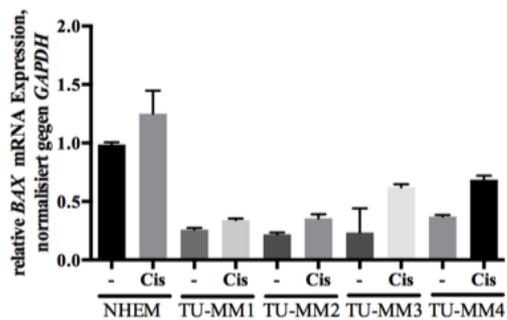
D



E



F



G

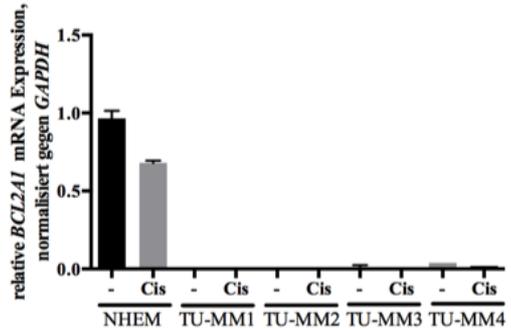


Abbildung 4: In den Schleimhautmelanomen kann eine grundsätzliche Induzierbarkeit von p53 beobachtet werden

Für die Untersuchung der Wirkung von Cisplatin auf p53 und dessen Zielgene wurden Melanozyten und Schleimhautmelanome mit 8µM Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. **A)** Für den Nachweis der Proteinexpression im Western Blot erfolgte die Behandlung der Zellen für 24h, 48h und 72h. **B-G)** Für den Nachweis der mRNA Expression nach Behandlung der Zellen für 24h mit Cisplatin wurde RNA isoliert und für die qRT-PCR genutzt. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode berechnet. Die Ergebnisse zusammengefasst in den jeweiligen Tumorentitäten wurde bereits publiziert (Fritsche et al., 2015).

5.2 Die Behandlung mit Cisplatin zeigt eine grundsätzliche Induzierbarkeit von p53 in kutanen Melanomen

Vergleichend wurde die Induzierbarkeit von p53 und dessen Zielgenen in kutanen Melanomen untersucht. In den kutanen Melanomen, welche keine *TP53* Mutation tragen, konnte ebenso wie in den Schleimhautmelanomen und den Melanozyten eine Stabilisierung der p53 Proteinexpression beobachtet werden. Die *TP53* Deletionsmutante IGR-37 zeigte erwartungsgemäß keine p53 Proteinexpression. Die in *TP53* eine Punktmutation tragende Zelllinie SK-MEL3 als auch die Wildtyp *TP53* tragende Zelllinie SK-MEL30 zeigten eine hohe basale Proteinexpression von p53, welche nicht durch Cisplatin induzierbar war. Im Gegenteil zu SK-MEL30 konnte eine Reduktion der p53 Proteinmenge für SK-MEL3 beobachtet werden (Abbildung 5A). Vergleichbar mit den Schleimhautmelanomen war keine Regulation der *TP53* mRNA zu beobachten. Für *TP53* Deletionsmutante IGR-37 war keine mRNA Expression detektierbar (Abbildung 5B). Eine Phosphorylierung an Ser15 von p53 war nach 24h für alle untersuchten kutanen Melanom-Zelllinien sichtbar. Während diese für die Melanozyten und SK-MEL30 auch nach 72h bestehen blieb, war für MEL-JUSO nach 72h und für COLO-849 und SK-MEL3 eine Reduktion nach 48h zu verzeichnen. Auf Grund der nicht vorhandenen Proteinexpression in IGR-37 konnte eine Phosphorylierung von p53 an Serin 15 nicht beobachtet werden (Abbildung 5A). Ebenso war in dieser Zelllinie keine Expression von p21 nachweisbar. Diese war in den Wildtyp *TP53* Zelllinien MEL-JUSO und COLO-849 zu beobachten. Die Induktion der Expression war bei MEL-JUSO nach 48h stabil und bei COLO-849 wurde dieser schon nach 48h entgegengewirkt. SK-MEL3 zeigte keine Proteinexpression nach Stimulation über die beobachtete Zeit, wohingegen in SK-MEL30 nach 72h eine geringfügige Induktion der p21 Proteinexpression beobachtet werden konnte (Abbildung 5A). Dahingegen war eine deutliche Erhöhung der *CDKN1A* Expression auch auf Transkriptionsebene beobachtbar, wenngleich deutlich wurde, dass die basale *CDKN1A*

mRNA Expression im Vergleich zu den Melanozyten geringer war. Für IGR-37 konnte keine *CDKN1A* mRNA Expression detektiert werden (Abbildung 5C). Interessanterweise war im Vergleich zu den Melanozyten und den Schleimhautmelanomen eine PUMA Expression in den kutanen Melanomen detektierbar, wobei eine signifikante Regulation durch Cisplatin-Behandlung ausblieb (Abbildung 5A). Auf mRNA Ebene war für MEL-JUSO und COLO-849, jedoch nicht für IGR-37, SK-MEL3 und SK-MEL30, eine signifikante Induktion der *BBC3* Expression sichtbar. Diese Induktion konnte nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde für MEL-JUSO, COLO-849 und IGR-37 eine Abnahme der Proteinexpression von PUMA beobachtet (Abbildung 5A). Während eine Regulation auf die Cisplatin-Behandlung durch deutliche Induktion der *GADD45A* mRNA Expression in den kutanen Melanomen, bis auf SK-MEL3, und der *BAX* mRNA Expression in MEL-JUSO, deutlich wurde, blieb diese für die anderen Zelllinien aus (Abbildung 5E,F). Ferner war diese für die Proteine *GADD45A*, *BAX* und *BCL-2* auch nicht im Western Blot zu beobachten, zumal für *GADD45A* in COLO-849, SK-MEL3 und SK-MEL30 keine Proteinexpression detektiert werden konnte. Dies wurde ebenso für die *BCL-2* Expression in MEL-JUSO, COLO-849 und SK-MEL3 auffällig (Abbildung 5A). Im Vergleich zu den Schleimhautmelanomen, welche keine *BCL2A1* mRNA Expression aufwiesen, konnte diese in kutanen Melanomen nachgewiesen werden, wenngleich keine bedeutende Regulation zu verzeichnen war. Lediglich in SK-MEL3 war eine Reduktion der mRNA Expression nachweisbar (Abbildung 5G). Im Allgemeinen fiel bei der Betrachtung der basalen Genexpression der Schleimhautmelanome und kutanen Melanome auf, dass diese stets unter jener der Melanozyten lag.

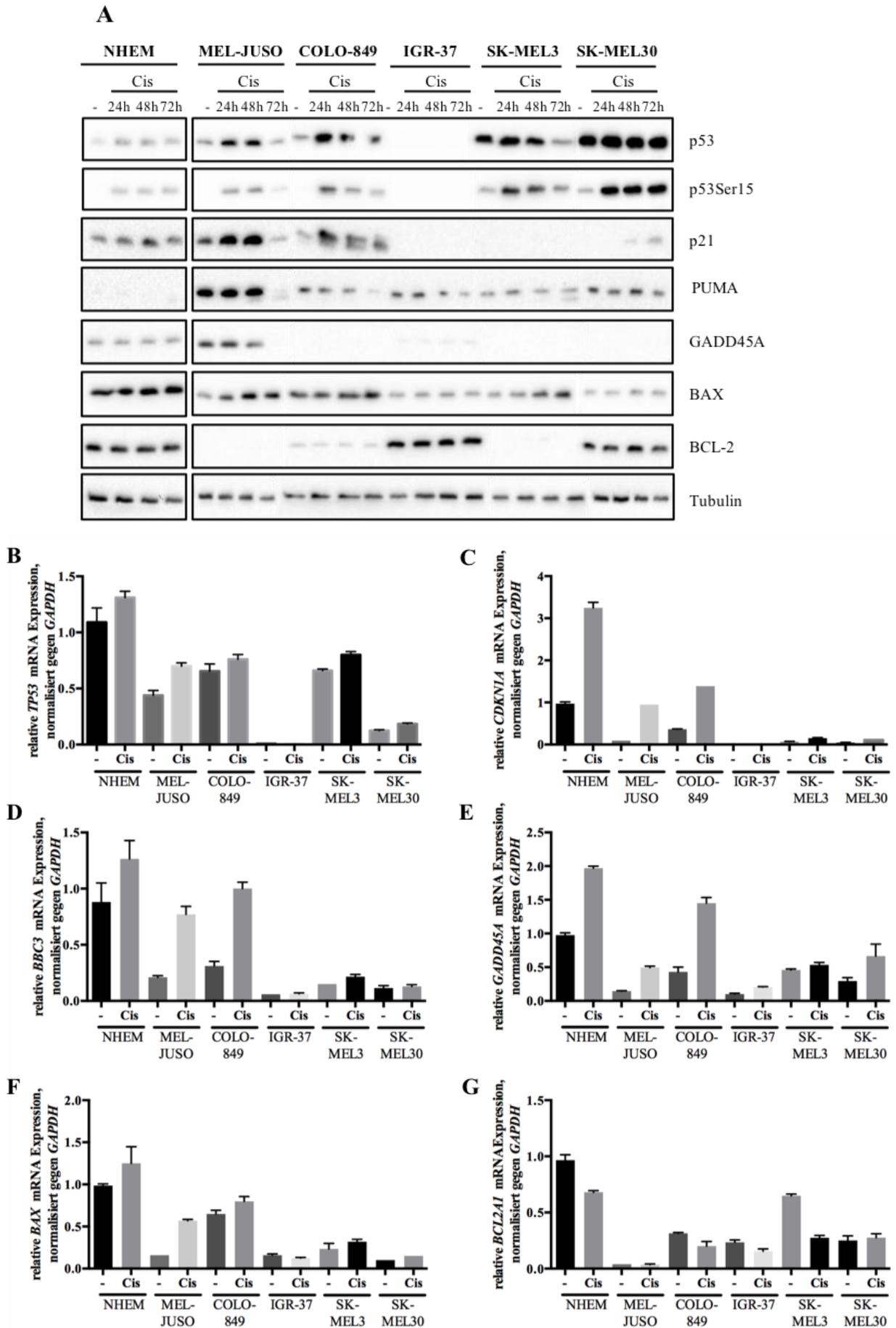


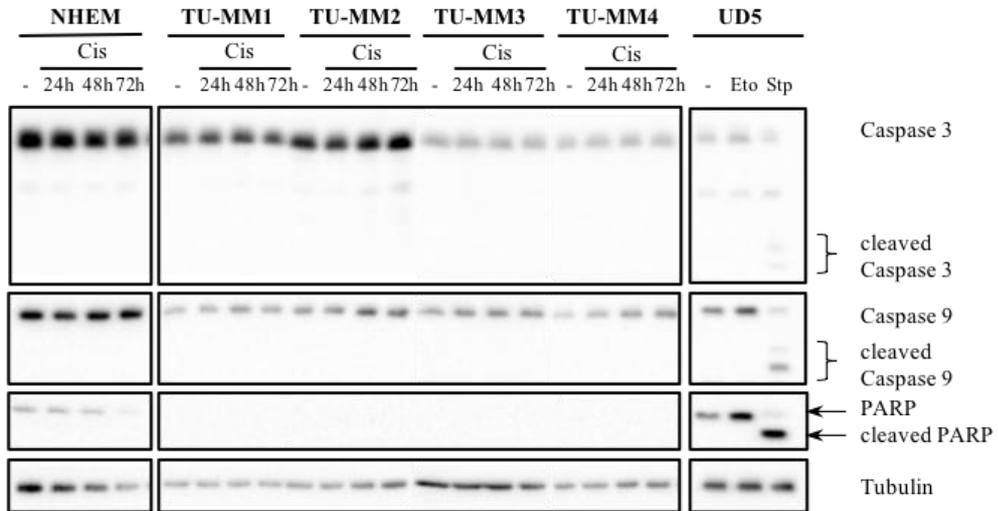
Abbildung 5: In den kutanen Melanomen kann eine grundsätzliche Induzierbarkeit von p53 beobachtet werden

Für die Untersuchung der Wirkung von Cisplatin auf p53 und dessen Zielgene wurden Melanozyten und kutane Melanome 8µM Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. **A)** Für den Nachweis der Proteinexpression im Western Blot erfolgte die Behandlung der Zellen für 24h, 48h und 72h. **B-G)** Für den Nachweis der mRNA Expression nach Behandlung der Zellen für 24h mit Cisplatin wurde RNA isoliert und für die qRT-PCR genutzt. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet. Die wiederholte Darstellung der Ergebnisse für die Melanozyten (NHEM) dient dem Vergleich. Die Ergebnisse zusammengefasst in den jeweiligen Tumorentitäten wurden bereits publiziert (Fritsche et al., 2015). Die wiederholte Darstellung der Ergebnisse für NHEM aus Abb. 4 dient dem Vergleich.

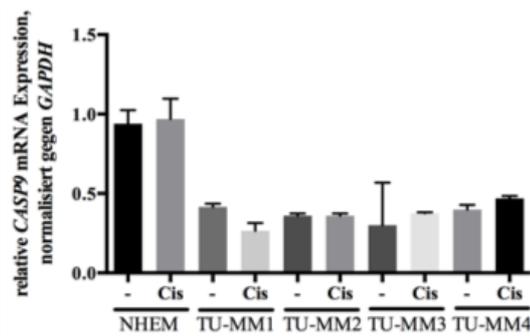
5.3 Cisplatin führt in Schleimhautmelanomen nicht zur Induktion von Apoptose

Ziel der Chemotherapie ist die Induktion des Zelltods. Die durch Cisplatin induzierten DNA-Schäden aktivieren bevorzugt die ATR Kinase, welche wiederum p53 an Serin 15 phosphoryliert und aktiviert (Siddik, 2003). p53 fördert über Transkriptions-abhängige und -unabhängige Mechanismen die Apoptose (Fridman and Lowe, 2003). Teil dieses programmierten Zelltods ist eine proteolytische Kaskade, in welcher eine Caspase die nachfolgende durch Spaltung aktivieren kann und dadurch der Apoptose Signalweg verstärkt wird, welcher einen raschen Zelltod induziert (Elmore, 2007). Demnach wird der Nachweis der Spaltprodukte der Proteine der Caspase-Kaskade als Nachweis der Apoptose genutzt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder in Schleimhautmelanomen, noch in Melanozyten die Behandlung mit Cisplatin nach 72h eine Spaltung der Caspase 3 und 9, noch von PARP hervorrief (Abbildung 6A). Auch eine Regulation der *CASP9* mRNA war nicht zu beobachten (Abbildung 6B). Bei Betrachtung der Proliferationskurven wurde ein Ausbleiben der Apoptose bestätigt. Nach 24h Cisplatin-Behandlung wiesen alle untersuchten Zelllinien kaum einen Unterschied in der Zellzahl auf. Nach 48h wurde eine Inhibition der Proliferation durch Cisplatin im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlicher. Eine Abflachung der Kurve, welche besonders für die NHEM, TU-MM1 und TU-MM3 beobachtbar war, spricht für eine Wachstumsinhibition durch Erreichen der Konfluenz (Abbildung 6C). Nach 72h konnte ein Unterschied in der Extinktion gemessen werden, jedoch wurde deutlich, dass die Melanozyten und die Schleimhautmelanome selbst unter Cisplatin-Behandlung eine Proliferation aufwiesen.

A



B



C

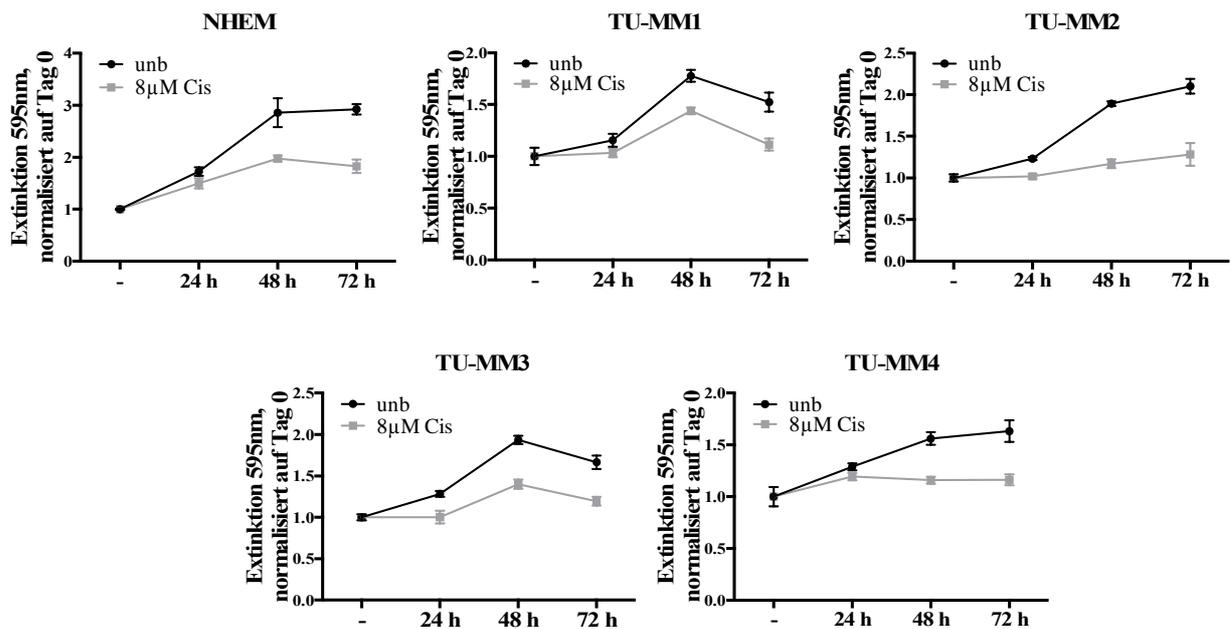


Abbildung 6: Cisplatin verlangsamt das Wachstum von Melanozyten und Schleimhautmelanomen

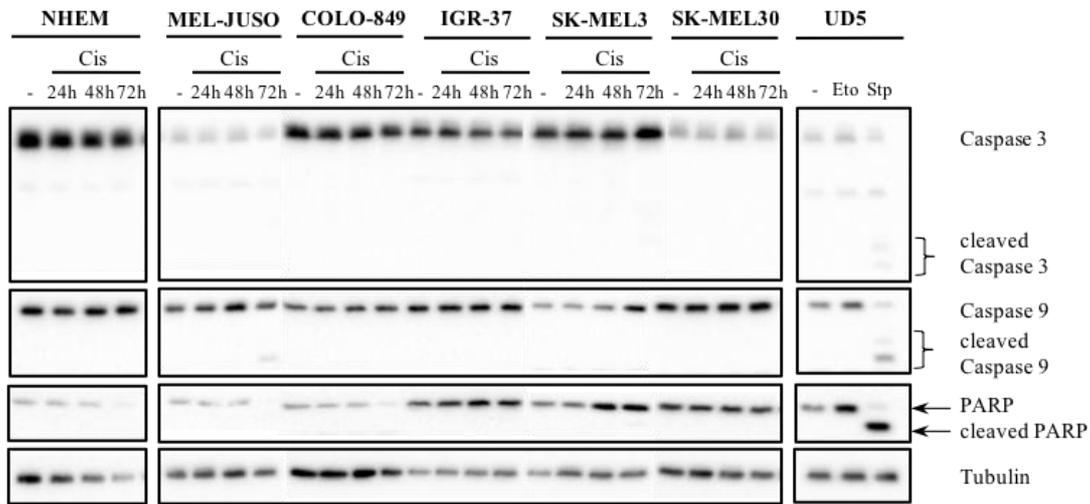
Für die Untersuchung der Wirkung von Cisplatin auf das Überleben der Zellen zu untersuchen, wurden Melanozyten und Schleimhautmelanome mit 8µM Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. **A)** Für den Nachweis der Proteinexpression im Western Blot erfolgte die Behandlung der Zellen für 24h, 48h und 72h. Als Nachweiskontrolle dienten Proteinlysate aus unbehandelten (-), für 24h mit 50mM Etoposide (Eto) oder für 5 h mit 1µM Staurosporin (Stp) behandelte UD-SCC5 (UD5). **B)** Für den Nachweis der mRNA Expression nach Behandlung der Zellen für 24h mit Cisplatin wurde RNA isoliert und für die qRT-PCR genutzt. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode berechnet. Die Ergebnisse zusammengefasst in den jeweiligen Tumorentitäten wurden bereits publiziert (Fritsche et al., 2015). **C)** Für die Proliferationskurven wurden 50.000 Zellen pro Well einer 24-Well Platte ausgesät. Am Tag 0 wurden die Zellen mit 8µM Cisplatin behandelt und zu diesem Zeitpunkt, als auch nach 24h, 48h und 72h fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und die Extinktion bei 595nm mit einem Multiwellreader bestimmt. Dargestellt ist die relative Zellzahl, ermittelt aus der Extinktion einer Dreifachbestimmung sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. Die Normalisierung erfolgte auf Tag 0.

5.4 Cisplatin führt in kutanen Melanomen nicht zur Induktion von Apoptose

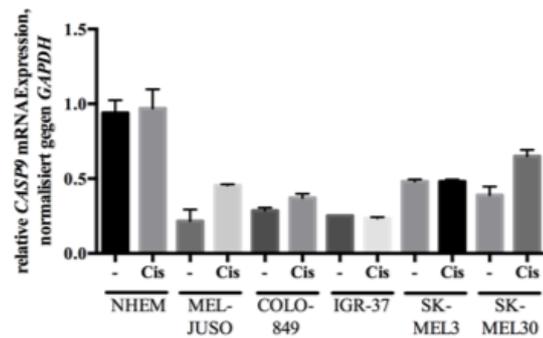
Wie für die Melanozyten und Schleimhautmelanome bereits gezeigt wurde, konnte die Behandlung mit 8µM Cisplatin auch in kutanen Melanomen keine Apoptose induzieren. In keiner der untersuchten Zelllinien konnte eine Spaltung von Caspase 3, Caspase 9 oder PARP nachgewiesen werden (Abbildung 7A). Ebenso war keine Regulation der *CASP9* mRNA Expression nach Cisplatin-Gabe zu verzeichnen (Abbildung 7B). Die Behandlung wirkte sich jedoch auf das Wachstum der Zellen aus. So war nach 24h kaum ein Unterschied in der Zellzahl der kutanen Melanome zu beobachten, dieser wurde jedoch nach 48h deutlicher. Für MEL-JUSO, SK-MEL3 und SK-MEL30 war eine Proliferation trotz Cisplatin-Gabe beobachtbar, wenngleich diese deutlich unter der der unbehandelten Zellen lag. Für COLO-849 und IGR-37 war eine Inhibition des Wachstums nach 48h deutlich. Für COLO-849 sank die Zellzahl nach 72h unter den Ausgangswert.

Die Behandlung mit Cisplatin konnte demnach weder in Melanozyten, noch in Schleimhautmelanomen oder kutanen Melanomen Apoptose induzieren. Lediglich eine auf das Wachstum inhibitorische Wirkung, welche nach 48h deutlich wurde, konnte durch Cisplatin-Behandlung induziert werden.

A



B



C

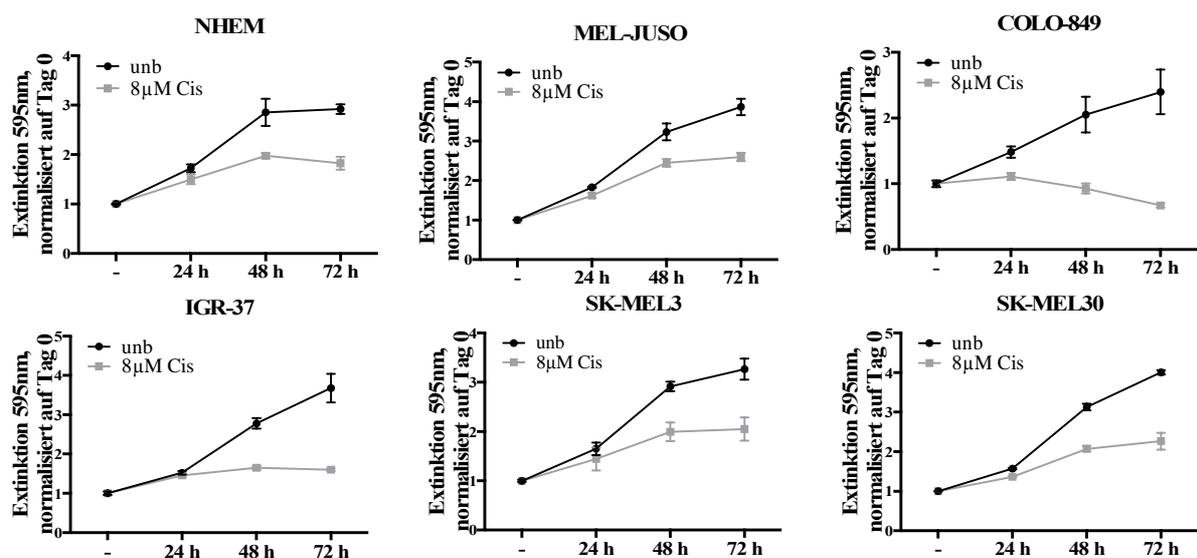


Abbildung 7: Cisplatin verlangsamt das Wachstum von kutanen Melanomen

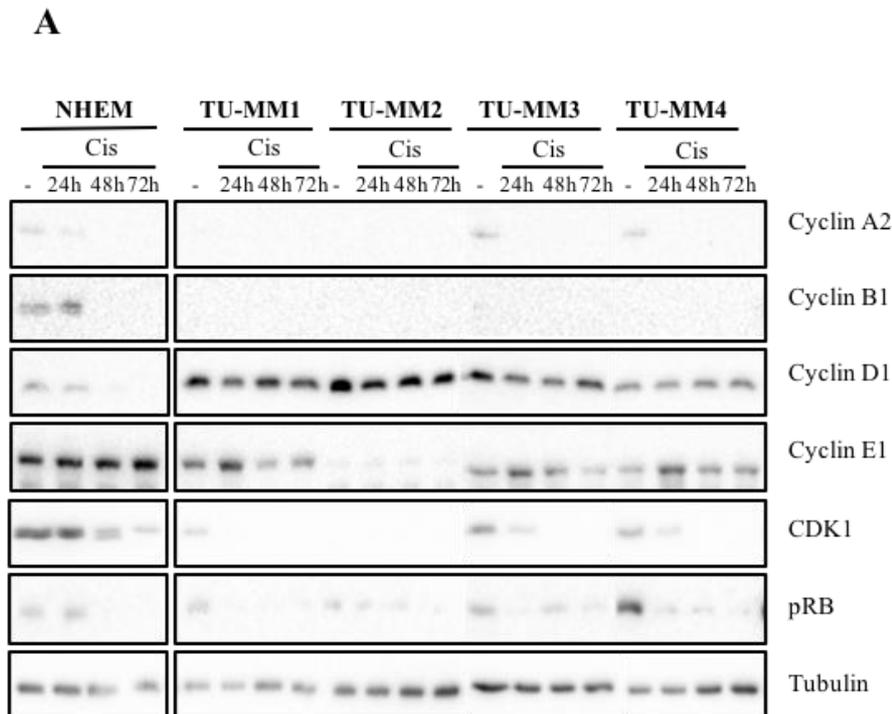
Für die Untersuchung der Wirkung von Cisplatin auf das Überleben der Zellen zu untersuchen, wurden Melanozyten und kutane Melanome mit 8 μ M Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. **A)** Für den Nachweis der Proteinexpression im Western Blot erfolgte die Behandlung der Zellen für 24h, 48h und 72h. Als Nachweiskontrolle dienten Proteinlysate aus unbehandelten (-), für 24h mit 50mM Etoposide (Eto) oder für 5h mit 1 μ M Staurosporin (Stp) behandelte UD-SCC5 (UD5). **B)** Für den Nachweis der mRNA Expression nach Behandlung der Zellen für 24h mit Cisplatin wurde RNA isoliert und für die qRT-PCR genutzt. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode berechnet. Die Ergebnisse, zusammengefasst in den jeweiligen Tumorentitäten, wurden bereits publiziert (Fritsche et al., 2015). **C)** Für die Proliferationskurven wurden 50.000 Zellen pro Well auf eine 24-Well Platte ausgesät. Am Tag 0 wurden die Zellen mit 8 μ M Cisplatin behandelt und zu diesem Zeitpunkt, als auch nach 24h, 48h und 72h fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und die Extinktion bei 595nm mit einem Multiwellreader bestimmt. Dargestellt ist die relative Zellzahl, ermittelt aus der Extinktion einer Dreifachbestimmung sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. Die Normalisierung erfolgte auf Tag 0. Die wiederholte Darstellung der Ergebnisse für NHEM und UD-SCC 5 aus Abb. 6 dient dem Vergleich.

