

**Untersuchungen zur Wirksamkeit von Dacarbazin  
und Temozolomid bei der Behandlung des kutanen  
Melanoms in Assoziation mit DNA-Reparatur**

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades "Doctor rerum naturalium"  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

**Lars Böckmann**

aus Dachau

Göttingen 2009

Referent:

PD Dr. W. Kramer

Korreferent:

Prof. Dr. J. Brockmüller

Tag der mündlichen Prüfung:

15. Januar 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis Dezember 2009 in der Abteilung Dermatologie, Venerologie und Allergologie unter Anleitung von Prof. Dr. S. Emmert in der Universitätsmedizin der Georg-August-Universität zu Göttingen angefertigt.

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>III</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>VII</b>
<b>IV</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND ANGLIZISMEN .....</b>	<b>IX</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DNA-Reparatur Mechanismen .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Direkte Reversion.....	1
1.1.2	Basen-Exzisions-Reparatur (BER).....	2
1.1.3	Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) .....	3
1.1.4	Basenfehlpaarungs-Reparatur (MMR) .....	4
1.1.5	Homologe Rekombination (HR) .....	5
1.1.6	Nicht-homologe-Endverknüpfung (NHEJ).....	6
1.1.7	Transläsionale Synthese (TLS) .....	6
1.1.8	<i>Cross-Link</i> Reparatur .....	7
<b>1.2</b>	<b>Hautkrebs .....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Übersicht .....	7
1.2.2	Das Basalzellkarzinom und das Plattenepithelkarzinom .....	8
1.2.3	Das maligne Melanom .....	8
<b>1.3</b>	<b>Therapie des kutanen Melanoms .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4</b>	<b>Wirkmechanismus der Chemotherapeutika Dacarbazin und Temozolomid .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5</b>	<b>Prädiktive Biomarker für das maligne Melanom.....</b>	<b>14</b>
<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>18</b>

---

2.1.1	Geräte .....	18
2.1.2	Elektronische Datenverarbeitung und Datenbanken .....	19
2.1.3	Chemikalien und Enzyme .....	20
2.1.4	Lösungen und Puffer .....	21
2.1.5	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme ( <i>Kits</i> ).....	23
2.1.6	Antikörper .....	23
2.1.6.1	Primärantikörper .....	23
2.1.6.2	Sekundärantikörper .....	23
2.1.7	Humane Melanom-Zelllinien.....	24
2.1.8	Zellkulturmedien.....	24
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.2.1	Patienten .....	24
2.2.2	Zellkultur.....	25
2.2.2.1	Das Kultivieren humaner Melanom-Zelllinien.....	25
2.2.2.2	Das Passagieren und Ernten humaner Melanom-Zelllinien .....	26
2.2.2.3	Zellzählung .....	26
2.2.2.4	Kryokonservierung von Melanom-Zelllinien .....	27
2.2.2.5	Revitalisierung von kryokonservierten Melanom-Zelllinien.....	27
2.2.2.6	Behandlung von Melanom-Zelllinien mit Temozolomid .....	27
2.2.3	CellTiter 96 <sup>®</sup> nicht-radioaktive Zellproliferations-Untersuchung (MTT-Assay).....	28
2.2.4	Durchflusscytometrie .....	29
2.2.4.1	Übersicht .....	29
2.2.4.2	Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung .....	30
2.2.4.3	Nachweis von Apoptose und Nekrose.....	31
2.2.5	Immuncytochemie .....	32
2.2.5.1	Präparation der Melanom-Zellen für die Immunfärbung.....	32
2.2.5.2	Immunfärbung.....	33
2.2.5.3	Quantitativer Nachweis der Immunfärbung mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	34
2.2.6	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	36
2.2.6.1	Extraktion von DNA aus EDTA-Blut .....	36
2.2.6.2	Extraktion von RNA aus Blut .....	37
2.2.6.3	Extraktion von DNA und RNA aus Zellkulturen .....	39
2.2.6.4	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren .....	40
2.2.6.5	cDNA-Synthese (Reverse Transkription).....	41
2.2.6.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
2.2.6.7	Bisulfit-Konversion und Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (MS-PCR).....	44
2.2.6.8	Quantitative real time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	47
2.2.6.9	ExoSAP-IT-Verdauung .....	49
2.2.6.10	DNA-Sequenzierung.....	50