5.5 Cisplatin führt zur Verschiebung des Zellzyklus in Schleimhautmelanomen

Da die Behandlung mit physiologischen Konzentrationen Cisplatin keine Apoptose induzieren konnte, jedoch ein verlangsamtes Wachstum beobachtet wurde, wurde die Wirkung von Cisplatin auf die Regulation des Zellzyklus und den p53 Kontrollpunkten untersucht.

Die Behandlung mit Cisplatin bis zu 7h hatte keinen Effekt auf die Proteinexpression von Cyclin D1 und Cyclin E in den Schleimhautmelanomen (Abbildung 8A). Eine Antwort auf Cisplatin-Gabe war auch nicht auf Transkriptionsebene zu beobachten. Obwohl die Melanozyten mit einer Reduktion der Proteinexpression von Cyclin D1 nicht jedoch von Cyclin E1 nach 48h reagierten, war keine Regulation der mRNA Expression zu sehen (Abbildung 8 D,E). Die Proteinexpression von Cyclin B1 wurde von den NHEM nach Behandlung nach 48h herunterreguliert. Eine Aussage über die Expressionsänderung von Cyclin B1 auf Proteinebene in den Schleimhautmelanomen konnte auf Grund der nicht detektierbaren Expression nicht getroffen werden (Abbildung 8A). Auf Transkriptionsebene wurde eine Herunterregulation der *CCNB1* mRNA Expression sichtbar (Abbildung 8C). Cyclin A wurde auf Proteinebene von NHEM, TU-MM3 und TU-MM4 nach 24h reduziert. Eine Aussage zu TU-MM1 und TU-MM2 konnte auf Grund der nicht nachweisbaren Proteinexpression nicht getroffen werden (Abbildung 8A). Auf Transkriptionsebene konnte eine deutliche Reduktion der *CCNA1* Expression beobachtet werden (Abbildung 8B). Die Expression von CDK1 wurde in TU-MM1, TU-MM3 und TU-MM4 schon nach 24h der Behandlung reduziert. Für die NHEM war dies erst nach 48h sichtbar (Abbildung 8A). Dies

war übereinstimmend mit den Ergebnissen der qRT-PCR, welche die mRNA Expression nach 24h untersuchte. Eine Reduzierung der *CDK1* mRNA Expression konnte für die NHEM nach 24h, wie es für die Schleimhautmelanome nachweisbar war, nicht verzeichnet werden (Abbildung 8F). Eine Auswirkung der Cisplatin-Behandlung auf die *RBI* mRNA Expression war nicht beobachtbar (Abbildung 8 G). Dahingehen wurde die Phosphorylierung des Rb Proteins in den Schleimhautmelanomen nach 24h und in den NHEM nach 48h reduziert (Abbildung 8A). Auffällig war erneut die deutlich niedrigere basale mRNA Expression der Schleimhautmelanome im Vergleich zu den Melanozyten. Ausgeschlossen davon war *CCND1*, dessen höhere basale Expression sich auch im Western Blot widerspiegelte. Weitere Ergebnisse der Untersuchung zur mRNA Expression Zellzyklus-relevanter Gene nach Cisplatin-Behandlung mit den RT² ProfilerTM PCR Array befinden sich im Anhang (10.1 RT² ProfilerTM PCR Array Human Cell Cycle). Bei der zytometrischen Analyse des Zellzyklus zeigten die NHEM weder auf die Behandlung mit Nocodazol, noch auf Cisplatin eine Verschiebung der Zellzyklusphasen (Abbildung 8H). Die Schleimhautmelanome reagierten auf die Behandlung mit Nocodazol erwartungsgemäß mit einer Zellzyklusarretierung in der G2/M Phase. Nach Behandlung mit Cisplatin waren für TU-MM1, TU-MM3 und TU-MM4 mehr Zellen in der S-Phase detektierbar. TU-MM2 zeigte keine Veränderung der Verteilung der Zellzyklusphasen nach Cisplatin-Gabe (Abbildung 8I-M).



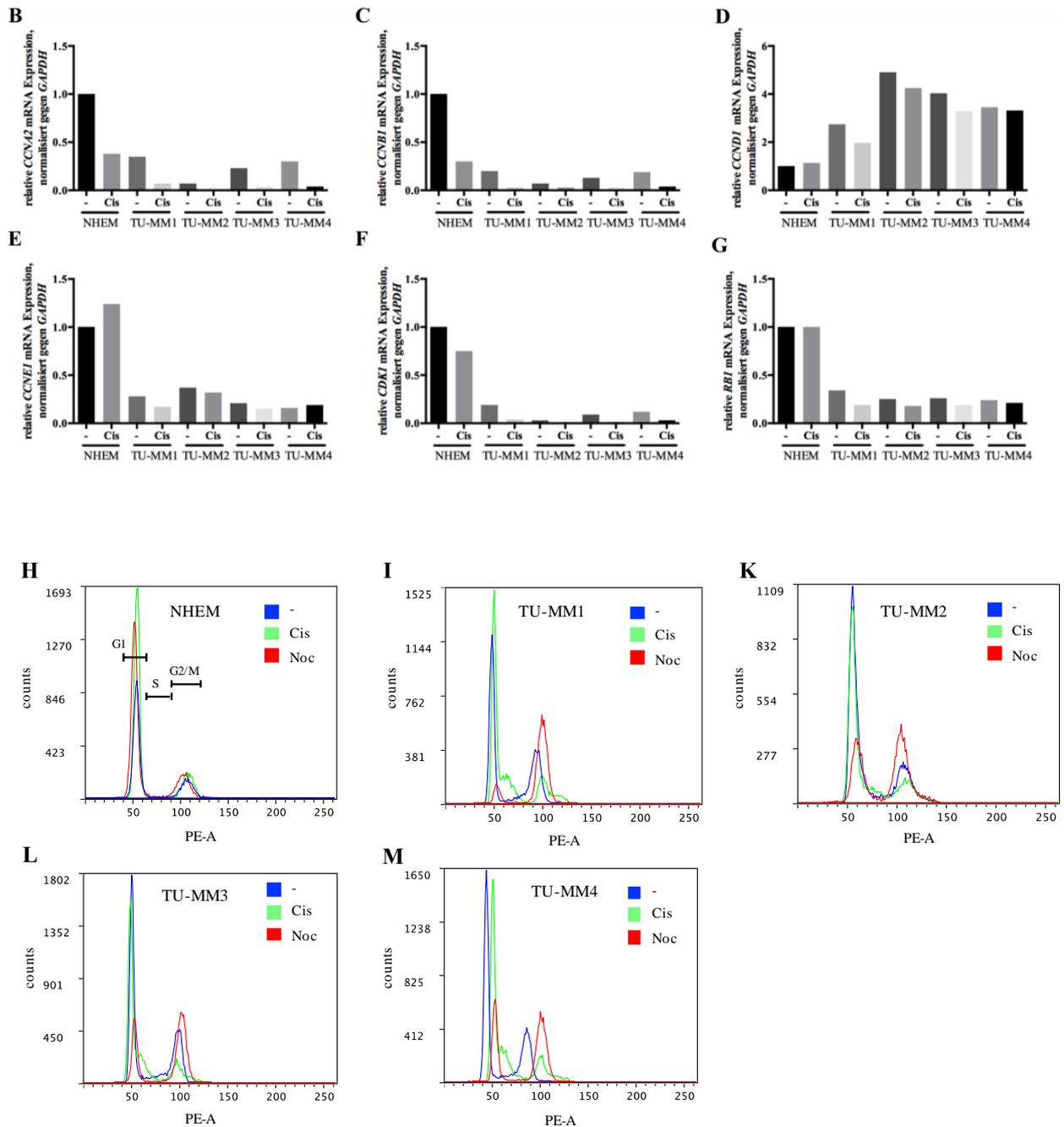


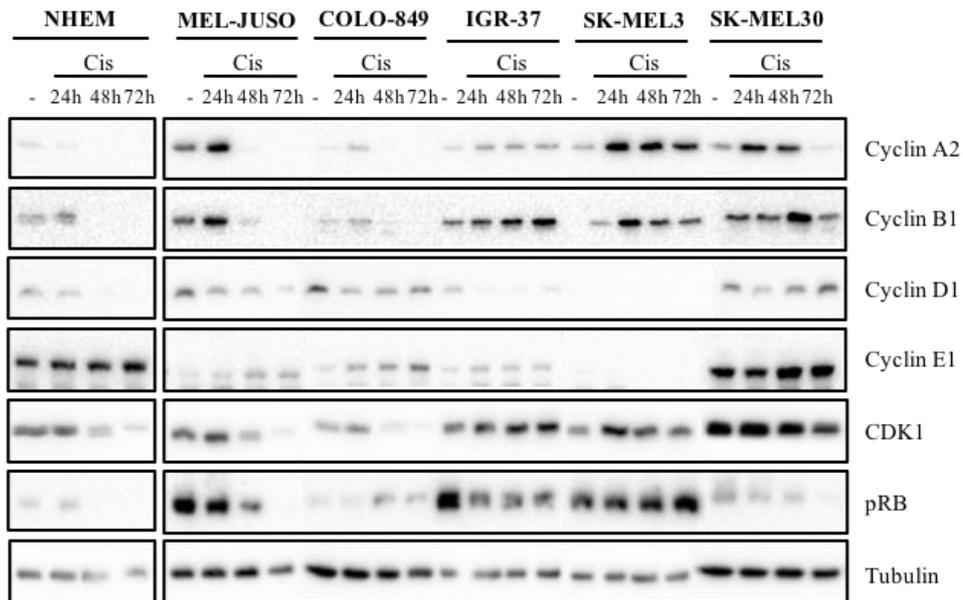
Abbildung 8: Die Wirkung von Cisplatin auf Schleimhautmelanoma äußert sich durch Verschiebung des Zellzyklus

Um die Wirkung von Cisplatin auf Zellzyklus zu untersuchen, wurden Melanozyten und Schleimhautmelanome mit 8µM Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. **A)** Für den Nachweis der Proteinexpression im Western Blot erfolgte die Behandlung der Zellen für 24h, 48h und 72h. **B-G)** Für den Nachweis der mRNA Expression nach Behandlung der Zellen für 24h mit Cisplatin wurde RNA isoliert und für die RT² ProfilerTM PCR Array genutzt. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der 2^{-ΔΔCt} Methode berechnet. **H-M)** Fluoreszenzhistogramm zur Untersuchung des Zellzyklus. Für die zytometrische Analyse des Zellzyklus wurden nach der Behandlung mit 8µM Cisplatin (Cis) oder 100ng/ml Nocodazole (Noc) 1 × 10⁶ Zellen fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. 20.000 Zellen wurden im Durchflusssystem analysiert.

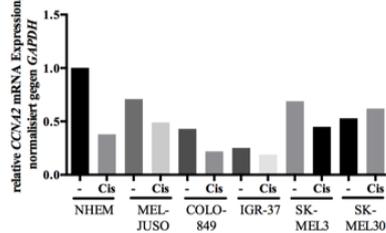
5.6 Cisplatin führt zur Verschiebung des Zellzyklus in kutanen Melanomen

Während die Schleimhautmelanome eine Herunterregulation der Cyclin A2 Proteinexpression nach 24h Cisplatin-Behandlung zeigten, kam es in den kutanen Melanomen zunächst zu einer Proteinstabilisierung. Erst nach 48h zeigten MEL-JUSO und COLO-849 eine Herunterregulation der Proteinexpression. Diese blieb für IGR-37 und SK-MEL3 bis zu 72h stabil. SK-MEL30 regulierte die Proteinexpression von Cyclin A2 nach 72h herunter (Abbildung 9A). Bei der Betrachtung der *CCNA1* Expression auf Transkriptionsebene wurde eine Reduzierung dieser sichtbar, erreichte jedoch kein signifikantes Niveau. SK-MEL30 war davon ausgeschlossen. Bei ihnen zeigte sich keine Regulation (Abbildung 9B). Für die Proteinexpression von Cyclin B1 verhielt es sich ähnlich wie für Cyclin A1, mit dem Unterschied, dass die Proteinexpression in SK-MEL3 nach 48h runterreguliert und für SK-MEL30 nur nach 48h ein Hochregulation beobachtet wurde (Abbildung 9A). Im Vergleich dazu war eine Herunterregulation der *CCNB1* mRNA Expression in allen kutanen Melanomen sichtbar, welche für SK-MEL3 und SK-MEL30 weniger deutlich wurde (Abbildung 9C). Nach der Behandlung mit Cisplatin war in den Zelllinien MEL-JUSO, COLO-849, IGR-37 und SK-MEL30 eine geringfügige Repression von Cyclin D1 nach 24h zu sehen. In SK-MEL3 konnte keine Proteinexpression detektiert werden. Über die beobachteten Zeitpunkte reduzierte lediglich MEL-JUSO die Proteinexpression. Indes wurde diese bei COLO-849 und SK-MEL30 nach 48h und 72h wieder normalisiert (Abbildung 9A). Die Ergebnisse der qRT-PCR für *CCND1* zeigten für MEL-JUSO, COLO-849, IGR-37 und SK-MEL3 nach Behandlung mit Cisplatin für 24h eine Tendenz zur Runterregulation (Abbildung 9D). Für *CCNE1*, *CDK1* und *RBI* war auf Transkriptionsebene keine Antwort auf die Cisplatin-Gabe detektierbar (Abbildung 9E-G). Auf Proteinebene war nur für COLO-849 eine Cyclin E Stabilisierung bis zu 72h zu beobachten. Während die Schleimhautmelanome mit einer raschen Runterregulation der Expression von CDK1 nach 24h reagierten, war diese erst nach 48h und auch nur für MEL-JUSO und COLO-849 sichtbar (Abbildung 9A). Dies war auch für pRB zu beobachten. Hier wurde zusätzlich zu MEL-JUSO und COLO-849 eine Reduktion der Phosphorylierung auch für IGR-37 und SK-MEL30 sichtbar. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung des Zellzyklus reagierten alle kutanen Melanome wie erwartet mit einer Verschiebung des Zellzyklus in die G2/M Phase. Ebenso war für die untersuchten Zelllinien eine Anhäufung von Zellen in der S-Phase nach Cisplatin-Behandlung für 24h sichtbar (Abbildung 9H-N).

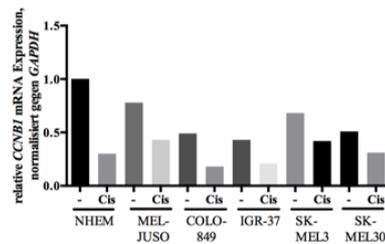
A



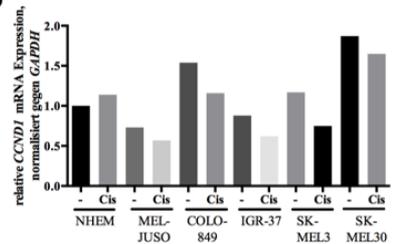
B



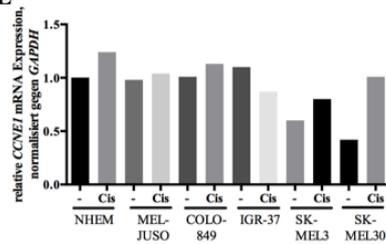
C



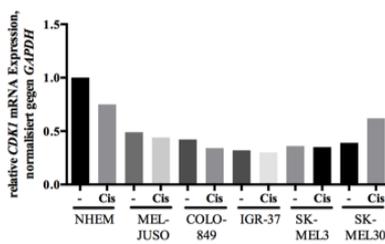
D



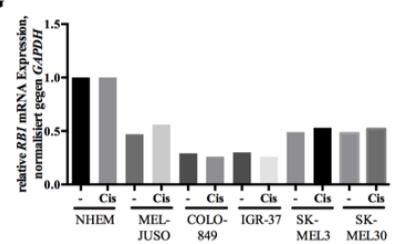
E



F



G



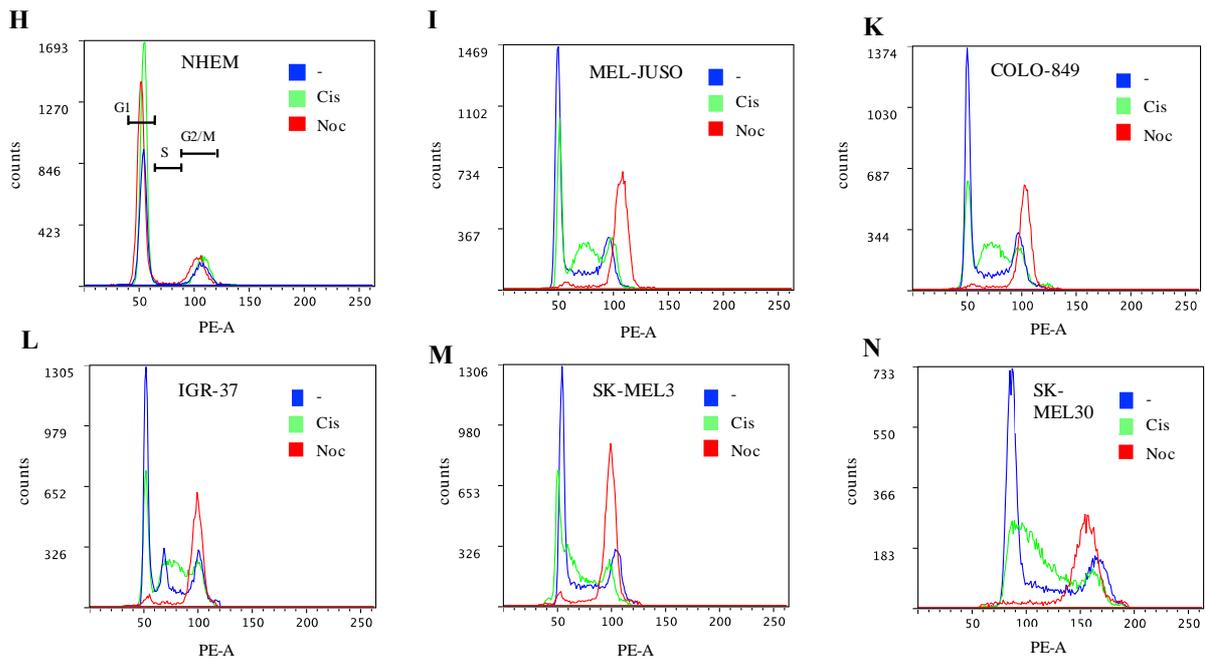


Abbildung 9: Die Wirkung von Cisplatin auf kutane Melanome äußert sich durch Verschiebung des Zellzyklus

Um die Wirkung von Cisplatin auf Zellzyklus zu untersuchen, wurden kutane Melanome mit $8\mu\text{M}$ Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. **A)** Für den Nachweis der Proteinexpression im Western Blot erfolgte die Behandlung der Zellen für 24h, 48h und 72h. **B-G)** Für den Nachweis der mRNA Expression nach Behandlung der Zellen für 24h mit Cisplatin wurde RNA isoliert und für die RT² Profiler™ PCR Array genutzt. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode berechnet. **H-M)** Fluoreszenzhistogramm zur Untersuchung des Zellzyklus. Für die zytometrische Analyse des Zellzyklus wurden nach der Behandlung mit $8\mu\text{M}$ Cisplatin (Cis) oder 100ng/ml Nocodazole (Noc) 1×10^6 Zellen fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. 20.000 Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Die wiederholte Darstellung der Ergebnisse für NHEM Abb. 8 dient dem Vergleich.

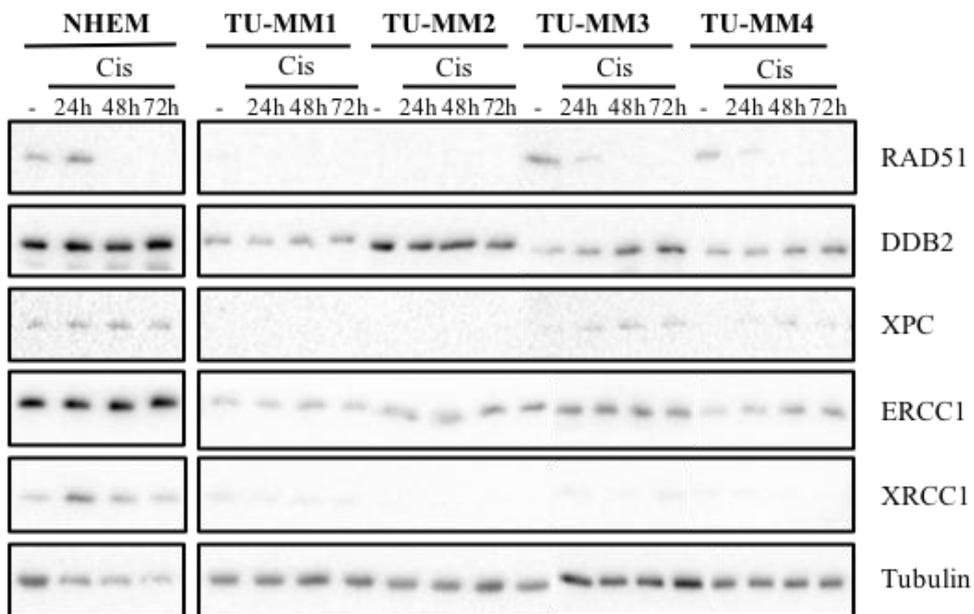
5.7 Die Cisplatin-Behandlung hat keine Auswirkung auf die DNA-Reparatur in Schleimhautmelanomen

Der Tumorsuppressor p53 induziert als Hüter des Genoms eine Reihe von Mechanismen infolge von DNA-Schäden (Williams and Schumacher, 2016). Auf Grund der fehlenden Apoptose und der beobachteten verlangsamten Zellzyklusprogression wurde eine verstärkte DNA-Reparatur vermutet und sollte daher untersucht werden.

Interessanterweise wurde nach Behandlung mit Cisplatin sichtbar, dass sowohl die NHEM als auch die TU-MM3 und TU-MM4 die Proteinexpression von RAD51 nach 48h, bzw. 24h herunterregulierten (Abbildung 10A). Eine Regulation der *RAD51* mRNA Expression nach 24h

war für die NHEM nicht, für die TU-MM3 und TU-MM4 jedoch sichtbar (Abbildung 10B). TU-MM1 zeigte ebenso eine Herunterregulation auf Transkriptionsebene, welche Proteinebene nicht bestätigt werden konnte. Eine Stabilisierung der Expression der untersuchten DNA-Reparatur regulatorischen Proteine war darüber hinaus nur für DDB2 und XPC für TU-MM3 und TU-MM4 über die 72h Behandlungsdauer sichtbar (Abbildung 10A). Diese Stabilisierung war auf Transkriptionsebene schon nach 24h sichtbar. Im Gegensatz zur Proteinexpression zeigten die NHEM schon nach 24h eine Erhöhung der *DDB2* und *XPC* mRNA Expression (Abbildung 10C, D). Für ERCC1 und XRCC1 wurde keine wesentliche Regulation in den Schleimhautmelanomen beobachtet, wenngleich die Expression von XRCC1 auf Proteinebene nur unzureichend detektierbar war (Abbildung 10A, E, F). Weitere Ergebnisse der Untersuchung mRNA Expression DNA-Reparatur relevanter Gene nach Cisplatin-Behandlung mit den RT² Profiler™ PCR Array befinden sich im Anhang Punkt 10.2.

A



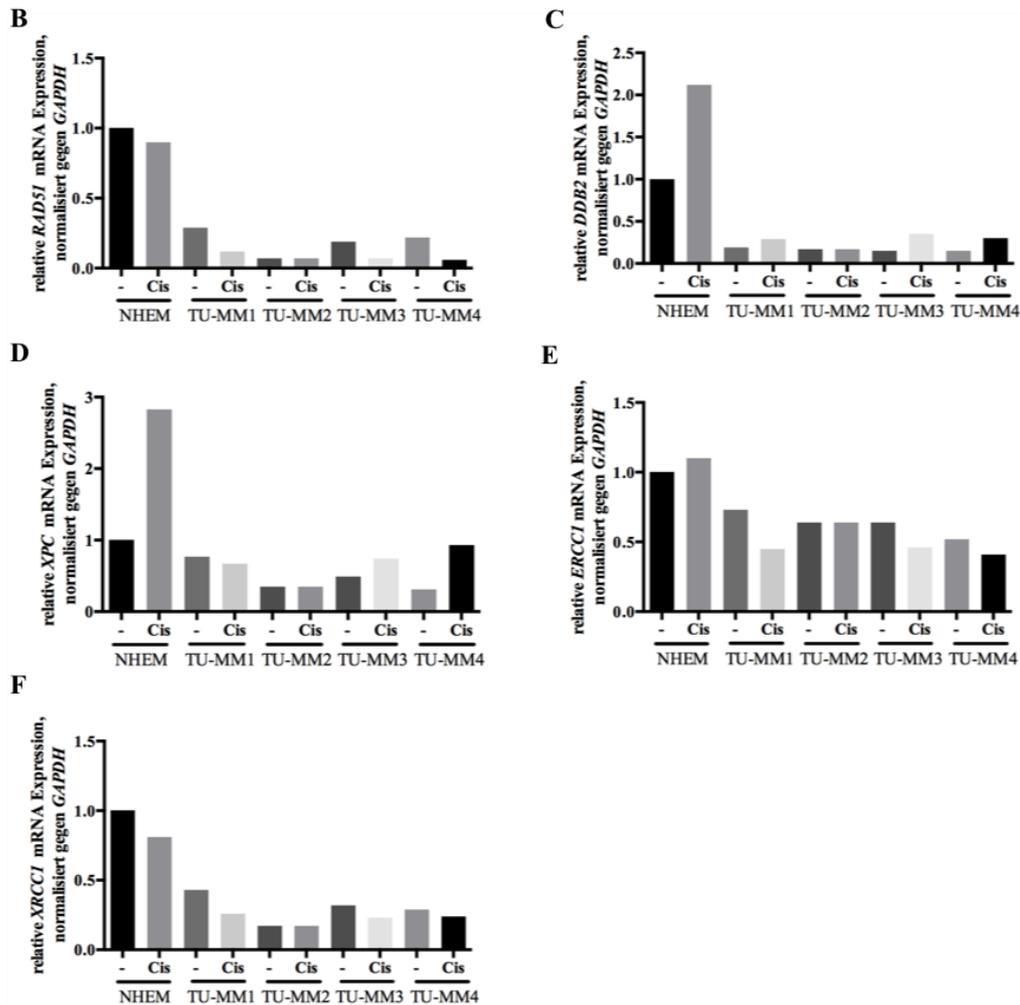


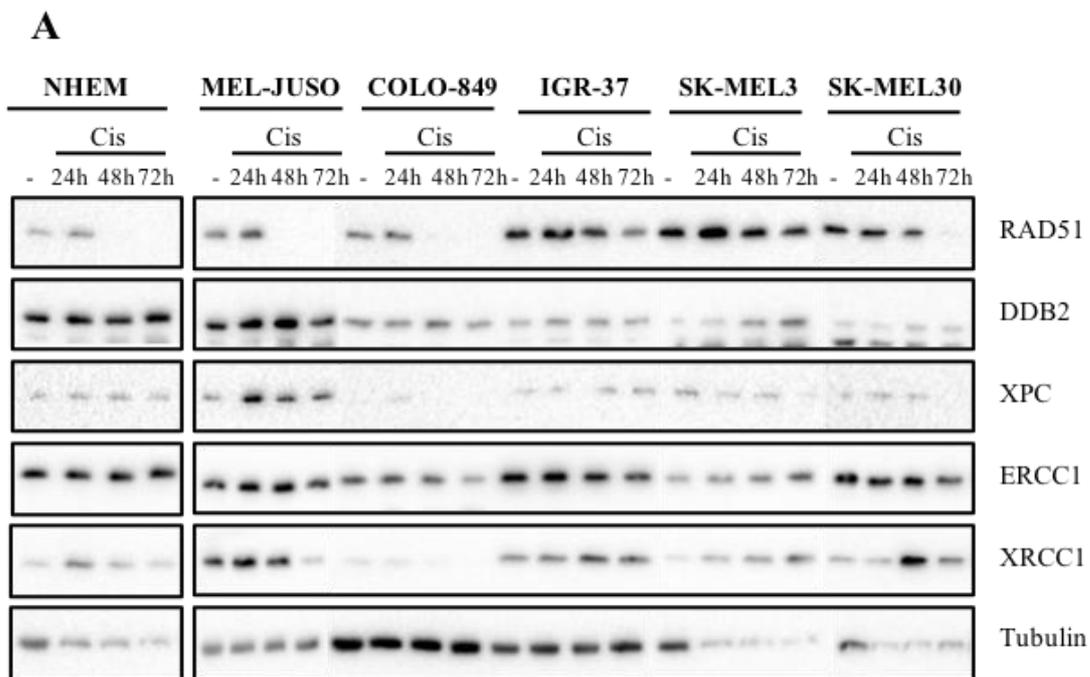
Abbildung 10: In den Schleimhautmelanomen wird die DNA-Reparatur nach Cisplatin-Behandlung kaum aktiviert

Für die Untersuchung der Wirkung von Cisplatin auf die DNA-Reparatur wurden Melanozyten und Schleimhautmelanome 8 μ M Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. **A)** Für den Nachweis der Proteinexpression im Western Blot erfolgte die Behandlung der Zellen für 24h, 48h und 72h. **B-G)** Für den Nachweis der mRNA Expression nach Behandlung der Zellen für 24h mit Cisplatin wurde RNA isoliert und für die RT² ProfilerTM PCR Array genutzt. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode berechnet.

5.8 Die Cisplatin-Behandlung hat keine Auswirkung auf die DNA-Reparatur in kutanen Melanomen

Kongruent mit den Schleimhautmelanomen zeigten auch die kutanen Melanome eine Herunterregulation der RAD51 Proteinexpression, welche jedoch für MEL-JUSO und COLO-849 erst nach 48h und für IGR-37, SK-MEL3 und SK-MEL30 erst nach 72h deutlich wurde (Abbildung 11A). Diese Regulation war nicht auf Transkriptionsebene beobachtbar

(Abbildung 11B). Dahingegen wurde nur eine minimale Stabilisierung der DDB2 und XPC Proteinexpression bei MEL-JUSO sichtbar, wobei eine Hochregulation der mRNA Expression auch für COLO-849 und SK-MEL3 festgestellt werden konnte. Eine Erhöhung der Genexpression in den Zelllinien IGR-37 und SK-MEL30 war nicht deutlich (Abbildung 11A, C, D). ERCC1 wies für die untersuchten Zelllinien weder auf Protein-, noch auf Transkriptionsebene eine deutliche Regulation auf (Abbildung 11A, E). Übereinstimmend mit den Melanozyten wies MEL-JUSO eine Stabilisierung der XRCC1 Proteinexpression nach 24h auf, welche nach 72h wieder auf die Ausgangsexpression herunterreguliert wurde. Für SK-MEL30 wurde eine kurzzeitige Stabilisierung von XRCC1 nach 48h sichtbar (Abbildung 11A). Die Expression der *XRCC1* mRNA nach Cisplatin-Gabe wurde nicht beeinflusst (Abbildung 11F).



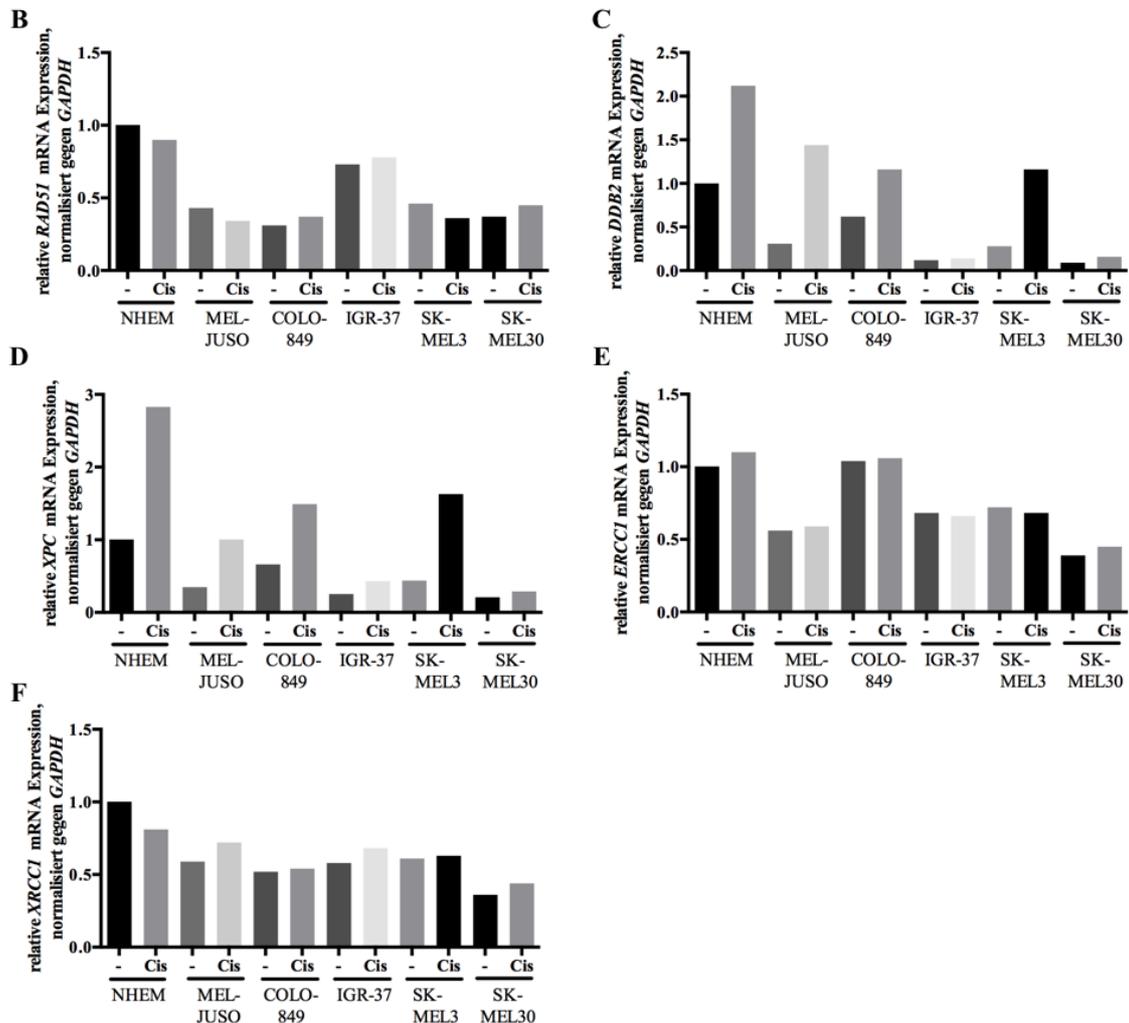


Abbildung 11: In den kutanen Melanomen wird die DNA-Reparatur nach Cisplatin-Behandlung kaum aktiviert

Für die Untersuchung der Wirkung von Cisplatin Die DNA-Reparatur wurden kutane Melanome mit 8µM Cisplatin (Cis) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. **A)** Für den Nachweis der Proteinexpression im Western Blot erfolgte die Behandlung der Zellen für 24h, 48h und 72h. **B-G)** Für den Nachweis der mRNA Expression nach Behandlung der Zellen für 24h mit Cisplatin wurde RNA isoliert und für die RT² ProfilerTM PCR Array genutzt. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der 2^{-ΔΔCt} Methode berechnet. Die wiederholte Darstellung der Ergebnisse für NHEM Abb. 10 dient dem Vergleich.

5.9 In den untersuchten Zelllinien ist keine *BBC3* Mutation vorhanden

Bei der Untersuchung der Expression p53-Zielgene wurde eine sehr geringe PUMA Expression, einhergehend mit einer Dysfunktion des Apoptose Signalweges auffällig. In Studien konnte gezeigt werden, dass die PUMA Expression in Melanomen reduziert ist. Die

Expression nimmt mit Fortschreiten der Erkrankung ab und korreliert daher mit dem Überleben (Karst et al., 2005).

Um einen Funktionsverlust durch Mutationen auszuschließen wurden die kodierenden Exons (Exon 2-4) von *BBC3* sequenziert (Abbildung 12A). In keiner Zelllinie wurde eine Mutation detektiert. Lediglich die Zelllinien TU-MM2 und COLO-849 wiesen einen bereits beschriebenen Einzelnukleotid-Polymorphismus (C/T) in der 3' untranslatierten Region auf (Abbildung 12B).

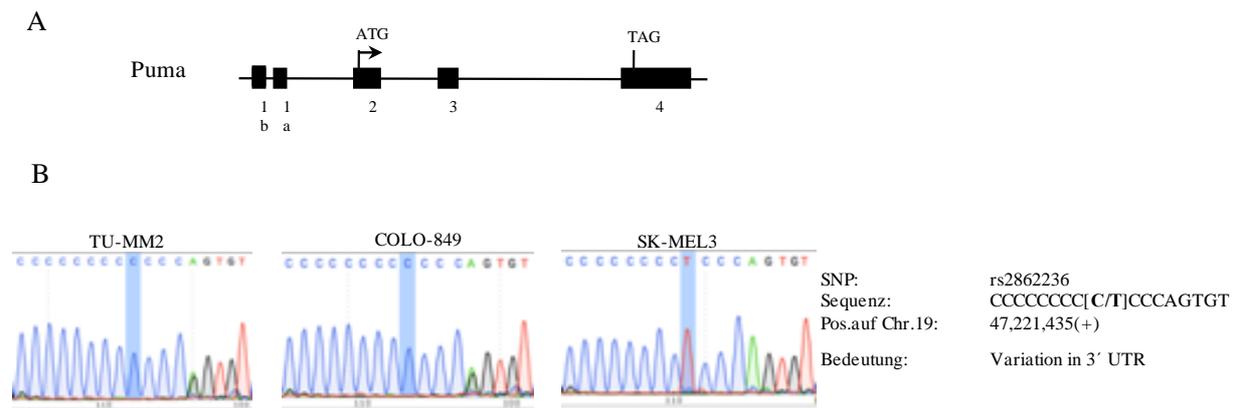


Abbildung 12: Die Zelllinien weisen keine Mutation in den kodierenden Regionen von *BBC3* auf
A) *BBC3* Genstruktur. Für die Sequenzierung wurden für Exon 2, 3 und 4 spezifische Primer designet.
B) Darstellung eines Ausschnitts der Gensequenz aus Exon 4. Die PCR Produkte wurden von der Firma MWG Eurofins sequenziert und dessen Ergebnisse SnapGene Viewer ausgewertet. An Position 47 221435 (+) des Chromosoms 19 wurde in TU-MM2 und COLO-849 ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) detektiert. SK-MEL3 dient dem Vergleich.

5.10 Die geringe PUMA Expression in Schleimhautmelanomen ist mit einer schlechten Prognose assoziiert

Die Untersuchung eines Melanom Kollektivs bestehend aus 129 kutanen und 29 mukosalen Melanomen bestätigte das in der Literatur beschriebene schlechtere Überleben der Patienten mit Schleimhautmelanom (Abbildung 13A) (Yu and Liu, 2015, Amit et al., 2017, Lengyel et al., 2003). Darüber hinaus konnte die erneute Auswertung der PUMA Expression in dem Patientenkollektiv hinsichtlich der immunhistochemischen Färbeintensität (Metzler, 2017) signifikante Unterschiede zwischen den Tumorentitäten bestätigen. In Schleimhautmelanomen ist PUMA signifikant schwächer exprimiert als in kutanen Melanomen ($p=0.03$) (Abbildung 13B). Darüber hinaus konnte die vorwärts gerichtete

proportionale Cox Regression die schlechte Prognose des Schleimhautmelanoms mit einer geringen PUMA Expression assoziieren (HR: 4,1; 95% CI:1,4; 12,6) (Abbildung 13 C).

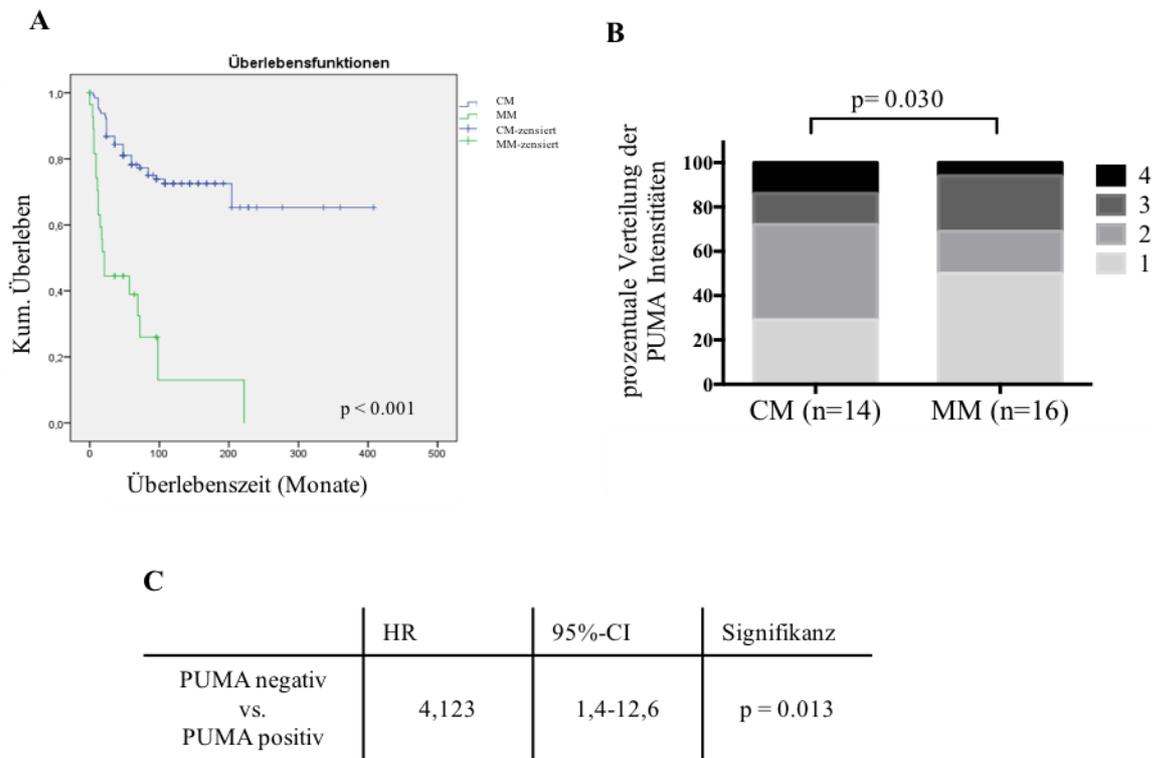


Abbildung 13: Eine schwache PUMA Expression ist mit einer schlechten Prognose assoziiert

A) Das Gesamtüberleben von 129 Patienten mit kutanem Melanom und 29 Patienten mit mukosalem Melanom ist in der Kaplan Meier Kurve dargestellt. **B)** Unterschiede in der PUMA Expression wurden durch immunhistologische Färbung untersucht. Es erfolgte eine erneute Auswertung des bereits gefärbten Patientenkollektivs (Metzler, 2017). (1- schwache, 2- moderate, 3- starke und 4- sehr starke Expression). **C)** Die vorwärts gerichtete proportionale Cox Regression wurde verwendet um einen Einfluss von PUMA auf das Überleben zu untersuchen. Kum. Überleben- kumulatives PDF Überleben, CM- kutanes Melanom; MM mukosales Melanom; n- Anzahl der Patienten; CI- Konfidenzintervall.

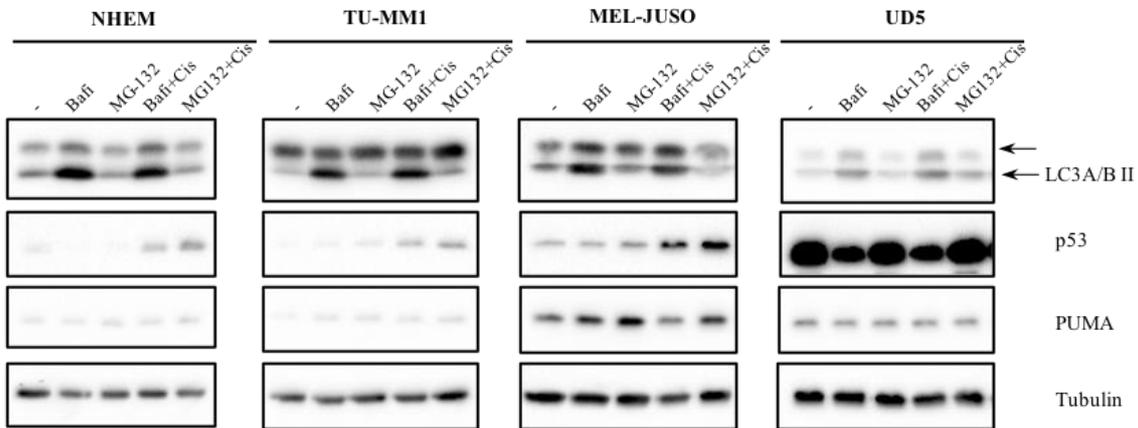
5.11 BBC3 mRNA weist eine niedrige Stabilitätsdauer auf

Die beobachteten geringen Proteinexpressionen in den Schleimhautmelanomen legten die Frage einer Überregulation des Protein- oder mRNA Abbaus nahe. Es konnte gezeigt werden, dass PUMA in Melanomen dem Autophagie-vermittelten Abbau unterliegt. Dieser nutzt die Degradierung vom PUMA zur Kontrolle der mitochondrialen Apoptose (Thorburn et al., 2014).

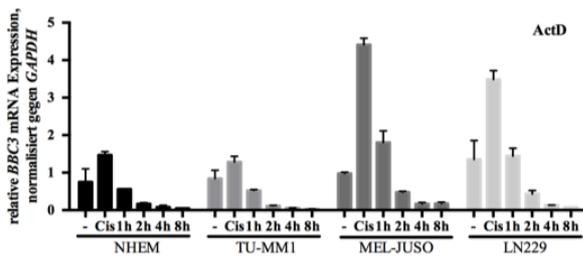
Für die Untersuchung des PUMA Proteinabbaus wurde der Autophagie vermittelte Proteinabbau mittels Bafilomycin und der proteasomale Proteinabbau mit MG-132 inhibiert. (Abbildung 14A). Bafilomycin inhibiert den Autophagie-vermittelten Abbau durch Inhibition einer ATPase, und verhindert damit die Ansäuerung und die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom (Mauvezin and Neufeld, 2015). MG-132 hingegen inhibiert die proteolytische Aktivität des 26S Proteasoms und blockiert damit den proteasomalen Abbau (Han et al., 2009). Zu dieser Behandlung wurde zusätzlich Cisplatin gegeben, um die Proteinexpression von p53 und damit die Expression von PUMA zu stimulieren. Beispielhaft wurde für dieses Experiment jeweils eine Zelllinie pro Tumorentität ausgewählt. Da die Behandlung mit Bafilomycin führte zur Inhibition der späten Autophagie und zur Anreicherung von Autophagosomen. Dies wurde durch eine Stabilisierung von Lc3 A/B II erkennbar. Die Inhibition des proteasomalen Abbaus von p53 war ausschließlich durch zusätzliche Stimulation mit Cisplatin deutlich. Wobei diese nur in den NHEM, TU-MM1 und MEL-JUSO durch Anreicherung des p53 Proteins auffiel. Interessanterweise zeigte UD-SCC 5 eine Reduktion der p53 Expression nach Behandlung mit Bafilomycin. Eine Änderung der PUMA Proteinexpression durch die Behandlung der Inhibitoren wurde in dieser Zelllinie nicht beobachtet. Einzig MEL-JUSO zeigte eine Stabilisierung der PUMA Expression nach Behandlung mit Bafilomycin, aber auch mit MG-132 (Abbildung 14A). Die Behandlung mit Cisplatin und MG-132 in Kombination führte in dieser Zelllinie zu einer detektierbaren Erhöhung der PUMA Expression. Die Inhibition des Proteinabbaus konnte vor allem in den Schleimhautmelanomen und den Melanozyten keine Proteinstabilisierung hervorrufen, weshalb unter anderem fehlregulierte transkriptionelle Mechanismen vermutet werden können. Die mRNA Stabilität wird in Säugetierzellen durch vielfältig Mechanismen reguliert (Wu and Brewer, 2012). Für die Regulation der PUMA Expression konnte eine Beteiligung der miRNAs miR-221 und miR-222 in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem dem Glioblastom, beobachtet werden (Zhang et al., 2010b, Zhang et al., 2010a). Daher diente die Glioblastomazelllinie LN229 als Kontrolle. Um die mRNA Stabilität zu untersuchen, wurden die Zellen zur Stimulation dieser zunächst für 24h mit Cisplatin behandelt, bevor die Translation mit Actinomycin D inhibiert wurde. Actinomycin D ist ein Antibiotikum, welches cyclische Polypeptide enthält. Es inhibiert die Elongation der RNA durch die RNA-Polymerase und blockiert somit die Neubildung von mRNA (Sobell, 1985). Die Ergebnisse der qRT-PCR für *BBC3* zeigten sowohl für die NHEM, als auch für TU-MM1 und MEL-JUSO eine im Vergleich zu *CDKN1A* schnelle Abnahme der mRNA Konzentration (Abbildung 14B; C). Die Konzentration von *BBC3* mRNA war nach einer Stunde nach

Inhibition der Translation schon auf die der unbehandelten Zellen gesunken. Eine fortwährende Reduktion der mRNA Konzentration wurde bis zu 8h nach Translationsstopp beobachtet. Im Vergleich dazu war eine deutlich längere Stabilität der mRNA Konzentration des p53 Zielgens *CDKN1A* beobachtbar (Abbildung 14 C). Für die als Kontrolle verwendete Glioblastomazelllinie wurde eine Beteiligung der miR-221 und miR-222 an der PUMA Regulation vorgestellt (Zhang et al., 2010b). Auch diese Zelllinie zeigte im Vergleich zu *CDKN1A* eine Degradation des *BBC3* mRNA Abbaus. Bei Stimulation der p53 vermittelten Expression von *BBC3* und *CDKN1A* und nicht inhibierter mRNA Synthese war die Expression über den beobachtenden Zeitraum konstant (Abbildung 14D, E).

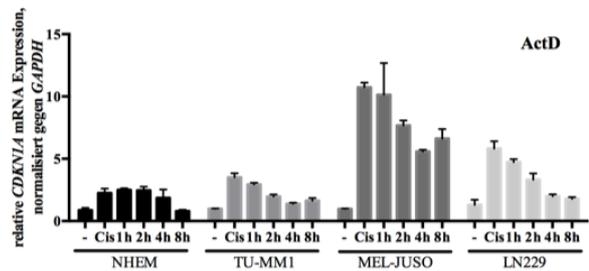
A



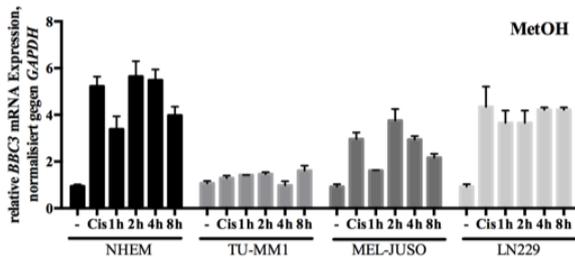
B



C



D



E

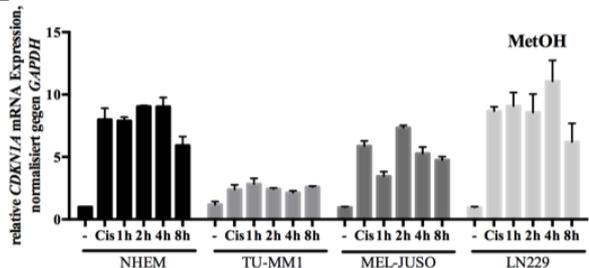


Abbildung 14: Melanozyten, Schleimhautmelanome und kutanen Melanome weisen eine deutlich verkürzte *BBC3* mRNA InHalbwertszeit auf

A) Für die Untersuchung der Proteinstabilität wurden NHEM, TU-MM1, MEL-JUSO und UD-SCC5 (UD5) mit 30nM Bafilomycin (Bafi), 100nM MG-132 und 8 μ M Cisplatin (Cis) für 24h behandelt oder unbehandelt (-) belassen. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. **B-E)** Für den Nachweis der mRNA Stabilität wurden die Zellen zunächst 8 μ M Cisplatin (Cis) für 24h behandelt. Zusätzlich wurden Zellen, welche mit 8 μ M Cis vorbehandelt waren, mit 3,98 μ M Actinomycin D (ActD) oder Methanol (MetOH) behandelt. Die RNA Isolation erfolgte dann nach 1h, 2h, 4h und 8h. Die in der qRT-PCR ermittelte Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet.