---

2.2.6.11	Primerdesign für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	52
2.2.6.12	Agarosegelelektrophorese .....	53
2.2.6.13	DNA-Extraktion aus Agarosegelfragmenten .....	53
2.2.7	Statistik .....	55
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Übersicht .....</b>	<b>56</b>
<b>3.2</b>	<b>Patienten-Untersuchungen.....</b>	<b>56</b>
3.2.1	Übersicht .....	56
3.2.2	Patienten .....	57
3.2.3	Korrelation von Ansprechen und hämatologischen Nebenwirkungen mit der Genexpression.....	57
3.2.4	Bestimmung des Promotor-Methylierungsstatus von <i>MGMT</i> , <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> .....	59
3.2.5	Bestimmung genetischer Varianten von <i>MGMT</i> , <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> .....	60
3.2.6	Korrelation von Ansprechen und hämatologischen Nebenwirkungen mit Genvarianten .....	63
<b>3.3</b>	<b>Zellkultur-Untersuchungen.....</b>	<b>65</b>
3.3.1	Übersicht .....	65
3.3.2	Sensitivitätstestung .....	65
3.3.3	Untersuchung der Genexpression von <i>MGMT</i> , <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> .....	66
3.3.4	Bestimmung des Promotor-Methylierungsstatus von <i>MGMT</i> , <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> .....	67
3.3.5	Untersuchungen der Apoptoserate mittels Durchflusscytometrie.....	69
3.3.6	Untersuchungen der Zellzyklusphasenverteilung mittels Durchflusscytometrie .....	71
3.3.7	Quantitative Bestimmung der O <sup>6</sup> -Methylguanin-Addukte .....	73
3.3.8	Untersuchung der Genexpression von <i>ABCB1</i> ( <i>MDR1</i> ) .....	75
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Übersicht .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2</b>	<b>Patienten-Untersuchungen.....</b>	<b>77</b>
4.2.1	Übersicht .....	77
4.2.2	Studien-Population .....	78
4.2.3	Ansprechen und hämatologische Nebenwirkungen in Korrelation mit der Genexpression.....	79
4.2.4	Genexpression und Promotor-Methylierung .....	80
4.2.5	Genexpression und Genvarianten .....	82
4.2.6	Ansprechen und hämatologische Nebenwirkungen in Korrelation mit den Genvarianten .....	82

---

<b>4.3</b>	<b>Zellkultur-Untersuchungen.....</b>	<b>84</b>
4.3.1	Übersicht .....	84
4.3.2	Temozolomid-Sensitivität von Melanom-Zelllinien.....	84
4.3.3	Sensitivität in Korrelation mit der Genexpression von <i>MGMT</i> , <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> .....	85
4.3.4	Promotor-Methylierungsstatus von <i>MGMT</i> , <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> in Korrelation mit Genexpression und Sensitivität .....	86
4.3.5	Zellzyklusphasenverteilung und Apoptoserate .....	87
4.3.6	O <sup>6</sup> -Methylguanin-Addukte .....	88
4.3.7	Sensitivität in Korrelation mit der Genexpression von <i>ABCB1</i> ( <i>MDR1</i> ).....	89
4.3.8	Ausblick.....	91
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>108</b>
8.1	Daten zur mRNA-Expression von <i>MGMT</i> , <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> nach Temozolomid-Behandlung von Melanom-Zelllinien (zu Kapitel 3.3.3) .....	108
8.2	Daten zur Apoptose-/Nekrose-Bestimmung (zu Kapitel 3.3.5).....	114
8.3	Daten zur mRNA-Expression von <i>ABCB1</i> nach Temozolomid- Behandlung von Melanom-Zelllinien (zu Kapitel 3.3.8).....	124
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>126</b>
<b>10</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>127</b>
10.1	Publikationen.....	127
10.2	Kongressbeiträge.....	128
10.3	Wissenschaftliche Gutachtertätigkeit.....	129
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>130</b>