5.12 miR-221 und miR-222 sind für die geringe PUMA Expression verantwortlich

In der Literatur wurde beschrieben, dass die *BBC3* mRNA eine Zielstruktur der miR-221 und miR-222 ist (Zhang et al., 2010a). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser miRNAs mit Melanom-Progression steigt (Felicetti et al., 2008). Bisher wurde weder für kutane Melanome, noch für Schleimhautmelanome eine Beteiligung der miRNA an der Regulation der PUMA Expression beschrieben. Dies wäre besonders für die Schleimhautmelanome, welche eine im Vergleich zu den kutanen Melanomen reduzierte PUMA Proteinexpression aufweisen, interessant.

Um die Beteiligung der miRNAs an der PUMA Regulation in Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen zu untersuchen, wurde zunächst deren Expression ermittelt. Die Ergebnisse des miScript miRNA Arrays zeigten eine deutlich erhöhte Expression in TU-MM1, TU-MM2, TU-MM3, TU-MM4. Die Expression von miR-221-5p und miR-222-5p in Mel-JUSO war vergleichbar mit jener der Positivkontrolle LN229. NHEM, COLO-849, IGR-37, SK-MEL3 und SK-MEL30 wiesen eine vergleichsweise niedrige miR-221-5p und miR-222-5p Expression auf. (Abbildung 15A, B). Um eine funktionale Beteiligung an der PUMA Expression zu untersuchen, wurden NHEM, TU-MM1, MEL-JUSO und LN229 mit miRNA Inhibitoren transfiziert und anschließend die PUMA Proteinexpression nach 48h im Western Blot analysiert. Nach 48-stündiger Inhibition der miR-221-5p und miR-222-5p konnte in den TU-MM1 eine Induktion PUMA Expression beobachtet werden. Für NHEM, TU-MM1 und LN229 war dies nicht sichtbar (Abbildung 15C, D).

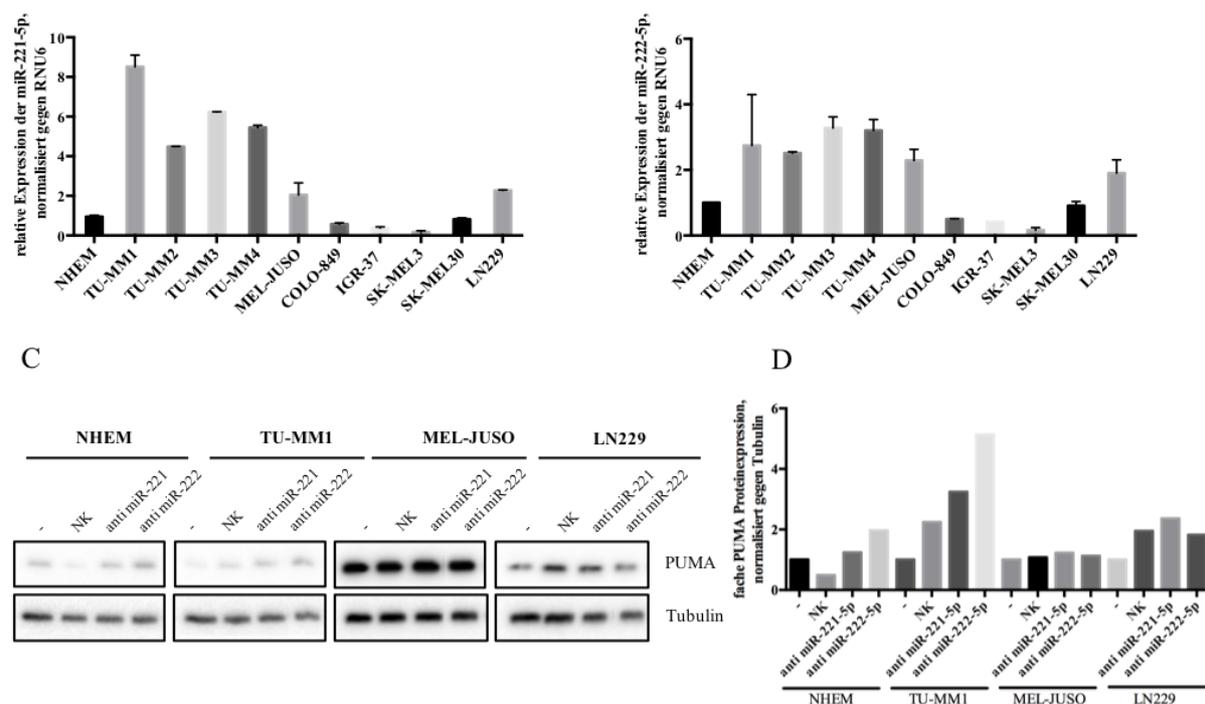


Abbildung 15: miR-221 und miR-222 regulieren die PUMA Expression in Schleimhautmelanonen

A, B) Für die Untersuchung der Expression der miRNAs wurde Gesamt-RNA mit Hilfe des miRNeasy Kits (Qiagen) isoliert und diese für die miScript cDNA-Synthese und qRT-PCR (Qiagen) verwendet. Die in der qRT-PCR ermittelte Genexpression wurde gegen *RNU6* normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet. **C)** Der Einfluss der miRNAs auf die PUMA Proteinstabilität wurde untersucht, indem die Zellen mit mirVana™ miRNA Inhibitor (LifeTechnologies) transfiziert wurden. Nach 48h erfolgte die Proteinisolierung und der Nachweis von PUMA im Western Blot. **D)** Densitometrische Analyse der Ergebnisse aus Abb. 13C mit der ImageLab™ Software (Bio-Rad). Die Normalisierung erfolgte mit Tubulin.

Zusammenfassend stellte sich p53, sofern es als Wildtyp vorlag, den p53-vermittelten Apoptose betreffend, als funktionell integriertes Protein dar. Es konnte in den Schleimhautmelanomen und der Mehrzahl der kutanen Melanome durch Cisplatinbehandlung stabilisiert werden. Die funktionelle Integrität konnte an Hand der Induktion einiger p53 Zielgene gezeigt werden. Die Behandlung mit Cisplatin hatte für den beobachteten Zeitraum keinen erkennbaren Effekt auf den Zelltod, da keine Caspase Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Im Gegenteil konnte eine Proliferation, obwohl nicht im gleichen Maß wie die der unbehandelten Zellen, nachgewiesen werden. Eine Auswirkung auf den Zellzyklus wurde deutlich, da die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Analysen eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase zeigten, wenngleich die Regulation des Zellzyklus auf Proteinebene für die untersuchten Proteine, vor allem für die kutanen Melanome, dieses Ergebnis nicht ausreichend erklärten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die initiale Funktion der Chemotherapie mit Cisplatin, die Induktion des Zelltods, in den untersuchten

Krebszellen, aber auch den Melanozyten nicht induzierbar war. Bei der Untersuchung des p53 vermittelten Apoptose Signalweges wurde für die Melanozyten und die Schleimhautmelanome die reduzierte PUMA Proteinexpression, sowie die in den Schleimhautmelanomen erhöhte miR-221 und miR-222 Expression, auffällig.

6. Diskussion

6.1 p53 ist in kutanen und mukosalen Melanomen funktionell integer

Der Tumorsuppressor p53 ist seit vielen Jahren Objekt intensiver Studien, da der p53 Signalweg bei der Entstehung einer Vielzahl von Krebserkrankungen beteiligt ist. Sehr häufig sind Mutation im *TP53* Gen für Fehlregulationen der Funktion verantwortlich. Jedoch können auch Defekte bei vorliegendem *TP53* Wildtyp, z.B. fehlerhafte Induktion oder defektes Ansprechendes des p53 Signalweges, vorliegen (Ryan et al., 2001).

In kutanen und mukosalen Melanomen sind *TP53* Mutationen selten (Kandoth et al., 2013). Sie können daher nur in einem geringen Anteil die molekularen Veränderungen, die zur Tumorentstehung beitragen, erklären. Dennoch wird von einer Akkumulierung des p53 Proteins in Melanomen berichtet, wobei die immunhistologisch positive Expression zwischen 50-94% in kutanen Melanomen und 21-80% in Schleimhautmelanomen schwankt. Interessanterweise kann in den einzelnen Studien kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tumorentitäten nachgewiesen werden. Ein positiver Feedback loop, induziert durch einen Funktionsverlust von p53, wird als Ursache der p53 Wildtyp-Akkumulation vorgeschlagen (Fritsche and Knopf, 2017, Blagosklonny, 1997).

In vorangegangenen Untersuchungen konnte die Induzierbarkeit von p53 nachgewiesen werden (Knopf et al., 2011). Dies wurde in Vorarbeiten und in dieser Arbeit durch eine Induktion der p53-Proteinexpression nach Cisplatin-Behandlung in den Wildtyp *TP53* Zelllinien bestätigt (Fritsche et al., 2015). Eine Erhöhung der mRNA Expression konnte nicht beobachtet werden, da die Aktivität des Tumorsuppressors hauptsächlich post-translational reguliert ist (Kruse and Gu, 2009). Die Zelllinie IGR-37 trägt, auf Grund der Verschiebung des Leserahmens, eine *TP53* Deletionsmutante (C229DelTG). SK-MEL3 trägt eine heterozygote *Missense* Mutation (R267W) und exprimiert im Gegensatz zu IGR-37 noch Wildtyp Transkripte (Gwodz et al., 2006). Eine Expression von p53 auf mRNA- und Proteinebene war in IGR-37 daher erwartungsgemäß nicht detektierbar. Für TU-MM1 war die Stabilisierung der Proteinexpression auf Grund biologischer Varianz nicht so deutlich zu erkennen wie zuvor publiziert (Fritsche et al., 2015). Dennoch wurde die Aktivierung durch Phosphorylierung an Serin 15 deutlich. Die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 hat eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung des Tumorsuppressors (Loughery et al., 2014), weshalb es hier als Hinweis auf die Aktivierung von p53 dient. Die Dauer der Phosphorylierung an

Serin 15 korrelierte mit der Dauer der Stabilisierung von p53. Interessanterweise wiesen die kutanen Melanome, bis auf SK-MEL30, eine Reduktion der Aktivierung nach 72h auf, während diese für die Schleimhautmelanome bestehen blieb. Für SK-MEL3 lag die Proteinexpression nach 72h sogar deutlich unter jener der unbehandelten Zellen, was einen negativen Feedback loop vermuten lässt. Für eine Aktivierung von p53 sprach neben der Phosphorylierung von p53 an Serin 15 die Induktion der Expression von unmittelbaren p53 Zielgenen wie *CDKN1A* (p21) in den Zellen mit Wildtyp p53. Erwartungsgemäß wies die Deletionsmutante IGR-37 keine p21 Gen- und Proteinexpression auf. Ebenso schien die Expression des p53 Wildtyp Transkripts und dessen, durch Phosphorylierung an Serin 15, sichtbare Aktivierung in SK-MEL3 funktionell nicht ausreichend zu sein. Die hohe basale p53 Expression in SK-MEL3 und SK-MEL30 ließ auf eine Fehlregulation zurückschließen. Die in diesen Zelllinien ausbleibende Expressionssteigerung von p21 stärkt die Hypothese eines positiven Feedback loop. Die Stabilisierung der Proteinexpression induzierte keine p53 Funktion, wodurch dessen Abbau bis zu einem Maximum inhibiert wurde. Eine weitere Inhibition des Abbaus und damit der Stabilisierung des Proteins wäre durch DNA-Schäden nicht mehr erreichbar. Daraus resultiert bei fehlender p53 Funktion eine hohe p53 Expression und fehlende Regulation (Blagosklonny, 1997, Fritsche and Knopf, 2017). Darüber hinaus erscheint es vorstellbar, dass diese Tumorzellen nach Induktion von DNA-Schäden einen Einfluss auf die post-translationale Modifikation nehmen, um eine Aktivierung von p21 und einen dadurch induzierten Zellzyklusarrest zu inhibieren (Loewer et al., 2010). Darüber hinaus bestätigte die fehlende Induktion in den *TP53* mutierten Zellen, dass die Cisplatin-Behandlung eine Induktion des Apoptose Signalweges nicht durch p53 unabhängige Mechanismen hervorrief.

Die durch p53 vermittelte Expression von *BBC3* (PUMA) wurde in Zellen mit Wildtyp *TP53* sichtbar, wenngleich diese nicht in allen Zellen gleich stark anstieg. Eine p53 Abhängigkeit wurde hier noch einmal durch die ausbleibende Induktion in den *TP53* mutierten Zellen bestätigt. Interessanterweise war in den Melanozyten und den Schleimhautmelanomen die PUMA Expression kaum detektierbar. MEL-JUSO, COLO-849 sowie IGR-37 zeigten eine Reduktion der Expression nach 72h. PUMA spielt für die p53 vermittelte Apoptose eine wichtige Rolle (Yu and Zhang, 2008). Es ist daher vorstellbar, dass die Expression dieses, aber auch anderer pro-apoptotischer Proteine, in Krebszellen fehlreguliert ist. Die veränderte Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine der BCL-2 Familie in Krebserkrankungen ist mehrfach beschrieben (Yip and Reed, 2008). Da eine Induktion auf mRNA Ebene, jedoch keine auf Proteinebene auffällig wurde, ist eine Regulation über den Proteinabbau möglich.

Eine Regulation der mRNA Stabilität wäre in den Schleimhautmelanomen und die Melanozyten ebenso denkbar, da diese eine kaum nachweisbare Proteinexpression aufwiesen. *GADD45A* ist ein weiteres p53 Zielgen, welches eine Reihe von Funktionen, zu denen DNA-Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle zählen, übernimmt (Tamura et al., 2012). Eine signifikante p53-vermittelte Induktion der *GADD45A* mRNA Expression nach Behandlung von Cisplatin war abhängig von der Zelllinie, wobei jedoch für alle Zelllinien eine Steigerung beobachtet wurde. Die auf mRNA Ebene beobachtete Induktion wurde auf Proteinebene nicht sichtbar. Darüber hinaus wurde nur in NHEM, TU-MM1, TU-MM2 und MEL-JUSO die Proteinexpression nachweisbar. Nach DNA-Schäden ist eine schnelle Aktivierung von *GADD45A* und der anderen Mitglieder der Gadd45 Proteinfamilie notwendig, um einen Zellzyklusarrest und/oder Apoptose zu induzieren (Tamura et al., 2012). Die Aktivität von *GADD45A* wird in Melanozyten und Melanomen mit der Fähigkeit Apoptose zu überwinden in Verbindung gebracht. In der Studie von Fayolle et al. wird *GADD45A* eine protektive Rolle zugesprochen, da die Induktion durch niedrige Dosen UV-Strahlung zu einem Zellzyklusarrest führt, welcher die DNA-Reparatur ermöglicht. Ferner wird die protektive Wirkung von *GADD45A* nicht nur für UV-Strahlung verursachte DNA-Schäden bewiesen, sondern auch für die durch Cisplatin (Fayolle et al., 2008). Während in dieser Studie eine hohe *GADD45A* Expression auf Grund unzureichender Apoptose-Induktion mit einer schlechten Prognose korreliert, ist dies für andere Tumorentitäten gegensätzlich. Eine Herunterregulierung von *GADD45A* kann im nicht-kleinzelligem Leberkarzinom und Hypophysenkarzinom detektiert werden (Tamura et al., 2012). Des weiteren weisen Patienten mit Oesophaguskarzinom ohne *GADD45A* Expression eine signifikant kürze Überlebensrate auf (Ishiguro et al., 2016). Die in dieser Arbeit beobachtete niedrige, aber dennoch induzierbare Expression von *GADD45A*, welche auf Proteinebene nicht sichtbar wurde, könnte durch die durch p53 induzierte Expression der miRNA miR-130b, wie es für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom beobachtet wurde, erklärt werden (Li et al., 2017).

Als weiteres transkriptionelles Zielgen von p53 wurde die in der vorliegenden Arbeit die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax untersucht. Eine Induktion der mRNA Expression konnte für alle Zellen nachgewiesen werden, wenngleich diese nur in MEL-JUSO ein signifikantes Niveau erreichte. Die Induktion war auf Proteinebene hingegen nach 24h weniger deutlich, stieg jedoch bis zu 72h an. Interessanterweise wurde die Proteinexpression des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 ebenso nach Cisplatin-Gabe in den Schleimhautmelanomen hochreguliert. In den kutanen Melanomen dahingegen zeigten nur COLO-849, IGR-37 und SK-MEL30 eine detektierbare BCL-2 Expression, welche sich aber

unter Behandlung nicht änderte. Die Expression von BCL-2 wird in verschiedenen Tumorentitäten mit Chemotherapie-Resistenz in Zusammenhang gebracht werden (Cho et al., 2006, Sartorius and Krammer, 2002, Grover and Wilson, 1996). Eine BCL-2 vermittelte Cisplatin-Resistenz, wie sie für kutane Melanome beschrieben wird, war auf Grund der nicht nachweisbaren Proteinexpression in MEL-JUSO, COLO-849 und SK-MEL3 für diese Zellen nicht denkbar. Andere Studien zeigen eine Herunterregulation von BCL-2 in kutanen Melanomen im Vergleich zu gutartigen Naevi. Hussein et al. schlussfolgern daraus, dass die BCL-2 Herunterregulation und die damit erhöhte Apoptoserate, die hohe Mitoserate und das anhaltende Wachstum der Melanomzellen nicht kompensieren kann (Hussein et al., 2003). BCL-2 reguliert die Fähigkeit von Bax, Poren in der äußeren mitochondrialen Membran zu bilden, in dem es direkt mit Bax konkurriert. Dadurch wird die Heterooligomerisierung gefördert und die Bax Homooligomerisierung inhibiert. Damit kann BCL-2 direkt die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran abschwächen (Andreu-Fernandez et al., 2017). Funktionelle Rückschlüsse auf die Induzierbarkeit der Apoptose bei grundsätzlicher Induzierbarkeit von Bax und nicht detektierbarem bzw. regulierbarem BCL-2 sind nicht möglich. Die Apoptose ist durch weitere pro-apoptotische Proteine wie BAK oder BID und anti-apoptotische Proteine wie BCL-xL und Mcl-1 gesteuert (Shamas-Din et al., 2013). Da diese nicht untersucht wurden, kann keine detailliertere Aussage zur Regulation zur Apoptose Induktion gegeben werden.

Weiterhin konnte eine deutlich erhöhte Expression in Melanomen, verglichen mit Melanozyten, für *BCL2A1* beschrieben werden (Riker et al., 2008). Jene Ergebnisse kann die vorliegende Arbeit nicht bestätigen. Darüber hinaus zeigten die kutanen Melanome eine reduzierte *BCL2A1* Expression, welche in SK-MEL3 nach Cisplatin Behandlung deutlich herunterreguliert wurde. Interessanterweise konnte in den Schleimhautmelanomen keine, bzw. im Vergleich zu den Melanozyten nicht nachweisbare, *BCL2A1* Expression detektiert werden. In 30-40 % der Melanome ist *BCL2A1* signifikant verstärkt exprimiert und ist essentiell für das Überleben der Zellen, welche dieses Gen vermehrt exprimieren. Zusammen mit der *BRAF(V600E)* Mutation fördert es die Tumorigenese (Haq et al., 2013). Die kutanen Melanome als auch die Schleimhautmelanome wurden auf Grund der geringen Expression in die Gruppe der nicht *BCL2A1* amplifizierenden Melanome eingeteilt. Eine weitere Untersuchung der Bedeutung von *BCL2A1* war für diese Zellen daher nicht substanziell.

Zusammenfassend konnte die funktionelle Integrität von p53 in Hinblick auf die Induzierbarkeit direkter Zielgene bestätigt werden. Die Intensität war dabei abhängig von der Zelllinie. Funktionelle Untersuchungen zur Regulation der Proteinexpression, welche die

Fragen zur fehlenden GADD45A und BCL-2 Expression klären, können angeschlossen werden. Die Untersuchungen klären keine Fragen zur funktionellen Interaktion des p53 Netzwerkes in kutanen und mukosalen Melanomen, sondern untermauern die Annahme der generellen Funktionsfähigkeit von p53. In vielen Fällen war eine deutlich reduzierte Genexpression der p53 Zielgene im Vergleich zu den Melanozyten auffallend, welche durch fehlregulierte post-transkriptionelle Mechanismen erklärt werden könnte. So sind z.B. eine Reihe verschiedener miRNAs beschrieben, dessen Fehlregulation in Melanomen auf die Proliferation, die Invasion, das Überleben und die Immunantwort Einfluss nehmen (Segura et al., 2012).

6.2 Die Behandlung mit Cisplatin verlangsamt das Wachstum von kutanen und mukosalen Melanomen

Das Ziel von Anti-Krebs-Therapien ist entweder die Beseitigung von Tumorzellen durch Auslösen der Apoptose oder die irreversible Arretierung dieser in der G1-Phase des Zellzyklus (Mattia et al., 2018). Die Untersuchungen zur funktionellen Integrität von p53 konnten eine Aktivierung von p53 durch Cisplatin und die grundsätzliche Initiierung der Apoptose-, DNA-Reparatur- und Zellzyklus Regulations-Signalwege nachweisen, wenngleich diese hauptsächlich auf Transkriptionsebene detektierbar war. Weiterführend wurde das Ansprechen der Melanomzellen auf die Apoptose und den Zellzyklus untersucht. Für die Induktion der Apoptose sind eine Reihe von Proteasen, die Caspasen, notwendig. Sie werden als inaktive Vorläufer exprimiert und unterlaufen eine proteolytische Spaltung an internen Asparaginsäureresten, wodurch sie aktiviert werden. (Logue and Martin, 2008). Der Nachweis der Spaltprodukte der Initiator Caspase (Caspase 9) und Effektor Caspase (Caspase 3) sowie des nukleären Enzyms PARP gibt daher einen Aufschluss über die Apoptose in den Zellen. Interessanterweise konnte weder in den mukosalen, noch in den kutanen Melanomen ein Hinweis auf Apoptose gefunden werden. Eine Behandlung mit physiologischen Cisplatin-Konzentrationen konnte auch nach 72h Cisplatin Behandlung keine Apoptose induzieren. Eine Änderung in der Genexpression von *CASP9* wurde nicht detektiert. Die Expression der Caspase 9 wird kontrolliert durch den Transkriptionsfaktor AP-4 (*Activating Enhancer-Binding Protein 4*), ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, welcher die basale Expression von *CASP9* aufrechterhält. Schwankungen der AP-4 Konzentration haben keine starken Auswirkungen auf die *CASP9*

Expression (Tsujiimoto et al., 2005). Eine gleichbleibende Genexpression, wie es auch die hier dargestellten qRT-PCR Ergebnisse zeigten, war daher zu erwarten.

Des Weiteren wurde die fehlende Induktion der Apoptose durch die Untersuchung der Zellproliferation bestätigt. Die Zellen, bis auf COLO-849, wiesen trotz der Behandlung mit 8µM Cisplatin keine Abnahme in der Zellzahl auf. Darüber hinaus zeigten die untersuchten Melanozyten, Schleimhautmelanome und kutanen Melanome ein fortschreitendes Wachstum, wenn auch dieses im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verlangsamt war. Unter allen Zellen zeigten COLO-849 und IGR-37 die beste Ansprechrate auf Cisplatin. Diese kann durch eine Verzögerung der Zellzyklusprogression und nicht, wie es erwartet wurde, durch Apoptose erklärt werden. Der Zellzyklus wird durch die Expression der Cycline reguliert, welche abhängig von der Zellzyklusphase synthetisiert und degradiert werden. Sie regulieren die Aktivität der CDKs, welche wiederum den abwärts gerichteten Signalweg durch Phosphorylierung ausgewählter Proteine beeinflussen (Malumbres and Barbacid, 2009, Vermeulen et al., 2003). Bei der Betrachtung der mRNA Konzentrationen der Cycline wurde deutlich, dass die Melanozyten, Schleimhautmelanome und kutanen Melanome die Expression von *CCNA2* (Cyclin A2) und *CCNB1* (Cyclin B1) nach 24h Cisplatin-Behandlung deutlich herunterregulieren. Die Schleimhautmelanome regulierten zusätzlich die *CDK1* Expression herunter. Auf Grund der geringen Cyclin A2 und Cyclin B1 Proteinexpression in den Schleimhautmelanomen, welche durch eine sichtbar verminderte mRNA Expression erklärt werden konnte, war die veränderte Expression schwer erklärbar. Die Melanozyten zeigten ab 48h, die TU-MM4 nach 24h Cisplatin-Behandlung eine Reduktion der Proteinexpression von Cyclin A2. TU-MM3 zeigte dies für Cyclin A2 und Cyclin B1. Interessanterweise wiesen die kutanen Melanome wie die Melanozyten nach 48h eine reduzierte Expression dieser Cycline auf. Die beobachtete Reduktion der *CCNA2* und *CCNB1* mRNA Expression war nach 24h in den kutanen Melanomen auf Proteinebene nicht sichtbar. Es kam überdies zu einer Stabilisierung der Proteinexpression nach 24h. Die reprimierte mRNA Expression wurde für MEL-JUSO und COLO-849 erst nach 48 h durch verminderte Proteinexpression deutlich. Dies erklärt die Akkumulation von Zellen in der S-Phase nach 24h Cisplatin-Behandlung. Die Cyclin A2 Konzentration ist während der G0 gering, steigt während des Zellzyklus an und erreicht die höchste Konzentration in der S- und G2/M-Phase (Yang et al., 1999). Demnach ist die Expression in unbehandelten Zellen, welche sich hauptsächlich in der G0 bzw. G1-Phase befanden, geringer, als in S-Phase arretierten Zellen nach 24h Cisplatin-Behandlung. Ein S-Phase Arrest war für die Schleimhautmelanome nicht so deutlich erkennbar. Übereinstimmend dazu zeigte keine der Schleimhautmelanomzellen

eine Stabilisierung der Cyclin A2 und Cyclin B1 Expression. Bei ihnen war die transkriptionelle Repression auf Proteinebene nachweisbar. Der Übergang von der G1- in die S-Phase wird zudem durch die E2F Transkriptionsfaktor Familie reguliert. In der G0/G1 Phase ist dieser an Rb (Retinoblastoma Protein) gebunden und dadurch inhibiert. Die Inaktivierung von Rb durch Phosphorylierung durch CDKs in der späten G1-Phase ermöglicht die Aktivierung der E2F Proteine. Diese induzieren die Expression von Genen, welche für den S-Phase-Eintritt und die Zellzyklusprogression notwendig sind. Zielgene dieser Proteinfamilie sind unter anderem *CCNA2* und *CDK1* (Bracken et al., 2004). Eine Desphosphorylierung von Rb war für die untersuchten Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte detektierbar, wodurch die reduzierte Expression von *CDK1/CDK1* und *CCNA2/Cyclin A2* erklärt werden kann. In der Zellzyklusprogression wird der G1/S Übergang durch einen positiven Feedback loop verstärkt. So führt die Phosphorylierung von transkriptionellen Inhibitoren durch CDKs zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren für Gene, welche für den G1-S Übergang notwendig sind. Diese Gene kodieren Cycline, die wiederum die Aktivität der CDKs fördern (Bertoli et al., 2013). Dieser Mechanismus kann durch den CDK1 Inhibitor p21 unterbrochen werden. p21 gehört zu den CDK Inhibitoren, welche verschiedene CDK-Cyclin Komplexe inhibieren. Eine Induktion der p21 Expression konnte detektiert werden, wodurch eine Inhibierung des positiven Feedback loops möglich ist. Darüber hinaus ist eine indirekte Inhibierung von CDK1 und CDK2 durch einen bislang unbekanntem Mechanismus beschrieben (Abbas and Dutta, 2009). Die in IGR-37, SK-MEL3 und SK-MEL30 stabil gebliebene *CCNA2/Cyclin A2* Konzentration kann daher durch die fehlende p21 Expression und die damit inhibierte CDK vermittelte Expression von *CCNA2* erklärt werden. Darüber hinaus ist p21 notwendig und ausreichend für die p53 vermittelte Repression von *CDK1* und *CCNB1* (Abbas and Dutta, 2009). Eine Regulation dieser Zielstrukturen war in diesen Zellen auf Grund der fehlenden p21 Induktion ebenso nicht nachweisbar. Die Expression von *CCND1/Cyclin D1* und *CCNE1/Cyclin E1* war in den Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen nur unmerklich reguliert. Diese Proteine regulieren die G1- und den G1/S Übergang (Vermeulen et al., 2003), während die Cisplatin induzierten DNA-Schäden einen p21 vermittelten S-Phase-Arrest induzieren (Wrighton et al., 2004).

Interessanterweise war in den Melanozyten neben der Repression von Cyclin A2 und Cyclin B1 eine deutliche Reduktion der Cyclin D1 Expression beobachtbar. Des Weiteren zeigten diese keine Verschiebung des Zellzyklus durch Cisplatin- oder Nocodazol-Behandlung. Nocodazol zerstört die Funktion der Mikrotubuli durch Bindung an verschiedene Seiten des β -Tubulins und behindert damit die Dynamik der Mikrotubuli. Die dadurch

induzierte Mikrotubuli-Depolymerisation führt zum G2/M Arrest (Blajeski et al., 2002, Cooper et al., 2006). Krebszellen weisen im Gegensatz zu nichtmalignen Zellen eine deutlich erhöhte Proliferationsrate auf. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die nicht malignen Melanozyten durch die langsamere Zellzyklusprogression keine Veränderung nach Cisplatin oder Nocodazol aufwiesen. Allgemein sind Chemotherapeutika darauf ausgerichtet, die Teilung von schnell wachsenden Zellen zu inhibieren, welches der Charakteristik von Krebszellen entspricht (Perez-Herrero and Fernandez-Medarde, 2015). Die nach 48h der Cisplatin-Behandlung reduzierte Cyclin D1 Expression wies darauf hin, dass die Melanozyten primär mit einer Arretierung der G1 Phase reagieren, was sich im Histogramm auf Grund der im Vergleich langsamen Zellzyklusprogression unbehandelter Zellen nur unzureichend detektieren ließ.

Schlussfolgernd war für die Krebszellen eine Reaktion auf die Cisplatin-Behandlung nicht durch Apoptose, sondern durch Akkumulation der Zellen in der S-Phase zu beobachten. Ähnlich zu der Schlussfolgerung von Hussein et al. (Hussein et al., 2003), kann die erhöhte Mitoserate der in dieser Arbeit untersuchten Krebszellen, die erhöhte Rate an Zellen mit S-Phase Arrest nicht vollständig kompensieren, was durch verlangsamtes Wachstum in den Proliferationskurven deutlich wurde.

6.3 DNA-Reparatur Mechanismen zeigen nach Cisplatin Behandlung ein geringes Ansprechen

Vielfältige DNA-Reparaturmechanismen sind in der Lage, fehlerfrei DNA-Schäden zu reparieren, welche durch endogene oder exogene genotoxische Agenzien induziert werden. Die schädigende Wirkung der antitumoralen Medikamente kann in Krebszellen durch die Überexpression von Proteinen der DNA-Reparatur überwunden werden. Im metastasierenden Melanom sind jene Reparaturmechanismen aberrant, welche besonders effizient bei der Reparatur von DNA-Schäden sind, die durch die zytotoxischen Chemotherapeutika induziert werden (Sarasin and Dessen, 2010).

Das platin-basierte Medikament Cisplatin ist ein effizientes Chemotherapeutikum für eine Vielzahl von soliden Tumoren. Die durch Cisplatin induzierten Intra- und Interstrang Quervernetzungen werden durch die Nukleotid Exzisionsreparatur, aber auch durch die Kombination der Nuklease Aktivität und der Reparatur durch Homologe Rekombination (HRR- *homologous recombination repair*) repariert. Für Melanome ist ein neuer

DNA-Reparatur Mechanismus beschrieben, welcher die Proliferation der Zellen in Gegenwart von Cisplatin erlaubt. Dieser Mechanismus beinhaltet die Inaktivierung des HRR- Schlüsselproteins RAD51, die Induktion der Translation der DNA-Polymerase ζ und der Induktion der Endonukleasen ERCC1-XPF (Song et al., 2017). Die in dieser Studie beobachtete Repression von RAD51 konnte in den Schleimhautmelanomen schon nach 24h, in den Melanozyten und kutanen Melanomen nach 48h beobachtet werden. Interessanterweise wiesen die Zellen IGR-37, SK-MEL3 und SK-MEL30 eine schwache Reduktion der RAD51 Expression auf. Dies impliziert eine Assoziation der p53 Aktivität mit der Regulation der RAD51 Proteinexpression. Es konnte gezeigt werden, dass p53 durch transkriptionelle Repression von RAD51 die homologe Rekombination reguliert (Arias-Lopez et al., 2006). Die in der Studie von Song et al. beobachtete Stabilisierung der ERCC1 Proteinexpression konnte für die in dieser Arbeit untersuchten Zellen nicht detektiert werden.

UV-Strahlung und die damit einhergehenden DNA-Schäden werden als häufigste Ursache der Entstehung von kutanen Melanomen angesehen. Diese Schäden aktivieren die Basen-Exzisionsreparatur (BER), wobei XRCC1 eine wichtige Rolle spielt. Der Verlust der XRCC1 Expression ist assoziiert mit der Progression von dysplastischen Nävi zum primären Melanom. Darüber hinaus spielt es eine Rolle bei der Progression zum metastatischen Melanom, da durch XRCC1 dessen inhibitorische Wirkung auf die Invasion und Migration verloren geht (Bhandaru et al., 2014). In den Schleimhautmelanomen war die Expression von XRCC1 auf mRNA und Proteinebene im Vergleich zu den kutanen Melanomen reduziert, was für die Aggressivität dieser Erkrankung spricht. Eine deutliche Regulation konnte für beide Tumorentitäten nicht beobachtet werden, wenngleich MEL-JUSO eine leichte Repression nach 72h und SK-MEL30 eine Induktion nach 48h aufwiesen. Generell scheint XRCC1 durch die ausbleibende Reaktion auf die Behandlung mit Cisplatin keine Rolle für die Cisplatin Resistenz zu spielen, wie es z. B. für das Magenkarzinom beschrieben ist (Xu et al., 2014).

Darüber hinaus wird die Resistenz von Melanomzellen gegenüber Interstrang Quervernetzungen induzierenden Chemotherapeutika durch die p53 hervorgerufene Induktion der DDB2 und XPC vermittelten DNA-Reparatur erklärt (Barckhausen et al., 2014). p53 übernimmt eine transkriptionelle regulatorische Funktion in der NER durch die Induktion von *DDB2* und *XPC* (Adimoolam and Ford, 2003). Für MEL-JUSO, COLO-849, SK-MEL3 sowie für die Melanozyten konnte eine Induktion der *DDB2* und *XPC* mRNA Expression beobachtet werden. Für die Schleimhautmelanome, für die keine *TP53* Mutation detektiert werden konnte, ist die Transkriptions-Induktion nicht einheitlich nachweisbar. Lediglich

TU-MM3 und TU-MM4 wiesen eine mRNA Expressionssteigerung auf, welche auch durch Stabilisierung der Proteinexpression sichtbar wurde. Für die kutanen Melanome wurde die Induktion der mRNA Expression nur für MEL-JUSO sichtbar. Eine Beurteilung über die Bedeutung des NER für die Cisplatin-Resistenz in Schleimhaut- und kutanen Melanomen ist ohne weitere Untersuchung des Reparaturmechanismus nicht möglich, da der proteasomale Abbau von DDB2 und XPC für die funktionelle Integrität des Reparaturmechanismus wichtig ist. Daher ist die fehlende Induktion auf Proteinebene nicht aussagekräftig. DDB2 wird an der Schadensstelle durch die E3 Ubiquitinligase Cullin 4A für den proteasomalen Abbau markiert, wodurch XPC an die Schadensstelle rekrutiert wird. Der Cullin 4A vermittelte proteasomale Abbau von XPC ist wiederum für die Rekrutierung von XPG an die Schadensstelle notwendig. Wird XPC nicht abgebaut, hat dies Auswirkungen auf die Einbeziehung von XPG und die Effizienz der Reparatur (El-Mahdy et al., 2006, Wang et al., 2007a). Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass in den Wildtyp *TP53* exprimierenden Zellen der von Song et al. beschriebene neue DNA-Reparaturmechanismus für die Proliferation der Zellen in Gegenwart von Cisplatin verantwortlich ist. Dennoch konnten Zellen, welche eine *TP53* Mutation tragen (IGR-37 und SK-MEL3) sowie SK-MEL30, welche eine unbekannte Fehlregulation aufwies, ebenso in Anwesenheit von Cisplatin proliferieren. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um einen DNA-Reparaturmechanismus zu identifizieren, der dies erklären kann.

Während *TP53* Mutationen in Melanomen selten sind, sind in speziell in kutanen Melanomen Mutationen in *N-RAS* und *B-RAF*, der Verlust der *PTEN* Expression, die Aktivierung des Akt/PI3K Signalweges und der Verlust von *CDKN2A* Schlüsselereignisse, welche die Tumorprogression fördern (Anvekar et al., 2011). Diese können einen Einfluss auf die untersuchten Mechanismen haben. Unterschiede in diesen molekularen Mechanismen, welche die Differenz in der Aggressivität der beiden Tumorerkrankungen erklären könnten, sollten daher vielfältiger erforscht werden können.

6.4 miR-221 und miR-222 spielt eine Rolle bei der PUMA Regulation in Schleimhautmelanomen

Die Untersuchungen zum Apoptose Signalweg, Zellzyklus und der DNA-Reparatur konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen Schleimhautmelanom und kutanem Melanom aufzeigen, welche das klinisch aggressivere Verhalten der Schleimhautmelanome erklären.

Neben der fehlenden Expression von *BCL2A1*, war die nicht nachweisbare Expression von PUMA in den Schleimhautmelanomen auffällig.

PUMA spielt eine entscheidende Rolle bei der p53-vermittelten Apoptose, da es nahezu vollständig die pro-apoptotische Aktivität von p53 übernimmt (Yu and Zhang, 2008). Die p53 vermittelte Apoptose ist der durch Chemotherapie induzierte Mechanismus, welcher PUMA erfordert. Interessanterweise ist nachgewiesen, dass eine verminderte Expression des Apoptose Induktors mit der Melanom-Progression und einer schlechten Prognose korreliert (Karst et al., 2005). Es wird gezeigt, dass die Aktivität von PUMA in verschiedenen Therapiemodellen entscheidend für die Apoptose Induktion in Melanomzellen ist. So führt die Behandlung von Melanomzellen mit MEK Signalweginhibitoren zur Induktion von PUMA und anderer pro-apoptotischer Proteine sowie zur Repression anti-apoptotischer Proteine (Wang et al., 2007b). Des Weiteren wird gezeigt, dass die Induktion von Stress im Endoplasmatischem Retikulum in Melanomzellen Apoptose hervorruft, was mit der direkten Hochregulation von PUMA einhergeht (Jiang et al., 2008).

Die Untersuchung von Patienten mit Schleimhautmelanom und vergleichend mit kutanen Melanomen offenbarte signifikant unterschiedliche PUMA-Expressionen. Darüber hinaus konnte die Cox Regression zeigen, dass eine niedrige PUMA Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Diese Ergebnisse stimmen mit der Studie von Karst et al. überein, welche eine niedrige PUMA Expression mit der Melanomprogression assoziieren (Karst et al., 2005). Eine niedrige PUMA Expression ist damit für Patienten mit Schleimhautmelanom von prognostischer Relevanz. Übereinstimmend zu dem Patientenkollektiv zeigten die Schleimhautmelanom-Zellen ebenso eine reduzierte PUMA Proteinexpression. Eine Induktion der *BBC3* Expression konnte in den Wildtyp *TP53* Zellen detektiert werden, jedoch war auf Proteinebene keine Regulation, in den Schleimhautmelanomen sogar keine Proteinexpression detektierbar. Im Vergleich zu *TP53*, bei denen hunderte verschiedene Mutationen bekannt sind, sind für *BBC3* nur sehr wenige beschrieben (Chen et al., 2014). Sequenzanalysen der kodierenden Region von PUMA bestätigten die geringe Mutationslast. In den untersuchten Zellen wurde keine PUMA Mutation detektiert. Lediglich in TU-MM2 und COLO-849 wurde ein bereits beschriebener SNP (rs2862236) gefunden. Auf Grund der Lokalisierung in der 3'-UTR wurde diesem keine weitere Bedeutung zugeschrieben.

Um die Ursache der fehlenden Induzierbarkeit von PUMA zu untersuchen, wurde die Proteinstabilität untersucht. Der proteasomale Abbau wurde durch MG-132 und der Autophagie vermittelte Abbau durch Bafilomycin inhibiert. Fricker et al. berichten über eine

Beteiligung des Proteasoms am PUMA Abbau, da dieser durch den Proteasom Inhibitor MG-132 verlangsamt wird (Fricker et al., 2010). In einer anderen Studie werden die leicht erhöhten PUMA Proteinkonzentrationen bei Behandlung mit MG-132 durch eine erhöhte p53 Stabilisierung und die damit verursachte Expression des p53 Zielgens PUMA, erklärt. Darüber hinaus zeigen sie, dass der Abbau spezifisch durch das Anti-Malaria Medikament Chloroquin inhibiert werden kann. Während Chloroquin als Autophagie Inhibitor verwendet wird, scheint der PUMA vermittelte Abbau Chloroquin-spezifisch, jedoch nicht Autophagie-spezifisch zu sein (Lakhter et al., 2013). Bafilomycin hemmt eine V-Typ ATPase in der Membran von Autophagosomen und dadurch die Ansäuerung und Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom. Dies wird durch die Stabilisierung des Autophagie-Markers Lc3A/B II erkennbar (Mauvezin and Neufeld, 2015). Dennoch konnte in den Melanozyten und der Schleimhautmelanomzellen TU-MM1 nach Behandlung mit Bafilomyin keine PUMA Stabilisierung induziert werden. Lediglich eine leichte Stabilisierung von PUMA in MEL-JUSO konnte durch Bafilomycin beobachtet werden. Die durch MG-132 erhöhte Proteinmenge ist möglicherweise auch hier durch die erhöhte p53 Expression erklärbar. Die zusätzliche Induktion des Signalwegs mit Cisplatin führte jedoch nicht zu einer erhöhten PUMA Expression. Die als Kontrolle verwendete Zelllinie UD5 weist eine *TP53* Mutation (V157F) auf (Lin et al., 2007) und zeigte daher keine Induktion von PUMA. Eine Beteiligung eines erhöht aktivierten Proteinabbaus konnte daher als Ursache für die geringe PUMA Expression bzw. die fehlende Induktion ausgeschlossen werden.

Proteinkonzentrationen sind jedoch nicht nur über post-translationale Mechanismen regulierbar, sondern auch durch post-transkriptionelle Mechanismen. Deshalb ist eine direkte Korrelation von Proteinkonzentrationen und mRNA Menge nicht immer möglich (Franks et al., 2017). Um eine Beteiligung post-transkriptioneller Mechanismen an der PUMA Regulation zu untersuchen, wurde die mRNA Stabilität überprüft. Nach Induktion des Signalwegs mit Cisplatin wurde eine Induktion der *BBC3* Expression detektierbar. Nach Inhibition dieser mit Actinomycin D, einem Inhibitor der RNA Synthese (Sobell, 1985), konnte nach einer Stunde eine signifikante Reduktion der mRNA Konzentration detektiert werden. Die Repression für die untersuchten Zellen erreichte nach einer Stunde das Niveau der unbehandelten Zellen. Für TU-MM1 lag dies sogar darunter. Eine schrittweise erfolgende Abnahme der *BBC3* Konzentration konnte detektiert werden. Nach 8h der Actinomycin D Behandlung war die *BBC3* mRNA kaum noch nachweisbar. Im Kontrollversuch ohne Actinomycin D Behandlung wurde deutlich, dass die Induktion mit Cisplatin zu einer über den beobachteten Zeitraum stabil erhöhten mRNA Expression führte. Diese Ergebnisse

deuten auf einen Mechanismus hin, der aktiv zur *BBC3* Degradation führt. Um auszuschließen, dass es sich dabei um physiologische Effekte für p53 Zielgene handelt, wurde *CDKN1A* als weiteres Zielgen untersucht. Nach Inhibition der RNA-Synthese konnte eine stabile mRNA Konzentration nachgewiesen werden, welche über den Zeitraum nur langsam reduziert wurde. Da die Halbwertszeit einzelner mRNAs variieren kann, wurde nach Ursachen für die *BCC3* Repression gesucht. Die mRNA Stabilität kann durch verschiedene Mechanismen, welche Deadenylierung abhängiges und unabhängiges *Poly(A) Decapping* oder Spaltungen durch Endonukleasen beinhalten, reguliert werden (Day and Tuite, 1998). Ebenso werden Fehlregulationen der miRNAs, welche dadurch als Onkogene oder Tumorsuppressoren wirken, für Krebserkrankungen beschrieben (Peng and Croce, 2016). Im Jahr 2010 konnte erstmals gezeigt werden, dass *BBC3* eine Zielstruktur der miRNAs miR-221 und miR-222 in epithelialen Tumoren ist (Zhang et al., 2010a). Es folgten Studien, die eine miR-221 und miR-222 Beteiligung an der PUMA Regulation im Blasenkarzinom, Osteosarkom und Glioblastom beschreiben (Zhang et al., 2016, Zhang et al., 2010b, Zhang et al., 2010a, Fu et al., 2015). Da die Beteiligung der miRNAs für das Glioblastom bereits beschrieben ist, wurde die Glioblastomzelllinie LN229 in den Versuchen zur mRNA Stabilität als Kontrolle verwendet. Für Melanome ist eine Partizipation der miR-221 und miR-222 an der Melanom Progression beschrieben. Es wird gezeigt, dass die mit der Melanomprogression steigende Expression der miRNAs invers mit der Expression der Zielgene *c-KIT* und *CDKN1B* korreliert (Felicetti et al., 2008). Die Inhibierung des CDK Inhibitors p27 (*CDKN1B*) führt auf Grund der fehlenden Hemmung des G1/S-Phase Komplexes Cyclin D1-CDK4 zur unkontrollierten Proliferation in die S-Phase (Segura et al., 2012). Darüber hinaus wird gezeigt, dass miR-221 und miR-222 die PTEN Expression blockieren, dadurch zur Aktivierung des Akt Signalweges und zur Regulierung der Proliferation und Invasion führen kann (Garofalo et al., 2009). Außerdem wird beschrieben, dass in kutanen Melanomen die Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase der Regulation der miR-221 unterliegt. Igoucheva et. al. gehen davon aus, dass die Mehrzahl der kutanen Melanome eine *BRAF* Mutation trägt, welche die c-Kit vermittelte Apoptose hemmt und so das Überleben sichert. Jedoch werden für c-Kit kontroverse Funktionen beschrieben. Die Rezeptor-Tyrosinkinase induziert sowohl pro- als auch anti-proliferative Signalwege, stimuliert das Wachstum, die Migration, aber auch die Apoptose (Igoucheva and Alexeev, 2009). Mutationen und erhöhte Kopienzahlen sind vor allem in mukosalen Melanomen detektierbar (Curtin et al., 2006), weshalb die Untersuchung des Einflusses der miRNA in Schleimhautmelanomen besonders interessant ist.

Um eine Beteiligung der miRNAs miR-221 und miR-222 zu untersuchen, wurde dessen Expression mittels qRT-PCR untersucht. Interessanterweise wiesen die Schleimhautmelanome eine deutlich höhere Expression der miR-221 und miR-222 auf als die Kontrollzelllinie LN229, aber auch als die kutanen Melanome. Unter den kutanen Melanomen war für MEL-JUSO eine vergleichsweise hohe Expression detektierbar. Die deutlich erhöhte Expression der miR-221 und miR-222 in den Schleimhautmelanomen könnte daher die fehlende Induzierbarkeit von PUMA auf Proteinebene bei Induktion der mRNA Expression erklären. Um die funktionelle Bedeutung der miRNAs zu untersuchen, wurde eine Auswahl an Zellen mit miRNA Inhibitoren behandelt. Interessanterweise kann nach Inhibition der miRNA miR-221 und miR-222 eine leichte Induktion der PUMA Expression nachgewiesen werden. Auf Grund der Sequenzspezifität beider miRNAs für *BBC3* ist für die folgenden Versuche eine Co-Inhibition notwendig, um letztendlich die Beteiligung der miRNAs an der PUMA Regulation zu bestätigen.

Dennoch ist die in den Schleimhautmelanomen erhöhte Expression dieser miRNAs ein Hinweis auf die Inhibition der Apoptose und die Erhöhung der Proliferation durch Regulation von p27 und PTEN. Eine Beteiligung an weiteren Signalwegen auf Grund der hohen Anzahl an Zielgenen ist darüber hinaus zu erwarten (Lupini et al., 2013). Hinsichtlich der Ergebnisse der Untersuchungen zur Apoptose, Zellzyklus und DNA-Reparatur, könnte die erhöhte Expression der miR-221 und miR-222 die geringe Ansprechrate auf klassische Chemotherapeutika erklären. Ob dadurch die molekularbiologische Begründung für die im Vergleich zum kutanen Melanom aggressiveren Verhaltens ist, bleibt fraglich. Zudem wurden bisher keine Marker gefunden, die die hohe Lokalrezidivrate des Schleimhautmelanoms erklären kann, welche Ursache für das schlechte Überleben ist.

Die durch die in dieser Arbeit aufgezeigte unterschiedlichen Expression der miRNA miR-221 und miR-222 macht die Notwendigkeit einer Differenzierung für diese Tumorentitäten hinsichtlich der Therapieoptionen deutlich. Auf Grund der geringen Mutationslast in Schleimhautmelanomen und der klinischen Begründbarkeit der Aggressivität stellen sich diese als physiologischere, den Melanozyten ähnlichere Tumorentität dar. Eine Kombination klassischer Chemotherapeutika und miRNA Inhibitoren stellt sich daher als vielversprechender Therapieansatz dar.

6.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine Beteiligung der miRNAs miR-221 und miR-222 an der PUMAregulation in Schleimhautmelanomen vermuten. Da die funktionelle Bedeutung der miRNAs bisher nur durch einzelne Transfektion der miRNA Inhibitoren in einer Auswahl an Zellen untersucht worden ist, soll eine Co-Transfektion der miRNA Inhibitoren für beide miRNAs und in allen vorliegenden Zelllinien deutlichere Ergebnisse liefern. Dabei ist jedoch fraglich, ob die dadurch induzierte PUMA Expression ohne weitere Induktion des Signalweges zur Apoptose führt. Die Wirkung der Stabilisierung der PUMA Expression durch miRNA Inhibition auf die Tumorigenität und damit das Wachstum soll mittels Proliferationskurven untersucht werden. Die Bedeutung von PUMA für die p53-vermittelte Apoptose, wie sie z. B. durch Cisplatin induziert wird, ist essentiell. Daher sollte bestätigt werden, dass die Wiederherstellung der PUMA Expression alleinig nicht ausreicht, um Apoptose zu induzieren, sondern es noch eine Induktion durch z.B. Cisplatin oder einem anderen DNA-schädigender Substanz benötigt. Dies soll in Proliferationskurven, als auch durch Nachweise der Apoptose im Durchflusszytometer und der Spaltprodukte der Caspasen im Western Blot nachgewiesen werden. Die Bedeutung von PUMA in Schleimhautmelanomen kann darüber hinaus durch Nachweis der Proteinexpression mittels Immunhistochemie in einer größeren Kohorte im Vergleich zum kutanen Melanom untersucht werden. Eine Korrelation der PUMA-Expression mit dem Überleben würde die klinische Signifikanz von PUMA erläutern.

In der Literatur wurde die Rolle des Anti-Malaria Mittels Chloroquin als Therapie für Melanome diskutiert. Dieses günstige und nebenwirkungsarme Medikament induziert über einen bislang unbekanntem Mechanismus die PUMA-Expression und führt somit zur Apoptose. Die Wirkung von Chloroquin in Schleimhautmelanomen wurde bislang nicht untersucht. Daher soll die Wirkung von Chloroquin auf die Schleimhautmelanome und vergleichend auf die kutanen Melanome mittels Proliferationskurven überprüft werden. Es soll untersucht werden, ob die Behandlung mit Chloroquin auch in den Schleimhautmelanomen zur Inhibition der Autophagie und der dadurch induzierten PUMA-Expression kommt. Des Weiteren soll geprüft werden, ob die Behandlung von Chloroquin und die mögliche dadurch induzierte PUMA Expression alleinig für die Induktion der Apoptose ausreichend ist, oder es einen zusätzlichen Stimulus, z.B. Cisplatin, bedarf. Da auf Grund der Ergebnisse davon auszugehen ist, dass primär eine Regulation von PUMA auf Translationsebene vorliegt, muss überprüft werden, inwiefern die miRNA- und der

Autophagie vermittelte PUMA Abbau zusammenspielen. Dafür soll die Induktion der Apoptose bei gleichzeitiger Behandlung von miRNA Inhibitoren und Chloroquin mittels Durchflusszytometer und Western Blot untersucht werden.