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Übertragung einer Methylgruppe von Dacarbazin oder Temozolomid auf die DNA. ....	13
Abbildung 1.2: Zelluläre Antwort auf O <sup>6</sup> -Methylguanin-Schäden. ....	14
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der durchflusscytometrischen Daten. ....	31
Abbildung 2.2: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops. ....	35
Abbildung 3.1: Nachweis des Promotor-Methylierungsstatus. ....	59
Abbildung 3.2: Paarweises Kopplungsungleichgewicht der detektierten genetischen Varianten mittels HaploView 4.1. ....	62
Abbildung 3.3: Assoziation der MSH2-Genvariante rs2303428 (g.73170T>C) mit hämatologischen Nebenwirkungen und Therapie-Ansprechen. ....	64
Abbildung 3.4: Basisexpression der Gene <i>MGMT</i> , <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> in den untersuchten Melanom-Zelllinien. ....	66
Abbildung 3.5: Nachweis des Promotor-Methylierungsstatus von <i>MGMT</i> in Melanom-Zelllinien. ....	68
Abbildung 3.6: Nachweis des Promotor-Methylierungsstatus von <i>MLH1</i> in Melanom-Zelllinien. ....	69
Abbildung 3.7: Nachweis des Promotor-Methylierungsstatus von <i>MSH2</i> in Melanom-Zelllinien. ....	69
Abbildung 3.8: Analyse der Zellzyklusphasenverteilung nach Temozolomid-Behandlung. ....	73
Abbildung 3.9: Quantitative Bestimmung der O <sup>6</sup> -Methylguanin-Addukte mittels Immuncytochemie. ....	75
Abbildung 8.1: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MelA-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	114
Abbildung 8.2: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MelA-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	115



---

Abbildung 8.3: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MeIB-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	116
Abbildung 8.4: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MeIB-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	117
Abbildung 8.5: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MeIC-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	118
Abbildung 8.6: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MeIC-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	119
Abbildung 8.7: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer KAll-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	120
Abbildung 8.8: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer KAll-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	121
Abbildung 8.9: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer LIBR-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	122
Abbildung 8.10: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer LIBR-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung. ....	123

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Monochemotherapie für die Behandlung des fortgeschrittenen kutanen Melanoms (Garbe und Eigentler, 2007). .....	11
Tabelle 2.1: Einmalige Temozolomid-Gabe. ....	28
Tabelle 2.2: Fünfmalige Temozolomid-Gabe .....	28
Tabelle 2.3: Standard-PCR-Programm.....	43
Tabelle 2.4: Primer-Sequenzen, Produktlänge (Prod.) und Annealing-Temperatur (Anneal.) für PCR-Amplifikation und Sequenzierreaktion. ....	43
Tabelle 2.5: Konversion unmethylierter Cytosin-Reste zu Uracil. ....	44
Tabelle 2.6: Reaktionskomponenten für die Bisulfit-Konversion. ....	45
Tabelle 2.7: Thermocycler-Konditionen für die Bisulfit-Konversion.....	45
Tabelle 2.8: Primer-Sequenzen, Produktlänge (Prod.) und <i>Annealing</i> -Temperaturen (Anneal.) für die MS-PCR. ....	47
Tabelle 2.9: Ansatz für die quantitative <i>real time</i> PCR.....	48
Tabelle 2.10: Primer-Sequenzen und <i>Annealing</i> -Temperaturen für die quantitative <i>real time</i> PCR. ....	49
Tabelle 2.11: Sequenzieransatz.....	52
Tabelle 2.12: Programm zur Sequenzierung von DNA-Segmenten. ....	52
Tabelle 2.13: Bedingungen für das <i>Primerdesign</i> . ....	52
Tabelle 3.1: Korrelation der Genexpression peripherer Blut-Lymphozyten von Melanom-Patienten mit hämatologischen Nebenwirkungen und Therapie-Ansprechen. ....	58
Tabelle 3.2: Detektierte genetische Varianten in <i>MGMT</i> , <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> von 51 Melanom-Patienten. ....	60
Tabelle 3.3: Temozolomid-Konzentrationen, bei denen etwa die Hälfte der Zellen überlebt. ....	66
Tabelle 3.4: Tage bis zur Subkonfluenz. ....	71
Tabelle 8.1: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie MelA.....	108
Tabelle 8.2: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie MelB.....	109