7. Zusammenfassung

Jährlich erkranken in Europa pro 100.000 Menschen ca. 11 am kutanem Melanom. Das kutane Melanom ist die häufigste Aberration der Melanozyten, den pigment-bildenden Zellen. Es existieren jedoch histologische und klinische Sonderformen, zu denen auch das Schleimhautmelanom zählt. Dieses macht nur ungefähr 1% aller Melanome aus. Die Hälfte der Fälle dieser Sonderform sind im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert. Im Vergleich zu dem kutanen Melanom ist die Prognose für das Schleimhautmelanom schlecht. Während die 5-Jahres Überlebensrate bei Patienten mit kutanem Melanom bei 80% liegt, ist diese für Patienten mit Schleimhautmelanom mit 17% deutlich niedriger. Im Hinblick auf die Schleimhautmelanome zeigt sich ein nur unzureichendes Ansprechen auf klassische Chemotherapeutika, wie Interferone und Dacarbazin. Insbesondere den Tumorsuppressor p53 ansprechende Therapeutika erzielen kaum Erfolge. Interessant dabei ist, dass die Mehrzahl der Melanome eine Akkumulation von p53 aufweist, welche jedoch nicht durch eine proteinstabilisierende Mutation erklärt werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten keine Defekte in der direkten p53 Regulation und Funktion nach Behandlung mit physiologischen Konzentrationen Cisplatin detektieren. Eine Regulation der DNA-Reparaturproteine auf Transkriptions- oder Translationsebene war hingegen nur für direkte p53-Zielgene zu verzeichnen. Die Behandlung mit Cisplatin führte in den Zellen nicht zum Zelltod. Jedoch konnte eine Wachstumsverlangsamung verzeichnet werden, welche durch die p53-abhängige Regulation Zellzyklus-relevanter Proteine erklärt werden konnte. Interessanterweise konnte jedoch PUMA als direktes p53-Zielgen und Schlüsselprotein in der defekten Apoptose identifiziert werden. In der Literatur wird beschrieben, dass Melanome eine reduzierte PUMA Expression besitzen, wodurch die fehlende Induzierbarkeit der Apoptose erklärt werden könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den kutanen Melanomen, die Schleimhautmelanome eine signifikant geringere Expression zeigten und diese mit einer schlechten Prognose assoziiert war. Eine Mutation, welche die reduzierte PUMA Expression in den untersuchten mukosalen oder kutanen Melanomzellen erklären könnte, wurde bei Sequenzierungen nicht gefunden. Die Analyse der mRNA Stabilität zeigte, im Vergleich zu anderen p53 Zielgenen und einer Kontrollzelllinie, eine rapide Abnahme der BBC3 mRNA Konzentration. Gleichzeitig konnte in diesen Zellen eine erhöhte Expression der miRNA-221 und miRNA-222 detektiert werden. Durch Erhöhung der PUMA-Proteinkonzentration nach Inhibition der miRNAs konnte dies auch erstmals für die Schleimhautmelanome gezeigt werden. Damit bestätigt sich die Bedeutung

von PUMA und der miRNAs in der schlechten Ansprechrate der Schleimhautmelanome auf Chemotherapeutika.

8. Abstract

Among 100,000 inhabitants 11 people are diagnosed with cutaneous melanoma every year. It is the most common aberration of melanocytes, the pigment-building cells of the skin. There are histological and clinical subtypes including mucosal melanoma. This tumor entity accounts for only 1% of all melanoma. More than half of them are located in the head and neck area. Compared to cutaneous melanoma, the prognosis of mucosal melanoma is poor. While the five-year survival rate of cutaneous melanoma is about 80%, it is significantly lower for patients with mucosal melanoma (17%). With regard to the mucosal melanomas, there is an inadequate response to classical chemotherapeutic agents, such as interferons and dacarbazine. In particular, the tumor suppressor p53 activating chemotherapeutics achieve little success. Interestingly, the majority of melanomas show an accumulation of p53 that cannot be explained by protein stabilizing mutations. In this study, no direct defects in direct p53 regulation and function, after treatment with physiological cisplatin concentrations, could be detected. A regulation of DNA repair proteins on transcriptional or translational level was only observed for direct p53 target genes. Treatment with cisplatin did not induce cell death in those cells. Nonetheless, a deceleration on proliferation could be observed, which can be explained by the p53-dependent regulation of cell cycle relevant proteins. Moreover, the direct p53 target PUMA could be identified as key protein in dysfunctional apoptosis. In the literature it is demonstrated that melanomas showed a reduced expression of PUMA, which may explain the lack of inducing apoptosis. This study could prove that even mucosal melanomas showed a reduced expression of PUMA in comparison to cutaneous melanoma, which is also associated to a poor prognosis. Mutations, which might explain the reduced expression, could not be detected in the investigated mucosal or cutaneous melanoma cells. The examination of mRNA stability showed a rapid degradation of *BBC3* mRNA in comparison to another p53 target gene *CDKN1A*. Moreover, an enhanced expression of miRNA-221 and miRNA-222 could be detected for mucosal melanomas. Interestingly, after inhibition of these miRNAs, the PUMA expression could be restored in mucosal melanoma. This confirms the significance of PUMA and the miRNAs in the poor response to chemotherapeutics in patients with mucosal melanoma.

9. Referenzen

- ABBAS, T. & DUTTA, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9, 400-14.
- ADAM-ZAHIR, S., PLOWMAN, P. N., BOURTON, E. C., SHARIF, F. & PARRIS, C. N. 2014. Increased gamma-H2AX and Rad51 DNA Repair Biomarker Expression in Human Cell Lines Resistant to the Chemotherapeutic Agents Nitrogen Mustard and Cisplatin. *Chemotherapy*, 60, 310-20.
- ADIMOOLAM, S. & FORD, J. M. 2003. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*, 2, 947-54.
- AMARAVADI, R. K. 2013. PUMA: a puzzle piece in chloroquine's antimelanoma activity. *J Invest Dermatol*, 133, 2133-5.
- AMBROS, V. 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107, 823-6.
- AMIT, M., TAM, S., ABDELMEGUID, A. S., ROBERTS, D. B., TAKAHASHI, Y., RAZA, S. M., SU, S. Y., KUPFERMAN, M. E., DEMONTE, F. & HANNA, E. Y. 2017. Mutation status among patients with sinonasal mucosal melanoma and its impact on survival. *Br J Cancer*, 116, 1564-1571.
- ANDREU-FERNANDEZ, V., SANCHO, M., GENOVES, A., LUCENDO, E., TODT, F., LAUTERWASSER, J., FUNK, K., JAHREIS, G., PEREZ-PAYA, E., MINGARRO, I., EDLICH, F. & ORZAEZ, M. 2017. Bax transmembrane domain interacts with prosurvival Bcl-2 proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 310-315.
- 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. *Front Oncol*, 1.
- ARIAS-LOPEZ, C., LAZARO-TRUEBA, I., KERR, P., LORD, C. J., DEXTER, T., IRAVANI, M., ASHWORTH, A. & SILVA, A. 2006. p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep*, 7, 219-24.
- ASCIERTO, P. A., ACCORONA, R., BOTTI, G., FARINA, D., FOSSATI, P., GATTA, G., GOGAS, H., LOMBARDI, D., MAROLDI, R., NICOLAI, P., RAVANELLI, M. & VANELLA, V. 2017. Mucosal melanoma of the head and neck. *Crit Rev Oncol Hematol*, 112, 136-152.

- ASCIERTO, P. A., KIRKWOOD, J. M., GROB, J. J., SIMEONE, E., GRIMALDI, A. M., MAIO, M., PALMIERI, G., TESTORI, A., MARINCOLA, F. M. & MOZZILLO, N. 2012. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*, 10, 85.
- AUGUSTO NOGUEIRA, R. C., RUI MEDEIROS 2011. *DNA Repair and Human Health*, <https://www.intechopen.com/books/dna-repair-and-human-health/dna-damage-repair-and-cancer-the-role-of-rad51-protein-and-its-genetic-variants>, InTech.
- BALLO, H., KOLDOVSKY, P., HOFFMANN, T., BALZ, V., HILDEBRANDT, B., GERHARZ, C. D. & BIER, H. 1999. Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model. *Anticancer Res*, 19, 3827-36.
- BARCKHAUSEN, C., ROOS, W. P., NAUMANN, S. C. & KAINA, B. 2014. Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair. *Oncogene*, 33, 1964-74.
- BASU, A. & KRISHNAMURTHY, S. 2010. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids*, 2010.
- BERTOLI, C., SKOTHEIM, J. M. & DE BRUIN, R. A. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 518-28.
- BERWICK, M., BULLER, D. B., CUST, A., GALLAGHER, R., LEE, T. K., MEYSKENS, F., PANDEY, S., THOMAS, N. E., VEIEROD, M. B. & WARD, S. 2016. Melanoma Epidemiology and Prevention. *Cancer Treat Res*, 167, 17-49.
- BHANDARU, M., MARTINKA, M., LI, G. & ROTTE, A. 2014. Loss of XRCC1 confers a metastatic phenotype to melanoma cells and is associated with poor survival in patients with melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27, 366-75.
- BHATIA, S., TYKODI, S. S. & THOMPSON, J. A. 2009. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)*, 23, 488-96.
- BLAGOSKLONNY, M. V. 1997. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene*, 15, 1889-93.
- BLAJESKI, A. L., PHAN, V. A., KOTTKE, T. J. & KAUFMANN, S. H. 2002. G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *J Clin Invest*, 110, 91-9.

- BOURDON, J. C., FERNANDES, K., MURRAY-ZMIJEWSKI, F., LIU, G., DIOT, A., XIRODIMAS, D. P., SAVILLE, M. K. & LANE, D. P. 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*, 19, 2122-37.
- BRACKEN, A. P., CIRO, M., COCITO, A. & HELIN, K. 2004. E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci*, 29, 409-17.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRADLEY, P. J. 2006. Primary malignant mucosal melanoma of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 14, 100-4.
- BRASH, D. E., RUDOLPH, J. A., SIMON, J. A., LIN, A., MCKENNA, G. J., BADEN, H. P., HALPERIN, A. J. & PONTEN, J. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 10124-8.
- BROOKS, C. L. & GU, W. 2010. New insights into p53 activation. *Cell Res*, 20, 614-21.
- CAI, X., HAGEDORN, C. H. & CULLEN, B. R. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10, 1957-66.
- CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.
- CAZZALINI, O., SCOVASSI, A. I., SAVIO, M., STIVALA, L. A. & PROSPERI, E. 2010. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res*, 704, 12-20.
- CHAITANYA, G. V., STEVEN, A. J. & BABU, P. P. 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal*, 8, 31.
- CHEN, J., YUE, H. & OUYANG, Q. 2014. Correlation between oncogenic mutations and parameter sensitivity of the apoptosis pathway model. *PLoS Comput Biol*, 10, e1003451.
- CHO, H. J., KIM, J. K., KIM, K. D., YOON, H. K., CHO, M. Y., PARK, Y. P., JEON, J. H., LEE, E. S., BYUN, S. S., LIM, H. M., SONG, E. Y., LIM, J. S., YOON, D. Y., LEE, H. G. & CHOE, Y. K. 2006. Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Lett*, 237, 56-66.

- CHRISTOPHER, A. F., KAUR, R. P., KAUR, G., KAUR, A., GUPTA, V. & BANSAL, P. 2016. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res*, 7, 68-74.
- CHUDNOVSKY, Y., KHAVARI, P. A. & ADAMS, A. E. 2005. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest*, 115, 813-24.
- COOPER, S., IYER, G., TARQUINI, M. & BISSETT, P. 2006. Nocodazole does not synchronize cells: implications for cell-cycle control and whole-culture synchronization. *Cell Tissue Res*, 324, 237-42.
- CURTIN, J. A., BUSAM, K., PINKEL, D. & BASTIAN, B. C. 2006. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*, 24, 4340-6.
- D'MELLO, S. A., FINLAY, G. J., BAGULEY, B. C. & ASKARIAN-AMIRI, M. E. 2016. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci*, 17.
- DAMIA, G., FILIBERTI, L., VIKHANSKAYA, F., CARRASSA, L., TAYA, Y., D'INCALCI, M. & BROGGINI, M. 2001. Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia*, 3, 10-6.
- DASARI, S. & TCHOUNWOU, P. B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 740, 364-78.
- DAY, D. A. & TUIITE, M. F. 1998. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol*, 157, 361-71.
- DONZELLI, M. & DRAETTA, G. F. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep*, 4, 671-7.
- EL-MAHDY, M. A., ZHU, Q., WANG, Q. E., WANI, G., PRAETORIUS-IBBA, M. & WANI, A. A. 2006. Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. *J Biol Chem*, 281, 13404-11.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ERDEI, E. & TORRES, S. M. 2010. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 10, 1811-23.
- FAYOLLE, C., POURCHET, J., CARON DE FROMENTEL, C., PUISIEUX, A., DORÉ, J. F. & VOELTZEL, T. 2008. Gadd45a activation protects melanoma cells from ultraviolet B-induced apoptosis. *J Invest Dermatol*, 128, 196-202.

- FELICETTI, F., ERRICO, M. C., SEGNALINI, P., MATTIA, G. & CARE, A. 2008. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8, 1759-65.
- FISCHER, M. 2017. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, 36, 3943-3956.
- FRANKS, A., AIROLDI, E. & SLAVOV, N. 2017. Post-transcriptional regulation across human tissues. *PLoS Comput Biol*, 13, e1005535.
- FRICKER, M., O'PREY, J., TOLKOVSKY, A. M. & RYAN, K. M. 2010. Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability. *Cell Death Dis*, 1, e59.
- FRIDMAN, J. S. & LOWE, S. W. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22, 9030-40.
- FRITSCHKE, M. K. & KNOPF, A. 2017. The Tumor Suppressor p53 in Mucosal Melanoma of the Head and Neck. *Genes (Basel)*, 8.
- FRITSCHKE, M. K., METZLER, V., BECKER, K., PLETTENBERG, C., HEISER, C., HOF AUER, B. & KNOPF, A. 2015. Cisplatin fails to induce puma mediated apoptosis in mucosal melanomas. *Oncotarget*, 6, 9887-96.
- FU, B., WANG, Y., ZHANG, X., LANG, B., ZHOU, X., XU, X., ZENG, T., LIU, W., ZHANG, X., GUO, J. & WANG, G. 2015. MiR-221-induced PUMA silencing mediates immune evasion of bladder cancer cells. *Int J Oncol*, 46, 1169-80.
- FURNEY, S. J., TURAJLIC, S., STAMP, G., NOHADANI, M., CARLISLE, A., THOMAS, J. M., HAYES, A., STRAUSS, D., GORE, M., VAN DEN OORD, J., LARKIN, J. & MARAIS, R. 2013. Genome sequencing of mucosal melanomas reveals that they are driven by distinct mechanisms from cutaneous melanoma. *J Pathol*, 230, 261-9.
- GAGGIOLI, C. & SAHAI, E. 2007. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res*, 20, 161-72.
- GAROFALO, M., DI LEVA, G., ROMANO, G., NUOVO, G., SUH, S. S., NGANKEU, A., TACCIOLI, C., PICHIORRI, F., ALDER, H., SECCHIERO, P., GASPARINI, P., GONELLI, A., COSTINEAN, S., ACUNZO, M., CONDORELLI, G. & CROCE, C. M. 2009. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell*, 16, 498-509.
- GLICK, D., BARTH, S. & MACLEOD, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221, 3-12.

- GROVER, R. & WILSON, G. D. 1996. Bcl-2 expression in malignant melanoma and its prognostic significance. *Eur J Surg Oncol*, 22, 347-9.
- GU, B. & ZHU, W. G. 2012. Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int J Biol Sci*, 8, 672-84.
- GWOSDZ, C., SCHECKENBACH, K., LIEVEN, O., REIFENBERGER, J., KNOPF, A., BIER, H. & BALZ, V. 2006. Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer*, 118, 577-82.
- HAN, Y. H., MOON, H. J., YOU, B. R. & PARK, W. H. 2009. The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep*, 22, 215-21.
- HAQ, R., YOKOYAMA, S., HAWRYLUK, E. B., JONSSON, G. B., FREDERICK, D. T., MCHENRY, K., PORTER, D., TRAN, T. N., LOVE, K. T., LANGER, R., ANDERSON, D. G., GARRAWAY, L. A., DUNCAN, L. M., MORTON, D. L., HOON, D. S., WARGO, J. A., SONG, J. S. & FISHER, D. E. 2013. BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 4321-6.
- HARRIS, S. L. & LEVINE, A. J. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24, 2899-908.
- HASNEY, C., BUTCHER, R. B., 2ND & AMEDEE, R. G. 2008. Malignant melanoma of the head and neck: a brief review of pathophysiology, current staging, and management. *Ochsner J*, 8, 181-5.
- HAUPT, S., BERGER, M., GOLDBERG, Z. & HAUPT, Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, 116, 4077-85.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. & WATSON, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11, 1026-30.
- HUANG, F. & MAZIN, A. V. 2014. A small molecule inhibitor of human RAD51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts. *PLoS One*, 9, e100993.
- HUSSEIN, M. R., HAEMEL, A. K. & WOOD, G. S. 2003. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol*, 199, 275-88.
- HUSTEDT, N. & DUROCHER, D. 2016. The control of DNA repair by the cell cycle. *Nat Cell Biol*, 19, 1-9.
- HUTCHINSON, F. 1994. Induction of tandem-base change mutations. *Mutat Res*, 309, 11-5.

- IGOUCHEVA, O. & ALEXEEV, V. 2009. MicroRNA-dependent regulation of cKit in cutaneous melanoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 379, 790-4.
- ISHIGURO, H., KIMURA, M., TAKAHASHI, H., TANAKA, T., MIZOGUCHI, K. & TAKEYAMA, H. 2016. GADD45A expression is correlated with patient prognosis in esophageal cancer. *Oncol Lett*, 11, 277-282.
- JIANG, C. C., LUCAS, K., AVERY-KIEJDA, K. A., WADE, M., DEBOCK, C. E., THORNE, R. F., ALLEN, J., HERSEY, P. & ZHANG, X. D. 2008. Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res*, 68, 6708-17.
- JOERGER, A. C. & FERSHT, A. R. 2010. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a000919.
- KANDOTH, C., MCLELLAN, M. D., VANDIN, F., YE, K., NIU, B., LU, C., XIE, M., ZHANG, Q., MCMICHAEL, J. F., WYCZALKOWSKI, M. A., LEISERSON, M. D., MILLER, C. A., WELCH, J. S., WALTER, M. J., WENDL, M. C., LEY, T. J., WILSON, R. K., RAPHAEL, B. J. & DING, L. 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502, 333-9.
- KARST, A. M., DAI, D. L., MARTINKA, M. & LI, G. 2005. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene*, 24, 1111-6.
- KHAN, M. K., KHAN, N., ALMASAN, A. & MACKLIS, R. 2011. Future of radiation therapy for malignant melanoma in an era of newer, more effective biological agents. *Onco Targets Ther*, 4, 137-48.
- KIM, Y. J. & WILSON, D. M., 3RD 2012. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol*, 5, 3-13.
- KITAZUMI, I. & TSUKAHARA, M. 2011. Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J*, 278, 427-41.
- KNOPF, A., PLETTENBERG, C., PICKHARD, A., BAS, M., REIFENBERGER, J., BIER, H. & BALZ, V. 2011. Analysis of the functional integrity of the p53 tumor-suppressor gene in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 21, 380-8.
- KRUSE, A. L., RIENER, M. O., GRAETZ, K. W. & LUEBBERS, H. T. 2010. Mucosal malignant melanomas in head and neck surgery: a retrospective study of six patients and review of the literature. *Oral Maxillofac Surg*, 14, 143-7.
- KRUSE, J. P. & GU, W. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell*, 137, 609-22.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

- LAKHTER, A. J., SAHU, R. P., SUN, Y., KAUFMANN, W. K., ANDROPHY, E. J., TRAVERS, J. B. & NAIDU, S. R. 2013. Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation. *J Invest Dermatol*, 133, 2247-54.
- LANE, D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-6.
- LAZAREV, S., GUPTA, V., HU, K., HARRISON, L. B. & BAKST, R. 2014. Mucosal melanoma of the head and neck: a systematic review of the literature. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 90, 1108-18.
- LENGYEL, E., GILDE, K., REMENÁR, E. & ESIK, O. 2003. Malignant mucosal melanoma of the head and neck. *Pathol Oncol Res*, 9, 7-12.
- LI, J., DONG, J., LI, S., XIA, W., SU, X., QIN, X., CHEN, Y., DING, H., LI, H., HUANG, A., BAI, C., HU, T., WANG, C., CHU, B. & SHAO, N. 2017. An alternative microRNA-mediated post-transcriptional regulation of GADD45A by p53 in human non-small-cell lung cancer cells. *Sci Rep*, 7, 7153.
- LIN, C. J., GRANDIS, J. R., CAREY, T. E., GOLLIN, S. M., WHITESIDE, T. L., KOCH, W. M., FERRIS, R. L. & LAI, S. Y. 2007. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck*, 29, 163-88.
- LIU, Y. & SHEIKH, M. S. 2014. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Mol Cell Pharmacol*, 6, 228.
- LOEWER, A., BATCHELOR, E., GAGLIA, G. & LAHAV, G. 2010. Basal dynamics of p53 reveal transcriptionally attenuated pulses in cycling cells. *Cell*, 142, 89-100.
- LOGUE, S. E. & MARTIN, S. J. 2008. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 36, 1-9.
- LOPEZ, F., RODRIGO, J. P., CARDESA, A., TRIANTAFYLLOU, A., DEVANEY, K. O., MENDENHALL, W. M., HAIGENTZ, M., JR., STROJAN, P., PELLITTERI, P. K., BRADFORD, C. R., SHAHA, A. R., HUNT, J. L., DE BREE, R., TAKES, R. P., RINALDO, A. & FERLITO, A. 2016. Update on primary head and neck mucosal melanoma. *Head Neck*, 38, 147-55.
- LOUGHERY, J., COX, M., SMITH, L. M. & MEEK, D. W. 2014. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Res*, 42, 7666-80.

- LOURENCO, S. V., FERNANDES, J. D., HSIEH, R., COUTINHO-CAMILLO, C. M., BOLOGNA, S., SANGUEZA, M. & NICO, M. M. 2014. Head and neck mucosal melanoma: a review. *Am J Dermatopathol*, 36, 578-87.
- LUGOWSKA, I., TETERYCZ, P. & RUTKOWSKI, P. 2018. Immunotherapy of melanoma. *Contemp Oncol (Pozn)*, 22, 61-67.
- LUPINI, L., BASSI, C., FERRACIN, M., BARTONICEK, N., D'ABUNDO, L., ZAGATTI, B., CALLEGARI, E., MUSA, G., MOSHIRI, F., GRAMANTIERI, L., CORRALES, F. J., ENRIGHT, A. J., SABBIONI, S. & NEGRINI, M. 2013. miR-221 affects multiple cancer pathways by modulating the level of hundreds messenger RNAs. *Front Genet*, 4, 64.
- MACFARLANE, L. A. & MURPHY, P. R. 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, 11, 537-61.
- MACKINTOSH, J. A. 2001. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *J Theor Biol*, 211, 101-13.
- MALUMBRES, M. & BARBACID, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*, 9, 153-66.
- MARIO SANTINAMI, R. P., ROBERTA RUGGERI, GIANPIERO CASTELLI, ANDREA MAURICHI, GIULIA BAFFA AND CARLOTTA TINTI 2013. Cutaneous Melanoma – Surgical Treatment. In: THIEN, G. H. (ed.) *Melanoma - From Early Detection to Treatment*. Dr. Ht Duc (Ed.), InTech.
- MARTEIJN, J. A., LANS, H., VERMEULEN, W. & HOEIJMAKERS, J. H. 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 465-81.
- MARTIN, S. A., LORD, C. J. & ASHWORTH, A. 2010. Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. *Clin Cancer Res*, 16, 5107-13.
- MATTIA, G., PUGLISI, R., ASCIONE, B., MALORNI, W., CARE, A. & MATARRESE, P. 2018. Cell death-based treatments of melanoma:conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis*, 9, 112.
- MAUVEZIN, C. & NEUFELD, T. P. 2015. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11, 1437-8.
- MAVERAKIS, E., CORNELIUS, L. A., BOWEN, G. M., PHAN, T., PATEL, F. B., FITZMAURICE, S., HE, Y., BURRALL, B., DUONG, C., KLOXIN, A. M., SULTANI, H., WILKEN, R., MARTINEZ, S. R. & PATEL, F. 2015.

- Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol*, 95, 516-24.
- MEGAHED, A. I. & KOON, H. B. 2014. What is the role of chemotherapy in the treatment of melanoma? *Curr Treat Options Oncol*, 15, 321-35.
- MENDENHALL, W. M., AMDUR, R. J., HINERMAN, R. W., WERNING, J. W., VILLARET, D. B. & MENDENHALL, N. P. 2005. Head and neck mucosal melanoma. *Am J Clin Oncol*, 28, 626-30.
- MENENDEZ, D., INGA, A. & RESNICK, M. A. 2009. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer*, 9, 724-37.
- MERVIC, L. 2012. Time course and pattern of metastasis of cutaneous melanoma differ between men and women. *PLoS One*, 7, e32955.
- METZLER, V. 2017. *Der p53-Signalweg im Schleimhautmelanom*. Dissertaion, Technische Universität München.
- MIHAJLOVIC, M., VLAJKOVIC, S., JOVANOVIC, P. & STEFANOVIC, V. 2012. Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. *Int J Clin Exp Pathol*, 5, 739-53.
- MIZUSHIMA, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21, 2861-73.
- MORENO, M. A. & HANNA, E. Y. 2010. Management of mucosal melanomas of the head and neck: did we make any progress? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 18, 101-6.
- NAG, S., QIN, J., SRIVENUGOPAL, K. S., WANG, M. & ZHANG, R. 2013. The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res*, 27, 254-71.
- NAKANO, K. & VOUSDEN, K. H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7, 683-94.
- OREN, M. 1999. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, 274, 36031-4.
- ORMEROD, M. G., PAYNE, A. W. & WATSON, J. V. 1987. Improved program for the analysis of DNA histograms. *Cytometry*, 8, 637-41.
- PABLA, N., HUANG, S., MI, Q. S., DANIEL, R. & DONG, Z. 2008. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 283, 6572-83.
- PENG, Y. & CROCE, C. M. 2016. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 1, 15004.

- PEREZ-HERRERO, E. & FERNANDEZ-MEDARDE, A. 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*, 93, 52-79.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- RAGER, E. L., BRIDGEFORD, E. P. & OLLILA, D. W. 2005. Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. *Am Fam Physician*, 72, 269-76.
- RAY, A., MILUM, K., BATTU, A., WANI, G. & WANI, A. A. 2013. NER initiation factors, DDB2 and XPC, regulate UV radiation response by recruiting ATR and ATM kinases to DNA damage sites. *DNA Repair (Amst)*, 12, 273-83.
- REDDY, K. B. 2015. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int*, 15, 38.
- REISMAN, D., TAKAHASHI, P., POLSON, A. & BOGGS, K. 2012. Transcriptional Regulation of the p53 Tumor Suppressor Gene in S-Phase of the Cell-Cycle and the Cellular Response to DNA Damage. *Biochem Res Int*, 2012, 808934.
- RIKER, A. I., ENKEMANN, S. A., FODSTAD, O., LIU, S. H., REN, S. P., MORRIS, C., XI, Y. G., HOWELL, P., METGE, B., SAMANT, R. S., SHEVDE, L. A., LI, W. B., ESCHRICH, S., DAUD, A., JU, J. F. & MATTA, J. 2008. The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. *Bmc Medical Genomics*, 1.
- ROCKBERG, J., AMELIO, J. M., TAYLOR, A., JORGENSEN, L., RAGNHAMMAR, P. & HANSSON, J. 2016. Epidemiology of cutaneous melanoma in Sweden-Stage-specific survival and rate of recurrence. *Int J Cancer*, 139, 2722-2729.
- RYAN, K. M., PHILLIPS, A. C. & VOUSDEN, K. H. 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 332-7.
- SALDANA-MEYER, R. & RECILLAS-TARGA, F. 2011. Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics*, 6, 1068-77.
- SAOTOME, K., MORITA, H. & UMEDA, M. 1989. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicol In Vitro*, 3, 317-21.
- SARASIN, A. & DESSEN, P. 2010. DNA repair pathways and human metastatic malignant melanoma. *Curr Mol Med*, 10, 413-8.
- SARASTE, A. & PULKKI, K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, 45, 528-37.

- SARTORIUS, U. A. & KRAMMER, P. H. 2002. Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer*, 97, 584-92.
- SATZGER, I., SCHAEFER, T., KUETTLER, U., BROECKER, V., VOELKER, B., OSTERTAG, H., KAPP, A. & GUTZMER, R. 2008. Analysis of c-KIT expression and KIT gene mutation in human mucosal melanomas. *Br J Cancer*, 99, 2065-9.
- SCHARER, O. D. 2013. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a012609.
- SCOLYER, R. A., LONG, G. V. & THOMPSON, J. F. 2011. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol*, 5, 124-36.
- SEGURA, M. F., GREENWALD, H. S., HANNIFORD, D., OSMAN, I. & HERNANDO, E. 2012. MicroRNA and cutaneous melanoma: from discovery to prognosis and therapy. *Carcinogenesis*, 33, 1823-32.
- SENTURK, E. & MANFREDI, J. J. 2013. p53 and cell cycle effects after DNA damage. *Methods Mol Biol*, 962, 49-61.
- SHAMAS-DIN, A., KALE, J., LEBER, B. & ANDREWS, D. W. 2013. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a008714.
- SHASHANKA, R. & SMITHA, B. R. 2012. Head and neck melanoma. *ISRN Surg*, 2012, 948302.
- SHI, Y., FELLE-Y-BOSCO, E., MARTI, T. M. & STAHEL, R. A. 2012. Differential effects of lovastatin on cisplatin responses in normal human mesothelial cells versus cancer cells: implication for therapy. *PLoS One*, 7, e45354.
- SIDDIK, Z. H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22, 7265-79.
- SMOLLER, B. R. 2006. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol*, 19 Suppl 2, S34-40.
- SOBELL, H. M. 1985. Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 5328-31.
- SONG, L., MCNEIL, E. M., RITCHIE, A. M., ASTELL, K. R., GOURLEY, C. & MELTON, D. W. 2017. Melanoma cells replicate through chemotherapy by reducing levels of key homologous recombination protein RAD51 and increasing

- expression of translesion synthesis DNA polymerase zeta. *BMC Cancer*, 17, 864.
- SOUTHERN, E. M. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 100, 319-23.
- SPENCER, K. R. & MEHNERT, J. M. 2016. Mucosal Melanoma: Epidemiology, Biology and Treatment. *Cancer Treat Res*, 167, 295-320.
- TAMURA, R. E., DE VASCONCELLOS, J. F., SARKAR, D., LIBERMANN, T. A., FISHER, P. B. & ZERBINI, L. F. 2012. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med*, 12, 634-51.
- TANAKA, N., ODAJIMA, T., MIMURA, M., OGI, K., DEHARI, H., KIMIJIMA, Y. & KOHAMA, G. 2001. Expression of Rb, pRb2/p130, p53, and p16 proteins in malignant melanoma of oral mucosa. *Oral Oncol*, 37, 308-14.
- TARHINI, A. A. & AGARWALA, S. S. 2006. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. *Dermatol Ther*, 19, 19-25.
- THIERAUF, J., VEIT, J., DOSCHER, J., THEODORAKI, M. N., GREVE, J. & HOFFMANN, T. K. 2015. [Mucosal Melanoma of the Head and Neck]. *Laryngorhinootologie*, 94, 812-8.
- THORBURN, J., ANDRYSIK, Z., STASKIEWICZ, L., GUMP, J., MAYCOTTE, P., OBERST, A., GREEN, D. R., ESPINOSA, J. M. & THORBURN, A. 2014. Autophagy controls the kinetics and extent of mitochondrial apoptosis by regulating PUMA levels. *Cell Rep*, 7, 45-52.
- TSUJIMOTO, K., ONO, T., SATO, M., NISHIDA, T., OGUMA, T. & TADAKUMA, T. 2005. Regulation of the expression of caspase-9 by the transcription factor activator protein-4 in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 280, 27638-44.
- URIEN, S. & LOKIEC, F. 2004. Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *Br J Clin Pharmacol*, 57, 756-63.
- VELA, L., GONZALO, O., NAVAL, J. & MARZO, I. 2013. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J Biol Chem*, 288, 4935-46.
- VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D. R. & BERNEMAN, Z. N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36, 131-49.

- VIDWANS, S. J., FLAHERTY, K. T., FISHER, D. E., TENENBAUM, J. M., TRAVERS, M. D. & SHRAGER, J. 2011. A melanoma molecular disease model. *PLoS One*, 6, e18257.
- WAHID, F., SHEHZAD, A., KHAN, T. & KIM, Y. Y. 2010. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 1231-43.
- WANG, Q. E., PRAETORIUS-IBBA, M., ZHU, Q., EL-MAHDY, M. A., WANI, G., ZHAO, Q., QIN, S., PATNAIK, S. & WANI, A. A. 2007a. Ubiquitylation-independent degradation of Xeroderma pigmentosum group C protein is required for efficient nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res*, 35, 5338-50.
- WANG, Y. F., JIANG, C. C., KIEJDA, K. A., GILLESPIE, S., ZHANG, X. D. & HERSEY, P. 2007b. Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. *Clin Cancer Res*, 13, 4934-42.
- WATSON, J. V. 1987. Time, a quality-control parameter in flow cytometry. *Cytometry*, 8, 646-9.
- WESTPHAL, D., DEWSON, G., CZABOTAR, P. E. & KLUCK, R. M. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 521-31.
- WILLIAMS, A. B. & SCHUMACHER, B. 2016. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6.
- WILLIAMS, C. J. & WHITEHOUSE, J. M. 1979. Cis-platinum: a new anticancer agent. *Br Med J*, 1, 1689-91.
- WITTEWER, C. T., HERRMANN, M. G., MOSS, A. A. & RASMUSSEN, R. P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22, 130-1, 134-8.
- WOLCHOK, J. D., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., RUTKOWSKI, P., GROB, J. J., COWEY, C. L., LAO, C. D., WAGSTAFF, J., SCHADENDORF, D., FERRUCCI, P. F., SMYLLIE, M., DUMMER, R., HILL, A., HOGG, D., HAANEN, J., CARLINO, M. S., BECHTER, O., MAIO, M., MARQUEZ-RODAS, I., GUIDOBONI, M., MCARTHUR, G., LEBBE, C., ASCIERTO, P. A., LONG, G. V., CEBON, J., SOSMAN, J., POSTOW, M. A., CALLAHAN, M. K., WALKER, D., ROLLIN, L., BHOORE, R., HODI, F. S. & LARKIN, J.

2017. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 377, 1345-1356.
- WRIGHTON, K. H., PRELE, C. M., SUNTERS, A. & YEUDALL, W. A. 2004. Aberrant p53 alters DNA damage checkpoints in response to cisplatin: downregulation of CDK expression and activity. *Int J Cancer*, 112, 760-70.
- WU, C. C., LEE, S., MALLADI, S., CHEN, M. D., MASTRANDREA, N. J., ZHANG, Z. & BRATTON, S. B. 2016. The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. *Nat Commun*, 7, 13565.
- WU, X. & BREWER, G. 2012. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene*, 500, 10-21.
- XU, W., WANG, S., CHEN, Q., ZHANG, Y., NI, P., WU, X., ZHANG, J., QIANG, F., LI, A., ROE, O. D., XU, S., WANG, M., ZHANG, R. & ZHOU, J. 2014. TXNL1-XRCC1 pathway regulates cisplatin-induced cell death and contributes to resistance in human gastric cancer. *Cell Death Dis*, 5, e1055.
- YANG, A. S. & CHAPMAN, P. B. 2009. The history and future of chemotherapy for melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 23, 583-97, x.
- YANG, R., MULLER, C., HUYNH, V., FUNG, Y. K., YEE, A. S. & KOEFFLER, H. P. 1999. Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. *Mol Cell Biol*, 19, 2400-7.
- YDE, S. S., SJOEGREN, P., HEJE, M. & STOLLE, L. B. 2018. Mucosal Melanoma: a Literature Review. *Curr Oncol Rep*, 20, 28.
- YIP, K. W. & REED, J. C. 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27, 6398-406.
- YU, H. & LIU, G. 2015. Clinical analysis of 29 cases of nasal mucosal malignant melanoma. *Oncol Lett*, 10, 1166-1170.
- YU, J. & ZHANG, L. 2008. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S71-83.
- ZHANG, C., ZHANG, J., ZHANG, A., WANG, Y., HAN, L., YOU, Y., PU, P. & KANG, C. 2010a. PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers. *Int J Oncol*, 37, 1621-6.
- ZHANG, C. Z., ZHANG, J. X., ZHANG, A. L., SHI, Z. D., HAN, L., JIA, Z. F., YANG, W. D., WANG, G. X., JIANG, T., YOU, Y. P., PU, P. Y., CHENG, J. Q. &

- KANG, C. S. 2010b. MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol Cancer*, 9, 229.
- ZHANG, J., SHA, J., ZHOU, Y., HAN, K., WANG, Y., SU, Y., YIN, X., HU, H. & YAO, Y. 2016. Bufalin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Osteosarcoma Cells by Downregulating MicroRNA-221. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 7319464.

10. Anhang

10.1 RT² Profiler™ PCR Array Human Cell Cycle

	MEL-JUS0 umb	MEL-JUS0 Cis	COLO-849 umb	COLO-849 Cis	IGR-37 umb	IGR-37 Cis	SK-MEL 3 umb	SK-MEL 3 Cis	SK-MEL 30 umb	SK-MEL 30 Cis	TU-MM 1 umb	TU-MM 1 Cis	TU-MM 2 umb	TU-MM 2 Cis	TU-MM 3 umb	TU-MM 3 Cis	TU-MM 4 umb	TU-MM 4 Cis	NHEM umb	NHEM Cis
<i>ABL1</i>	0,38	0,42	0,29	0,31	0,42	0,43	0,33	0,37	0,25	0,34	0,77	0,52	0,37	0,38	0,54	0,46	0,50	0,47	1,00	1,03
<i>ANAPC2</i>	0,57	0,66	0,64	0,64	0,59	0,72	0,45	0,49	0,34	0,44	0,53	0,44	0,50	0,53	0,34	0,41	0,36	0,45	1,00	1,05
<i>ATM</i>	0,09	0,07	0,43	0,34	0,17	0,14	0,10	0,11	0,13	0,12	0,14	0,09	0,14	0,10	0,09	0,07	0,09	0,07	1,00	0,83
<i>ATR</i>	0,80	0,80	0,63	0,75	0,64	0,41	0,58	0,63	0,59	0,74	0,45	0,34	0,42	0,40	0,31	0,33	0,28	0,35	1,00	1,18
<i>AURKA</i>	0,95	0,55	0,98	0,47	0,59	0,18	0,56	0,32	0,74	0,59	0,22	0,06	0,13	0,08	0,18	0,05	0,22	0,05	1,00	0,35
<i>AURKB</i>	0,63	0,59	0,54	0,46	0,34	0,11	0,61	0,39	0,49	0,61	0,20	0,04	0,04	0,01	0,12	0,02	0,15	0,02	1,00	0,52
<i>BCCIP</i>	0,58	0,47	0,76	0,78	0,48	0,21	0,58	0,48	0,87	0,86	0,39	0,32	0,63	0,58	0,34	0,31	0,32	0,32	1,00	1,03
<i>BCL2</i>	0,02	0,07	0,04	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,04
<i>BIRC5</i>	1,45	1,73	0,88	0,46	0,53	0,09	2,60	1,59	0,81	0,83	0,52	0,11	0,07	0,01	0,28	0,05	0,40	0,05	1,00	0,50
<i>BRC A1</i>	0,35	0,49	0,71	0,70	0,71	0,18	0,35	0,36	0,54	0,83	0,26	0,09	0,06	0,03	0,15	0,05	0,15	0,06	1,00	0,91
<i>BRC A2</i>	0,31	0,33	0,44	0,60	0,41	0,46	0,32	0,28	0,42	0,56	0,23	0,05	0,05	0,02	0,10	0,05	0,16	0,07	1,00	0,83
<i>CASP3</i>	0,30	0,28	0,35	0,29	0,28	0,31	0,37	0,33	0,47	0,68	0,47	0,32	0,64	0,75	0,38	0,37	0,34	0,34	1,00	0,99
<i>CCNA2</i>	0,71	0,49	0,43	0,22	0,25	0,19	0,69	0,45	0,53	0,62	0,35	0,07	0,07	0,01	0,23	0,04	0,30	0,04	1,00	0,38
<i>CCNB1</i>	0,78	0,43	0,49	0,18	0,43	0,21	0,68	0,42	0,51	0,31	0,20	0,03	0,07	0,03	0,13	0,03	0,19	0,04	1,00	0,30
<i>CCNB2</i>	0,63	0,36	0,34	0,22	0,78	0,62	0,60	0,38	0,59	0,51	0,26	0,05	0,07	0,02	0,17	0,04	0,22	0,05	1,00	0,44
<i>CCNC</i>	0,58	0,58	1,93	1,90	0,52	0,58	0,77	0,71	0,72	0,90	0,52	0,39	0,47	0,53	0,42	0,40	0,39	0,44	1,00	1,07
<i>CCND1</i>	0,73	0,57	1,54	1,16	0,88	0,62	1,17	0,75	1,87	1,65	2,74	1,97	4,91	4,25	4,03	3,30	3,45	3,32	1,00	1,14
<i>CCND2</i>	1,25	0,32	0,57	0,77	9,56	1,12	0,29	0,28	0,32	0,33	72,50	7,57	582,66	541,00	345,32	165,50	133,97	131,94	1,00	10,23
<i>CCND3</i>	0,32	0,41	0,31	0,35	0,44	0,44	0,38	0,41	0,38	0,61	0,34	0,29	0,46	0,40	0,35	0,37	0,30	0,34	1,00	0,96
<i>CCNE1</i>	0,98	1,04	1,01	1,13	1,10	0,87	0,60	0,80	0,42	1,01	0,28	0,17	0,37	0,32	0,21	0,15	0,16	0,19	1,00	1,24
<i>CCNF</i>	0,48	0,31	0,40	0,20	0,36	0,09	0,41	0,23	0,38	0,35	0,25	0,04	0,06	0,03	0,15	0,04	0,18	0,04	1,00	0,43
<i>CCNG1</i>	0,80	1,00	0,68	0,64	0,27	0,03	0,52	0,67	0,68	0,65	0,37	0,44	0,54	0,59	0,31	0,46	0,26	0,46	1,00	1,35
<i>CCNG2</i>	0,49	0,77	0,49	0,38	0,27	0,17	0,45	0,69	0,60	0,68	1,20	1,03	0,92	1,02	0,82	1,02	0,83	0,96	1,00	1,02
<i>CCNH</i>	0,59	0,51	0,64	0,63	0,68	0,54	0,67	0,55	0,41	0,45	0,26	0,22	0,45	0,41	0,21	0,26	0,22	0,28	1,00	0,90
<i>CCNT1</i>	0,48	0,53	0,85	1,17	0,38	0,50	0,52	0,54	0,51	0,73	0,36	0,28	0,37	0,34	0,26	0,29	0,05	0,33	1,00	1,33
<i>CDC16</i>	0,19	0,19	0,34	0,37	0,43	0,21	0,22	0,18	0,43	0,39	0,30	0,25	0,28	0,25	0,28	0,28	0,24	0,28	1,00	1,00
<i>CDC20</i>	0,74	0,35	0,45	0,25	0,61	0,38	0,63	0,34	0,85	0,57	0,29	0,04	0,09	0,01	0,21	0,03	0,29	0,03	1,00	0,20
<i>CDC25A</i>	0,42	0,38	0,70	0,73	0,53	0,74	0,47	0,37	0,61	0,88	0,14	0,07	0,06	0,03	0,09	0,04	0,09	0,04	1,00	0,87
<i>CDC25C</i>	0,82	0,74	0,48	0,24	0,43	0,42	0,68	0,65	0,54	0,55	0,22	0,04	0,05	0,01	0,15	0,03	0,17	0,04	1,00	0,44
<i>CDC34</i>	0,58	0,46	1,04	1,04	0,17	0,21	0,50	0,46	0,86	1,03	0,59	0,49	0,63	0,67	0,54	0,57	0,49	0,64	1,00	1,07
<i>CDC6</i>	0,60	0,68	1,06	1,53	1,38	2,03	0,63	0,65	0,99	1,63	0,33	0,11	0,09	0,04	0,14	0,07	0,15	0,07	1,00	1,29
<i>CDK1</i>	0,49	0,44	0,42	0,34	0,32	0,30	0,36	0,35	0,39	0,62	0,19	0,04	0,03	0,01	0,09	0,02	0,12	0,03	1,00	0,75
<i>CDK2</i>	0,48	0,50	0,50	0,53	0,46	0,15	0,33	0,33	0,60	0,64	0,04	0,02	0,02	0,01	0,03	0,02	0,03	0,02	1,00	0,89
<i>CDK4</i>	0,47	0,44	0,76	0,61	0,36	0,07	0,50	0,39	0,56	0,63	0,25	0,15	0,19	0,18	0,21	0,18	0,18	0,19	1,00	0,95
<i>CDK5R1</i>	0,27	0,29	1,29	0,99	0,60	0,66	0,31	0,16	3,70	2,83	0,05	0,03	0,06	0,04	0,02	0,04	0,03	0,03	1,00	0,82
<i>CDK5RAP1</i>	0,54	0,43	0,89	1,25	0,48	0,68	0,34	0,42	0,67	0,76	0,33	0,20	0,23	0,27	0,16	0,18	0,17	0,22	1,00	0,78
<i>CDK6</i>	1,27	1,01	4,58	3,22	1,85	1,59	1,59	1,09	0,60	0,63	2,27	1,39	2,71	1,94	2,52	1,69	1,84	1,73	1,00	1,14
<i>CDK7</i>	0,94	0,75	1,04	0,84	0,54	0,57	0,87	0,72	0,67	0,65	1,01	0,88	0,91	0,81	1,00	0,81	0,80	0,90	1,00	1,07
<i>CDK8</i>	0,48	0,38	1,02	0,99	0,46	0,41	0,55	0,32	0,68	0,63	0,50	0,37	0,53	0,41	0,41	0,37	0,34	0,37	1,00	1,11
<i>CDKN1A</i>	0,10	1,04	0,54	2,21	0,01	0,05	0,21	1,73	0,03	0,13	0,78	2,05	1,07	3,10	0,55	2,79	0,40	2,54	1,00	5,30
<i>CDKN1B</i>	0,39	0,40	0,72	0,68	0,34	0,42	0,40	0,32	0,31	0,39	0,47	0,25	0,25	0,22	0,26	0,17	0,25	0,19	1,00	0,81
<i>CDKN2A</i>	0,00	0,00	25,93	23,70	0,00	0,00	0,00	0,00	4,08	4,41	1,04	0,63	1,94	1,95	1,86	1,44	1,46	1,49	1,00	1,30

runterreguliert hochreguliert

	MEL-JUS0 umb	MEL-JUS0 Cis	COLO-849 umb	COLO-849 Cis	IGR-37 umb	IGR-37 Cis	SK-MEL 3 umb	SK-MEL 3 Cis	SK-MEL 30 umb	SK-MEL 30 Cis	TU-MM 1 umb	TU-MM1 Cis	TU-MM 2 umb	TU-MM 2 Cis	TU-MM 3 umb	TU-MM 3 Cis	TU-MM 4 umb	TU-MM 4 Cis	NHEM umb	NHEM Cis
OGG1	0,62	0,73	0,69	0,77	0,52	0,68	0,68	0,80	0,54	0,65	0,93	0,53	0,37	0,37	0,63	0,42	0,59	0,34	1,00	1,03
PARP1	0,62	0,64	0,60	0,58	0,45	0,41	0,48	0,46	0,85	0,89	0,18	0,12	0,14	0,14	0,13	0,10	0,13	0,10	1,00	0,77
PARP2	0,30	0,36	0,52	0,72	0,39	0,43	0,33	0,28	0,32	0,39	0,26	0,16	0,14	0,14	0,19	0,15	0,19	0,13	1,00	0,97
PARP3	0,82	1,01	1,11	1,74	0,82	1,21	0,94	1,54	0,37	0,61	2,06	1,95	1,20	1,20	1,74	2,13	1,83	2,03	1,00	1,49
PMS1	0,58	0,52	0,73	0,65	0,30	0,32	0,38	0,44	0,55	0,46	0,35	0,29	0,32	0,32	0,26	0,24	0,24	0,21	1,00	1,04
PMS2	0,93	0,86	1,41	1,57	0,62	0,73	0,88	0,92	0,36	0,41	0,29	0,24	0,20	0,20	0,31	0,30	0,27	0,25	1,00	1,03
PNKP	0,31	0,39	0,66	0,70	0,30	0,38	0,23	0,24	0,21	0,23	0,37	0,31	0,29	0,29	0,36	0,32	0,37	0,27	1,00	1,01
POLB	0,29	0,38	0,96	1,02	0,37	0,38	0,25	0,34	0,38	0,42	0,17	0,15	0,14	0,14	0,13	0,13	0,12	0,14	1,00	0,89
POLD3	0,54	0,70	0,43	0,82	0,60	1,05	0,71	0,83	1,35	2,42	0,53	0,36	0,11	0,11	0,39	0,23	0,38	0,26	1,00	1,04
POLL	0,53	0,60	0,67	0,89	0,34	0,48	0,45	0,56	0,67	0,49	0,38	0,28	0,28	0,28	0,28	0,29	0,27	0,36	1,00	1,20
PRKDC	0,69	0,64	2,40	2,21	0,88	0,61	0,63	0,63	1,06	0,88	0,49	0,25	0,26	0,26	0,32	0,22	0,24	0,27	1,00	0,76
RAD18	0,80	0,77	0,65	0,78	0,63	0,75	1,00	0,88	0,64	0,69	0,50	0,31	0,52	0,52	0,42	0,25	0,36	0,24	1,00	0,68
RAD21	0,62	0,44	0,83	0,74	0,67	0,62	0,67	0,55	0,65	0,70	0,46	0,37	0,21	0,21	0,46	0,32	0,42	0,32	1,00	0,69
RAD23A	0,61	0,64	0,65	0,59	0,81	0,63	0,61	0,61	0,59	0,56	0,48	0,38	0,25	0,25	0,37	0,39	0,30	0,38	1,00	0,86
RAD23B	0,69	0,59	0,70	0,55	0,53	0,44	0,69	0,66	0,48	0,49	0,86	0,84	1,14	1,14	0,76	0,89	0,69	0,80	1,00	0,80
RAD50	0,68	0,60	0,45	0,52	0,43	0,43	0,51	0,60	0,14	0,16	0,52	0,42	0,44	0,44	0,48	0,43	0,41	0,36	1,00	0,88
RAD51	0,43	0,34	0,31	0,37	0,73	0,78	0,46	0,36	0,37	0,45	0,29	0,12	0,07	0,07	0,19	0,07	0,22	0,06	1,00	0,90
RAD51B	0,59	0,29	0,78	0,29	0,42	0,17	0,43	0,15	0,57	0,24	0,30	0,03	0,14	0,14	0,25	0,02	0,23	0,03	1,00	0,34
RAD51C	0,71	1,25	0,36	0,63	0,53	0,69	0,76	1,51	0,40	0,57	0,08	0,05	0,09	0,09	0,07	0,06	0,06	0,06	1,00	1,23
RAD51D	0,45	0,43	0,57	0,60	0,54	0,68	0,41	0,39	0,48	0,54	0,37	0,26	0,18	0,18	0,30	0,19	0,32	0,21	1,00	0,93
RAD52	0,39	0,44	0,24	0,40	0,44	0,53	0,32	0,44	0,44	0,46	0,48	0,41	0,24	0,24	0,29	0,35	0,25	0,33	1,00	1,24
RAD54L	0,70	0,70	0,52	0,59	0,70	0,90	0,89	0,65	0,82	1,19	0,27	0,13	0,09	0,09	0,18	0,08	0,21	0,08	1,00	0,93
RFC1	0,54	0,55	0,59	0,66	0,38	0,58	0,56	0,57	0,61	0,83	0,42	0,35	0,24	0,24	0,35	0,28	0,32	0,25	1,00	1,00
RPA1	0,48	0,51	0,59	0,49	0,36	0,33	0,44	0,53	0,45	0,50	0,34	0,24	0,23	0,23	0,27	0,21	0,23	0,23	1,00	0,95
RPA3	1,04	1,35	1,20	1,17	1,24	1,25	1,03	1,32	0,41	0,52	0,23	0,14	0,11	0,11	0,18	0,12	0,19	0,13	1,00	0,98
SLK	0,45	0,39	0,49	0,54	0,28	0,32	0,35	0,36	0,40	0,55	0,56	0,42	0,28	0,28	0,53	0,48	0,47	0,46	1,00	0,84
SMUG1	0,28	0,25	0,65	0,81	0,36	0,44	0,18	0,27	0,48	0,57	0,35	0,29	0,29	0,29	0,31	0,33	0,28	0,31	1,00	1,15
TDG	0,48	0,42	0,60	0,75	0,25	0,26	0,46	0,49	0,48	0,50	0,28	0,28	0,55	0,55	0,26	0,30	0,21	0,26	1,00	1,12
TOP3A	0,50	0,53	0,37	0,48	0,34	0,45	0,39	0,45	0,54	0,64	0,28	0,16	0,15	0,15	0,20	0,17	0,17	0,16	1,00	0,92
TOP3B	0,45	0,56	1,57	1,88	0,56	0,68	0,48	0,54	0,48	0,61	0,35	0,34	0,30	0,30	0,28	0,33	0,27	0,27	1,00	0,95
TREX1	0,17	0,22	0,24	0,33	0,26	0,28	0,15	0,19	0,10	0,20	0,11	0,09	0,08	0,08	0,10	0,10	0,11	0,11	1,00	0,97
UNG	1,13	0,58	1,20	1,04	0,69	0,64	0,97	0,65	0,82	0,75	0,36	0,31	0,37	0,37	0,28	0,26	0,25	0,24	1,00	0,91
XAB2	0,37	0,37	0,88	0,98	0,46	0,54	0,32	0,37	0,42	0,46	0,42	0,35	0,30	0,30	0,33	0,33	0,29	0,30	1,00	0,83
XPA	1,02	0,89	1,18	0,94	0,93	1,06	1,17	1,12	0,70	0,70	0,73	0,51	0,61	0,61	0,84	0,55	0,64	0,61	1,00	1,09
XPC	0,35	1,00	0,66	1,49	0,25	0,43	0,44	1,63	0,21	0,29	0,77	0,67	0,35	0,35	0,49	0,74	0,31	0,93	1,00	2,83
XRCC1	0,59	0,72	0,52	0,54	0,58	0,68	0,61	0,63	0,36	0,44	0,43	0,26	0,17	0,17	0,32	0,23	0,29	0,24	1,00	0,81
XRCC2	1,81	1,39	1,30	1,24	2,11	2,36	2,14	1,80	1,09	1,62	0,32	0,14	0,11	0,11	0,23	0,06	0,23	0,07	1,00	1,11
XRCC3	0,30	0,29	0,43	0,62	0,44	0,50	0,19	0,18	0,41	0,48	0,24	0,17	0,13	0,13	0,16	0,18	0,16	0,16	1,00	0,89
XRCC4	0,78	0,47	0,82	0,67	0,70	0,45	0,76	0,50	0,68	0,31	0,45	0,09	0,51	0,51	0,40	0,13	0,40	0,11	1,00	0,48
XRCC5	0,56	0,59	0,68	0,62	0,48	0,40	0,46	0,47	0,55	0,55	0,37	0,31	0,29	0,29	0,31	0,29	0,31	0,26	1,00	0,78
XRCC6	0,72	0,63	1,85	1,72	0,94	1,06	0,69	0,71	0,98	0,98	0,52	0,40	0,43	0,43	0,40	0,37	0,43	0,40	1,00	1,11
XRCC6BP1	0,92	0,92	1,21	1,46	0,56	0,76	0,95	0,98	0,54	0,91	0,34	0,22	0,16	0,16	0,28	0,25	0,34	0,28	1,00	0,85

runterreguliert hochreguliert

Tabelle 1: Übersicht der Ergebnisse des RT² Profiler™ PCR Array Human Cell Cycle

Für eine Übersicht der Cisplatin-Wirkung auf Gene, welche an der Zellzyklusregulation beteiligt sind, wurden die Zellen für 24h mit 8µM Cisplatin behandelt oder unbehandelt belassen. Die RNA wurde mit dem RNeasy Kit isoliert. Die cDNA Synthese erfolgte mit dem RT² First Strand Kit, die qRT-PCR mit dem RT² SYBR Green Mastermix und dem Human Cell Cycle Array (alles von Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der 2^{-ΔΔCt} Methode berechnet. Die Bewertung der Herunter- bzw. Hochregulation bezieht sich auf die 2-fache Repression bzw. Induktion im Vergleich zur Kontrolle, den unbehandelten Melanozyten.