---

Tabelle 8.3: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie MeIC. ....	110
Tabelle 8.4: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie KAIi. ....	111
Tabelle 8.5: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie LIBR. ....	112
Tabelle 8.6: Genexpression auf mRNA-Ebene nach einem kompletten Behandlungszyklus mit Temozolomid. ....	113
Tabelle 8.7: Genexpression von <i>ABCB1</i> auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in den Melanom-Zelllinien MeIA, MeIB und MeIC. ....	124
Tabelle 8.8: Genexpression von <i>ABCB1</i> auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in den Melanom-Zelllinien KAIi und LIBR. ....	125

## IV Abkürzungen und Anglizismen

Abkürzung bzw. <i>Anglizismus</i>	Bedeutung
$\times g$	Multipliziert mit der Erdbeschleunigung
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ABCB1	Adenosintriphosphat-bindenden Kasette B1 (ABC, <i>ATP-binding cassette</i> )
amol	Atomol
<i>Annealing</i>	Anlagern von <i>Primern</i> an einzelsträngige DNA
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
<i>Cross-Link</i>	Querverbindung
DAPI	Diamino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
<i>Efflux</i>	Ausfluss
<i>Elongation</i>	Verlängerung
<i>et al.</i>	und andere (et alii)
etc.	<i>et cetera</i> (und so weiter)
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
g	Gramm
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>	Gap 0/Gap 1/Gap 2
<i>Influx</i>	Zufluss
kb	Kilobasenpaare
<i>Kit</i>	Gebrauchsfertiges Reaktionssystem
l	Liter
M	molar [mol/l]
mA	Milliampère
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

<b>Abkürzung bzw. Anglizismus</b>	<b>Bedeutung</b>
<i>Mismatch-Reparatur</i>	Basenfehlpaarungsreparatur
ml	Milliliter
mmol	Millimol
M-Phase	Mitose-Phase
<i>Nested PCR</i>	Verschachtelte PCR
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<i>Peak</i>	Scheitelpunkte
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
pmol	Picomol
<i>Primer</i>	Oligonukleotid, das als Startpunkt DNA-replizierender Enzyme wie der DNA-Polymerase dient
<i>Primerdesign</i>	Entwurf von Primern
<i>Real time PCR</i>	Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S-Phase	Synthese-Phase
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 DNA-Reparatur Mechanismen

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA, *deoxyribonucleic acid*) ist die Trägerin der Erbinformation und ist in allen Lebewesen und DNA-Viren zu finden. Jede Zelle eines Organismus enthält einen kompletten Chromosomensatz mit der gesamten Erbinformation. Das diploide humane Genom setzt sich aus fast drei Milliarden Basenpaaren pro Chromosomensatz zusammen (Venter et al., 2001). Der Erhalt der genomischen Integrität und Genauigkeit ist für die Funktion und das Leben aller Organismen von essentieller Bedeutung. Schadhafte Veränderungen der DNA können sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein. Schäden in der DNA können spontan im Verlauf der DNA-Replikation, durch zelluläre Metabolite, Einwirken von chemischen Substanzen, UV-Strahlung, extreme Wärme oder ionisierende Strahlung entstehen. Sobald ein DNA-Schaden detektiert wird, muss die Zelle das Signal durch eine Kaskade von Phosphorylierungsschritten weitergeben, um entsprechende Schutzmaßnahmen einzuleiten. Die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden (*DNA damage response*) kann vielfältig sein; sie kann die Aktivierung einer Zellzyklus-Kontrollstelle (*checkpoint*), den Start eines transkriptionellen Programms und bei schweren Schäden die Initialisierung des programmierten Zelltodes, der Apoptose, beinhalten. Eine entscheidende Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden spielen auch die DNA-Reparatur-Mechanismen (Friedberg, 2006, Zhou und Elledge, 2000). Einer Zelle stehen eine Vielzahl an DNA-Reparatur-Mechanismen zur Verfügung, um unterschiedliche DNA-Schäden zu prozessieren. Diese Reparatur-Mechanismen sollen im Folgenden kurz dargestellt werden. Aufgrund der Komplexität der Reparatur-Mechanismen weisen sie teilweise Interaktionen und Überlappungen auf.