10.2 RT² Profiler™ PCR Array: Human DNA Repair

	MEL-JUS0 umb	MEL-JUS0 Cis	COLO-849 umb	COLO-849 Cis	IGR-37 umb	IGR-37 Cis	SK-MEL_3 umb	SK-MEL_3 Cis	SK-MEL_30 umb	SK-MEL_30 Cis	TU-MM 1 umb	TU-MM 1 Cis	TU-MM2 umb	TU-MM 2 Cis	TU-MM 3 umb	TU-MM 3 Cis	TU-MM 4 umb	TU-MM 4 Cis	NHEM umb	NHEM Cis
<i>APEX1</i>	0,36	0,33	0,89	0,82	0,26	0,24	0,28	0,28	0,37	0,39	0,31	0,29	0,30	0,30	0,26	0,27	0,24	0,25	1,00	0,84
<i>APEX2</i>	0,45	0,47	0,51	0,83	0,63	1,05	0,41	0,51	0,56	0,80	0,31	0,19	0,21	0,21	0,16	0,22	0,40	0,23	1,00	1,24
<i>ATM</i>	0,07	0,08	0,38	0,30	0,14	0,14	0,09	0,11	0,10	0,12	0,11	0,07	0,12	0,12	0,08	0,06	0,08	0,06	1,00	0,77
<i>ATR</i>	0,79	0,66	0,57	0,68	0,57	0,66	0,53	0,62	0,58	0,57	0,32	0,32	0,38	0,38	0,27	0,34	0,24	0,30	1,00	0,83
<i>ATXN3</i>	0,17	0,16	0,58	0,54	0,22	0,16	0,09	0,14	0,21	0,20	0,71	0,58	0,22	0,22	0,54	0,47	0,50	0,45	1,00	0,94
<i>BRCA1</i>	0,38	0,49	0,73	0,92	0,79	1,07	0,37	0,38	0,55	0,79	0,22	0,08	0,05	0,05	0,18	0,05	0,16	0,07	1,00	0,77
<i>BRCA2</i>	0,37	0,37	0,51	0,60	0,53	0,60	0,38	0,35	0,50	0,62	0,23	0,08	0,04	0,04	0,15	0,04	0,17	0,06	1,00	0,82
<i>BRIP1</i>	0,41	0,61	0,35	0,54	0,52	0,69	0,48	0,54	0,41	0,65	0,37	0,19	0,15	0,15	0,34	0,12	0,31	0,12	1,00	0,91
<i>CCNH</i>	0,53	0,49	0,53	0,49	0,62	0,55	0,60	0,53	0,37	0,30	0,18	0,22	0,35	0,35	0,20	0,24	0,18	0,23	1,00	0,84
<i>CCNO</i>	0,27	0,40	2,90	3,76	4,54	8,71	3,96	0,43	2,58	5,05	0,14	0,09	0,96	0,96	0,08	0,07	0,11	0,09	1,00	1,54
<i>CDK7</i>	0,82	0,72	0,85	0,84	0,00	0,57	0,74	0,78	0,57	0,56	0,86	0,86	0,82	0,82	0,98	0,94	0,84	0,86	1,00	0,94
<i>DDB1</i>	0,38	0,43	0,54	0,60	0,50	0,47	0,32	0,42	0,83	0,80	0,45	0,42	0,57	0,57	0,49	0,48	0,46	0,41	1,00	0,88
<i>DDB2</i>	0,31	1,44	0,62	1,16	0,12	0,14	0,28	1,16	0,09	0,16	0,19	0,29	0,17	0,17	0,15	0,35	0,15	0,30	1,00	2,12
<i>DMC1</i>	0,04	0,04	0,11	0,04	0,04	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01	1,32	0,54	0,26	0,26	0,78	0,29	1,07	0,28	1,00	0,78
<i>ERCC1</i>	0,56	0,59	1,04	1,06	0,68	0,66	0,72	0,68	0,39	0,45	0,73	0,45	0,64	0,64	0,64	0,46	0,52	0,41	1,00	1,10
<i>ERCC2</i>	0,37	0,35	0,89	0,86	0,46	0,45	0,23	0,30	0,35	0,30	1,53	1,21	1,59	1,59	1,59	1,52	1,47	1,31	1,00	0,91
<i>ERCC3</i>	0,60	0,57	0,69	0,86	0,58	0,57	0,46	0,56	0,68	0,76	0,32	0,30	0,27	0,27	0,33	0,30	0,27	0,34	1,00	1,07
<i>ERCC4</i>	0,34	0,48	0,61	0,66	0,65	0,61	0,29	0,43	0,36	0,36	0,45	0,33	0,37	0,37	0,30	0,28	0,27	0,31	1,00	0,92
<i>ERCC5</i>	0,39	0,40	0,54	0,67	0,28	0,29	0,34	0,47	0,26	0,38	0,54	0,59	0,68	0,68	0,52	0,71	0,47	0,65	1,00	1,07
<i>ERCC6</i>	0,73	0,89	0,86	0,94	0,30	0,43	0,63	0,88	0,89	1,05	3,23	2,14	1,78	1,78	4,10	2,37	2,86	2,23	1,00	1,14
<i>ERCC8</i>	1,14	1,01	0,72	0,78	0,49	0,49	1,12	1,05	0,49	0,46	0,50	0,41	0,56	0,56	0,55	0,44	0,47	0,36	1,00	0,91
<i>EXO1</i>	0,83	0,85	0,59	0,64	0,43	0,63	0,67	0,63	0,80	1,31	0,18	0,09	0,06	0,06	0,12	0,04	0,10	0,03	1,00	0,85
<i>FEN1</i>	0,49	0,60	0,30	0,34	0,54	0,62	0,47	0,54	0,49	0,70	0,12	0,05	0,06	0,06	0,08	0,04	0,09	0,04	1,00	0,87
<i>LIG1</i>	0,35	0,46	0,25	0,39	0,23	0,30	0,36	0,44	0,27	0,45	0,15	0,09	0,05	0,05	0,09	0,08	0,11	0,08	1,00	1,04
<i>LIG3</i>	0,45	0,35	0,75	0,88	0,69	0,65	0,37	0,28	0,58	0,45	0,32	0,22	0,27	0,27	0,22	0,17	0,23	0,17	1,00	0,77
<i>LIG4</i>	0,26	0,26	0,46	0,40	0,28	0,31	0,30	0,33	0,39	0,35	0,36	0,32	0,44	0,44	0,35	0,33	0,32	0,30	1,00	0,94
<i>MGMT</i>	0,00	0,00	0,29	0,13	0,18	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,51	0,15	0,33	0,33	0,54	0,14	0,46	0,17	1,00	0,50
<i>MLH1</i>	0,58	0,75	0,84	0,93	0,45	0,43	0,63	0,74	0,44	0,51	0,38	0,29	0,28	0,28	0,36	0,25	0,33	0,26	1,00	1,00
<i>MLH3</i>	0,76	0,73	1,01	1,02	0,03	0,05	0,52	0,64	0,03	0,08	0,32	0,30	0,38	0,38	0,29	0,33	0,25	0,30	1,00	0,86
<i>MMS19</i>	0,42	0,40	0,90	0,87	0,20	0,20	0,31	0,32	0,34	0,35	0,24	0,19	0,24	0,24	0,22	0,20	0,18	0,17	1,00	0,86
<i>MPG</i>	0,67	0,74	1,49	1,33	0,81	0,87	0,60	0,68	0,37	0,47	1,02	0,87	0,58	0,58	0,91	0,69	0,77	0,80	1,00	0,92
<i>MRE11A</i>	0,48	0,53	0,73	0,73	0,64	0,75	0,38	0,49	0,30	0,34	0,33	0,25	0,22	0,22	0,33	0,22	0,29	0,21	1,00	0,87
<i>MSH2</i>	0,57	0,58	0,55	0,66	0,66	0,78	0,44	0,41	0,92	1,13	0,29	0,20	0,09	0,09	0,24	0,16	0,21	0,14	1,00	0,91
<i>MSH3</i>	0,80	0,81	0,43	0,40	0,41	0,38	0,85	0,76	0,53	0,45	0,60	0,33	0,35	0,35	0,51	0,30	0,40	0,28	1,00	0,79
<i>MSH4</i>	0,00	0,22	0,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,71	1,70	1,51	0,00	0,32	0,37	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,44
<i>MSH5</i>	0,29	0,33	0,58	0,80	0,41	0,50	0,38	0,38	0,40	0,63	0,20	0,14	0,06	0,06	0,16	0,13	0,20	0,09	1,00	0,80
<i>MSH6</i>	0,93	0,72	0,98	0,88	0,97	0,95	0,68	0,47	1,01	1,12	0,62	0,41	0,28	0,28	0,45	0,34	0,38	0,33	1,00	0,84
<i>MUTYH</i>	0,38	0,46	0,36	0,47	0,53	0,79	0,40	0,44	0,67	1,10	0,27	0,23	0,15	0,15	0,21	0,20	0,25	0,14	1,00	1,03
<i>NEIL1</i>	0,53	0,41	0,41	0,69	0,78	1,07	0,58	0,56	0,61	0,81	0,46	0,57	0,43	0,43	0,36	0,73	0,42	0,45	1,00	1,41
<i>NEIL2</i>	0,17	0,15	1,32	1,28	0,48	0,46	0,20	0,19	0,45	0,46	0,31	0,22	0,37	0,37	0,33	0,29	0,30	0,26	1,00	0,84
<i>NEIL3</i>	0,41	0,43	0,59	0,53	0,30	0,34	0,34	0,39	0,24	0,33	0,23	0,09	0,07	0,07	0,14	0,04	0,20	0,05	1,00	0,55
<i>NTHL1</i>	0,91	0,75	0,97	0,82	0,49	0,46	0,59	0,54	0,59	0,47	0,35	0,32	0,20	0,20	0,27	0,32	0,23	0,29	1,00	0,73

runterreguliert  hochreguliert

	MEL-JUS0 umb	MEL-JUS0 Cis	COLO-849 umb	COLO-849 Cis	IGR-37 umb	IGR-37 Cis	SK-MEL3 umb	SK-MEL3 Cis	SK-MEL30 umb	SK-MEL30 Cis	TU-MM1 umb	TU-MM1 Cis	TU-MM2 umb	TU-MM2 Cis	TU-MM3 umb	TU-MM3 Cis	TU-MM4 umb	TU-MM4 Cis	NHEM umb	NHEM Cis
<i>OGG1</i>	0,62	0,73	0,69	0,77	0,52	0,68	0,68	0,80	0,54	0,65	0,93	0,53	0,37	0,37	0,63	0,42	0,59	0,34	1,00	1,03
<i>PARP1</i>	0,62	0,64	0,60	0,58	0,45	0,41	0,48	0,46	0,85	0,89	0,18	0,12	0,14	0,14	0,13	0,10	0,13	0,10	1,00	0,77
<i>PARP2</i>	0,30	0,36	0,52	0,72	0,39	0,43	0,33	0,28	0,32	0,39	0,26	0,16	0,14	0,14	0,19	0,15	0,19	0,13	1,00	0,97
<i>PARP3</i>	0,82	1,01	1,11	1,74	0,82	1,21	0,94	1,54	0,37	0,61	2,06	1,95	1,20	1,20	1,74	2,13	1,83	2,03	1,00	1,49
<i>PMS1</i>	0,58	0,52	0,73	0,65	0,30	0,32	0,38	0,44	0,55	0,46	0,35	0,29	0,32	0,32	0,26	0,24	0,24	0,21	1,00	1,04
<i>PMS2</i>	0,93	0,86	1,41	1,57	0,62	0,73	0,88	0,92	0,36	0,41	0,29	0,24	0,20	0,20	0,31	0,30	0,27	0,25	1,00	1,03
<i>PNKP</i>	0,31	0,39	0,66	0,70	0,30	0,38	0,23	0,24	0,21	0,23	0,37	0,31	0,29	0,29	0,36	0,32	0,37	0,27	1,00	1,01
<i>POLB</i>	0,29	0,38	0,96	1,02	0,37	0,38	0,25	0,34	0,38	0,42	0,17	0,15	0,14	0,14	0,13	0,13	0,12	0,14	1,00	0,89
<i>POLD3</i>	0,54	0,70	0,43	0,82	0,60	1,05	0,71	0,83	1,35	2,42	0,53	0,36	0,11	0,11	0,39	0,23	0,38	0,26	1,00	1,04
<i>POLL</i>	0,53	0,60	0,67	0,89	0,34	0,48	0,45	0,56	0,67	0,49	0,38	0,28	0,28	0,28	0,28	0,29	0,27	0,36	1,00	1,20
<i>PRKDC</i>	0,69	0,64	2,40	2,21	0,88	0,61	0,63	0,63	1,06	0,88	0,49	0,25	0,26	0,26	0,32	0,22	0,24	0,27	1,00	0,76
<i>RAD18</i>	0,80	0,77	0,65	0,78	0,63	0,75	1,00	0,88	0,64	0,69	0,50	0,31	0,52	0,52	0,42	0,25	0,36	0,24	1,00	0,68
<i>RAD21</i>	0,62	0,44	0,83	0,74	0,67	0,62	0,67	0,55	0,65	0,70	0,46	0,37	0,21	0,21	0,46	0,32	0,42	0,32	1,00	0,69
<i>RAD23A</i>	0,61	0,64	0,65	0,59	0,81	0,63	0,61	0,61	0,59	0,56	0,48	0,38	0,25	0,25	0,37	0,39	0,30	0,38	1,00	0,86
<i>RAD23B</i>	0,69	0,59	0,70	0,55	0,53	0,44	0,69	0,66	0,48	0,49	0,86	0,84	1,14	1,14	0,76	0,89	0,69	0,80	1,00	0,80
<i>RAD50</i>	0,68	0,60	0,45	0,52	0,43	0,43	0,51	0,60	0,14	0,16	0,52	0,42	0,44	0,44	0,48	0,43	0,41	0,36	1,00	0,88
<i>RAD51</i>	0,43	0,34	0,31	0,37	0,73	0,78	0,46	0,36	0,37	0,45	0,29	0,12	0,07	0,07	0,19	0,07	0,22	0,06	1,00	0,90
<i>RAD51B</i>	0,59	0,29	0,78	0,29	0,42	0,17	0,43	0,15	0,57	0,24	0,30	0,03	0,14	0,14	0,25	0,02	0,23	0,03	1,00	0,34
<i>RAD51C</i>	0,71	1,25	0,36	0,63	0,53	0,69	0,76	1,51	0,40	0,57	0,08	0,05	0,09	0,09	0,07	0,06	0,06	0,06	1,00	1,23
<i>RAD51D</i>	0,45	0,43	0,57	0,60	0,54	0,68	0,41	0,39	0,48	0,54	0,37	0,26	0,18	0,18	0,30	0,19	0,32	0,21	1,00	0,93
<i>RAD52</i>	0,39	0,44	0,24	0,40	0,44	0,53	0,32	0,44	0,44	0,46	0,48	0,41	0,24	0,24	0,29	0,35	0,25	0,33	1,00	1,24
<i>RAD54L</i>	0,70	0,70	0,52	0,59	0,70	0,90	0,89	0,65	0,82	1,19	0,27	0,13	0,09	0,09	0,18	0,08	0,21	0,08	1,00	0,93
<i>RFC1</i>	0,54	0,55	0,59	0,66	0,38	0,58	0,56	0,57	0,61	0,83	0,42	0,35	0,24	0,24	0,35	0,28	0,32	0,25	1,00	1,00
<i>RPA1</i>	0,48	0,51	0,59	0,49	0,36	0,33	0,44	0,53	0,45	0,50	0,34	0,24	0,23	0,23	0,27	0,21	0,23	0,23	1,00	0,95
<i>RPA3</i>	1,04	1,35	1,20	1,17	1,24	1,25	1,03	1,32	0,41	0,52	0,23	0,14	0,11	0,11	0,18	0,12	0,19	0,13	1,00	0,98
<i>SLK</i>	0,45	0,39	0,49	0,54	0,28	0,32	0,35	0,36	0,40	0,55	0,56	0,42	0,28	0,28	0,53	0,48	0,47	0,46	1,00	0,84
<i>SMUG1</i>	0,28	0,25	0,65	0,81	0,36	0,44	0,18	0,27	0,48	0,57	0,35	0,29	0,29	0,29	0,31	0,33	0,28	0,31	1,00	1,15
<i>TDG</i>	0,48	0,42	0,60	0,75	0,25	0,26	0,46	0,49	0,48	0,50	0,28	0,28	0,55	0,55	0,26	0,30	0,21	0,26	1,00	1,12
<i>TOP3A</i>	0,50	0,53	0,37	0,48	0,34	0,45	0,39	0,45	0,54	0,64	0,28	0,16	0,15	0,15	0,20	0,17	0,17	0,16	1,00	0,92
<i>TOP3B</i>	0,45	0,56	1,57	1,88	0,56	0,68	0,48	0,54	0,48	0,61	0,35	0,34	0,30	0,30	0,28	0,33	0,27	0,27	1,00	0,95
<i>TREX1</i>	0,17	0,22	0,24	0,33	0,26	0,28	0,15	0,19	0,10	0,20	0,11	0,09	0,08	0,08	0,10	0,10	0,11	0,11	1,00	0,97
<i>UNG</i>	1,13	0,58	1,20	1,04	0,69	0,64	0,97	0,65	0,82	0,75	0,36	0,31	0,37	0,37	0,28	0,26	0,25	0,24	1,00	0,91
<i>XAB2</i>	0,37	0,37	0,88	0,98	0,46	0,54	0,32	0,37	0,42	0,46	0,42	0,35	0,30	0,30	0,33	0,33	0,29	0,30	1,00	0,83
<i>XPA</i>	1,02	0,89	1,18	0,94	0,93	1,06	1,17	1,12	0,70	0,70	0,73	0,51	0,61	0,61	0,84	0,55	0,64	0,61	1,00	1,09
<i>XPC</i>	0,35	1,00	0,66	1,49	0,25	0,43	0,44	1,63	0,21	0,29	0,77	0,67	0,35	0,35	0,49	0,74	0,31	0,93	1,00	2,83
<i>XRCC1</i>	0,59	0,72	0,52	0,54	0,58	0,68	0,61	0,63	0,36	0,44	0,43	0,26	0,17	0,17	0,32	0,23	0,29	0,24	1,00	0,81
<i>XRCC2</i>	1,81	1,39	1,30	1,24	2,11	2,36	2,14	1,80	1,09	1,62	0,32	0,14	0,11	0,11	0,23	0,06	0,23	0,07	1,00	1,11
<i>XRCC3</i>	0,30	0,29	0,43	0,62	0,44	0,50	0,19	0,18	0,41	0,48	0,24	0,17	0,13	0,13	0,16	0,18	0,16	0,16	1,00	0,89
<i>XRCC4</i>	0,78	0,47	0,82	0,67	0,70	0,45	0,76	0,50	0,68	0,31	0,45	0,09	0,51	0,51	0,40	0,13	0,40	0,11	1,00	0,48
<i>XRCC5</i>	0,56	0,59	0,68	0,62	0,48	0,40	0,46	0,47	0,55	0,55	0,37	0,31	0,29	0,29	0,31	0,29	0,31	0,26	1,00	0,78
<i>XRCC6</i>	0,72	0,63	1,85	1,72	0,94	1,06	0,69	0,71	0,98	0,98	0,52	0,40	0,43	0,43	0,40	0,37	0,43	0,40	1,00	1,11
<i>XRCC6BPI</i>	0,92	0,92	1,21	1,46	0,56	0,76	0,95	0,98	0,54	0,91	0,34	0,22	0,16	0,16	0,28	0,25	0,34	0,28	1,00	0,85

runterreguliert hochreguliert

Tabelle 2: Übersicht der Ergebnisse des RT² ProfilerTM PCR Array Human DNA Repair

Für eine Übersicht der Cisplatin-Wirkung auf Gene, welche an der DNA Reparatur beteiligt sind, wurden die Zellen für 24h mit 8µM Cisplatin behandelt oder unbehandelt belassen. Die RNA wurde mit dem RNeasy Kit isoliert. Die cDNA Synthese erfolgte mit dem RT² First Strand Kit, die qRT-PCR mit dem RT² SYBR Green Mastermix und dem Human DNA Repair Array (alles von Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Genexpression wurde gegen *GAPDH* normalisiert und mit der 2^{-ΔΔCt} Methode berechnet. Die Bewertung der Herunter- bzw. Hochregulation bezieht sich auf die 2-fache Repression oder Induktion im Vergleich zur Kontrolle, den unbehandelten Melanozyten.

10.3 Vergleichende epidemiologische und Tumorrelevante Charakteristika der kutanen Melanom- und Schleimhautmelanom-Kohorte

	CM n (%)	MM n (%)	p-Wert
n	129	29	
Alter (Jahren)			<0.0001
Mittel ± SD	57±18	70±12	
Geschlecht, n (%)			0.073
männlich	77 (60)	12 (41)	
weiblich	52 (40)	17 (59)	
Lokalisation			
Sinonasal		26 (90)	
Nasopharynx		1 (3)	
Mundhöhle		2 (7)	
Haut (Kopf-Hals-Bereich)	129 (100)		
T Status, n (%)			<0.0001
T1	80 (62)		
T2	17 (14)		
T3	16 (12)	24 (83)	
T4	16 (12)	5 (17)	
N Status, n (%)			<0.0001
N0	44 (34)	25 (86)	
N+	66 (66)	4 (14)	
M Status, n (%)			0.003
M0	112 (87)	29 (100)	
M1	17 (13)		
R Status, n (%)			0.33
R0	124 (96)	26 (90)	
R1	4 (3)	2 (7)	
R2	1 (1)	1 (3)	
Behandlung, n (%)			0.096
OP	88 (71)	17 (58)	
OP + RTx	13 (10)	9 (32)	
OP + RCTx	12 (9)		
OP + CTx	14 (10)		
Primär RTx		3 (10)	

CM- kutanes Melanom, MM-Schleimhautmelanom, T- Tumor, N- regionäre Lymphknotenmetastasen, M- Fernmetastasen, R- Rezidiv, Anzahl, SD- Standardabweichung, OP- Operation, RTx- Strahlentherapie, RCTx- Strahlen- und Chemotherapie, CTx- Chemotherapie.

11. Danksagung

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

Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung und die Möglichkeit zur freien Gestaltung dieser interessanten Themenstellung, für seine wertvollen Ratschläge sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. med. Henning Bier, der mir die Möglichkeit gab in der HNO an diesem spannenden Thema mitzuarbeiten.

Außerdem bedanke ich recht herzlich bei meiner Zweitbetreuerin Frau Prof. Dr. Gabriele Multhoff, für den Zuspruch und die wertvollen Tipps.

Weiterer Dank gilt meinen Kollegen des HNO-Labors, welche mir unterstützend zu Seite standen. Besonderen Dank gilt Peter Strzelczyk, der immer für einen Spaß zu haben war, aber auch immer ein aufbauendes Wort übrig hatte.

Dr. Florian Kraft und Dr. Sybille Regn danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Natürlich danke ich auch meinen Freunden, die immer für Ablenkung gesorgt haben, wenn diese nötig war.

An letzter Stelle möchte ich noch meiner Familie und meinem Mann Franz danken, die mir stets den Rücken gestärkt und mich motiviert haben. Und auch für die vielen Fragen wann ich denn fertig bin ☺.

12. Eidesstattliche Erklärung

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

p53 Signalweg in Schleimhautmelanomen und kutanen Melanomen

in der Hals-, Nasen-, Ohren- und Poliklinik des Universitätsklinikums Rechts der Isar unter Anleitung und Betreuung von Herrn PD Dr. Andreas Knopf ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Die vollständige Dissertation wurde nicht veröffentlicht.

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

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

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

Ort, Datum

Unterschrift

13. Publikationen

ECKEY, M., KRAFT, F., KOB, R., ESCHER, N., ASIM, M., FISCHER, H., **FRITSCHÉ, M. K.**, MELLE, C. & BANIAHMAD, A. 2013. The corepressor activity of Alien is controlled by CREB-binding protein/p300. *FEBS J*, 280, 1861-8.

FRITSCHÉ, M. K., METZLER, V., BECKER, K., PLETTENBERG, C., HEISER, C., HOF AUER, B. & KNO PF, A. 2015. Cisplatin fails to induce puma mediated apoptosis in mucosal melanomas. *Oncotarget*, 6, 9887-96.

JACOBI, C., AYX, I., **FRITSCHÉ, K.**, PIONTEK, G., HOFFMANN, D., WEIRICH, G. & KNO PF, A. 2015. Potential impact of human papilloma virus on survival of basaloid squamous carcinoma of the head and neck. *Oncotarget*, 6, 3462-70.

KNO PF, A., LEMPART, J., BAS, M., SLOTTA-HUSPENINA, J., MANSOUR, N. & **FRITSCHÉ, M. K.** 2015. Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. *Oncotarget*, 6, 3443-51.

KNO PF, A., BAHADORI, L., **FRITSCHÉ, K.**, PIONTEK, G., BECKER, C. C., KNOLLE, P., KRUGER, A., BIER, H. & LI, Y. 2017. Primary tumor-associated expression of CXCR4 predicts formation of local and systemic recurrency in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8, 112739-112747.

KNO PF, A., **FRITSCHÉ, M. K.** & LI, Y. 2017. CXCR4: A New Player in an Old Scene? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 79, 34-42.

FRITSCHÉ, M. K. & KNO PF, A. 2017. The Tumor Suppressor p53 in Mucosal Melanoma of the Head and Neck. *Genes (Basel)*, 8.