### 1.1.1 Direkte Reversion

Die einfachste Form der humanen DNA-Reparatur-Mechanismen ist die direkte Reversion von DNA-Schäden. Zwei Mechanismen der direkten Reparatur sind bekannt: Zum einen die Reparatur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren und

Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukten durch Photolyasen und zum anderen die direkte Reversion von DNA-Alkyl-Addukten durch die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT).

Photolyasen verfügen über einen Antennenkomplex, der entweder aus dem Pterin-Kofaktor Methylentetrahydrofolat (MTHF) oder dem Desazaflavin-Kofaktor 8-Hydroxy-5-Desazariboflavin (8-HDF) besteht. Dieser Antennenkomplex absorbiert blaues Licht oder UV-Strahlung. Mit Hilfe dieser Energie werden vom Kofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) zwei Elektronen auf den im aktiven Zentrum gebundenen DNA-Schaden übertragen. Dadurch werden DNA-Schäden ohne Herausschneiden und Einfügen von Basen repariert. Man spricht bei diesem Prozess auch von Photoreaktivierung (Sancar, 2003).

Die MGMT repariert mutagene Alkyl-DNA-Addukte (O<sup>6</sup>-Methylguanin), die zu geringen Mengen durch die Reaktion zellulärer Katabolite mit Guanin-Resten in der DNA entstehen (Sedgwick, 1997). Die MGMT transferiert die Alkylgruppe direkt vom Guanin-Rest der DNA auf einen internen Cystein-Rest (Pegg, 1990). Das inaktivierte Alkyl-MGMT-Protein wird dann in einer Ubiquitin-abhängigen Proteolyse degradiert. Die MGMT muss also neu synthetisiert werden, um die Reparatur-Fähigkeit wieder herzustellen (Catapano et al., 1987, Srivenugopal et al., 1996).

### 1.1.2 Basen-Exzisions-Reparatur (BER)

Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) wird aktiv, wenn eine Base in einem DNA-Strang eine schädliche Modifikation aufweist. Eine potentiell mutagene Base kann durch Oxidation, Methylierung, Desaminierung oder spontanen Verlust der Base selbst entstehen (Memisoglu und Samson, 2000). Die BER beginnt mit einer DNA-Glycosylase, die die N-glycosidische Bindung zwischen der modifizierten Base und dem Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA einschneidet (Seeberg et al., 1995). Dadurch wird die Base entfernt und es entsteht eine so genannte apyrimidinische/apurinische Stelle (AP-Stelle, *apyrimidinic/apurinic site*). Das verbleibende Phosphodiester-Rückgrat wird in der Folge durch eine AP-Endonuklease auf der 5'-Seite der AP-Stelle geschnitten, wodurch eine

Hydroxygruppe am 3'-Ende entsteht und am 5'-Ende ein abasischer Desoxyribose-Phosphat (dRP) verbleibt (McCullough et al., 1999). Durch die DNA-Polymerase  $\beta$  wird ein neues Nukleotid ans 3'-Ende gesetzt und der dRP entfernt (Matsumoto und Kim, 1995). Letztendlich wird der verbleibende DNA-Strangbruch durch eine DNA-Ligase geschlossen und die Integrität der DNA wieder hergestellt. Diese Reparatur durch den Austausch einer einzigen Base wird als *short-patch* Reparatur bezeichnet und repräsentiert schätzungsweise 80-90 % der BER (Matsumoto et al., 1994). Ist eine schadhafte Base resistent gegen die AP-Lyase-Aktivität der DNA-Polymerase  $\beta$ , dann kommt es zur so genannten *long-patch* Reparatur. Bei der *long-patch* Reparatur werden etwa 2-10 Nukleotide ausgetauscht. Der Austausch der Nukleotide wird hier mit Hilfe der zusätzlichen Faktoren Pol  $\delta$ , Pol  $\epsilon$ , PCNA und FEN1 durchgeführt (Frosina et al., 1996).

### 1.1.3 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) entfernt vielfältige DNA-Schäden. Die Wichtigsten sind die durch UV-Strahlung verursachten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukte. Andere NER-Substrate sind Inter- und Intrastrangverbindungen, unförmige Basen-Addukte und einige Formen oxidativer Schäden. Gemeinsam ist all diesen Schäden, dass sie eine Distorsion der DNA-Doppelhelix und chemische Modifikationen der DNA verursachen (Hess et al., 1997, Rybanska und Pirsal, 2003). Es gibt zwei verschiedene Formen der NER, die sich nur in der Schadenserkenung unterscheiden. Die globale Genom-Reparatur (GGR) erkennt und behebt Schäden in transkriptionsinaktiven Bereichen der DNA. Die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) erkennt und entfernt Schäden an der aktuell zu transkribierenden DNA (Fousteri und Mullenders, 2008, Thoms et al., 2007). Bei der GGR wird der DNA-Schaden durch den Proteinkomplex XPC/hHR23B/centrin 2 und durch XPE (DDB1-DDB2-enthaltenden E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex) erkannt. Bei der TCR wird der blockierte RNA-Polymerase II Komplex am DNA-Schaden durch Rekrutierung der Reparaturproteine CSA und CSB entfernt und die Reparaturkaskade initiiert (Fousteri und Mullenders, 2008, Shuck et al., 2008). Die weiteren Schritte sind bei beiden Reparaturwegen identisch. Der TFIIH-Komplex bindet an die DNA und rekrutiert XPA und das Replikationsprotein A (RPA), die den Schaden verifizieren.



Als nächstes wird die DNA in der Nähe des Schadens durch die Helikasen XPB und XPD entwunden. Die Endonukleasen XPG und XPF/ERCC1 schneiden den DNA-Strang mit der Schädigung in 3'- und 5'-Richtung, so dass ein 24-32 Nukleotide langes DNA-Fragment freigesetzt wird. Die entstehende Lücke in der DNA wird anschließend durch die DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$  und weiteren Faktoren wieder gefüllt und durch die DNA-Ligase I oder DNA-Ligase III PCNA-abhängig geschlossen (Shuck et al., 2008). Mutationen in den NER-Genen führen zur Ausbildung der drei seltenen autosomal-rezessiv vererbten Syndrome Xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne Syndrom (CS) und die photosensitive Form der Trichothiodystrophie (TTD) (Thoms et al., 2007).

#### 1.1.4 Basenfehlpaarungs-Reparatur (MMR)

Die Basenfehlpaarungs-Reparatur (MMR, *mismatch repair*) hat die Aufgabe, Fehler der DNA-Replikation wie Basenfehlpaarungen und kleine Einzelstrang-Schleifen, die durch Insertion oder Deletion von Basen entstehen (IDLs, *insertion/deletion loops*), zu reparieren. Fehlpaarungen, die durch spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin entstehen, und Heteroduplexe, die sich durch genetische Rekombination bilden, werden ebenfalls durch die MMR behoben (Jean et al., 1999). Die MMR wird durch zwei heterodimere Komplexe MSH2-MSH6 (MutS  $\alpha$ ) und MSH2-MSH3 (MutS  $\beta$ ) initialisiert. Der MSH2-MSH6-Komplex erkennt Basenfehlpaarungen und Einzelbasen-Schleifen, während das Heterodimer MSH2-MSH3 ILDs erkennt (Genschel et al., 1998). Nach der Schadenserkenkung bindet der heterodimere Komplex Adenosintriphosphat (ATP), erfährt eine Konformationsänderung und wandert entlang der DNA, bis er auf weitere MMR-Proteine trifft (Blackwell et al., 1998, Gradia et al., 1999). Mit einem weiteren heterodimer Komplex, MLH1-PMS2 (MutL  $\alpha$ ), und weiteren Replikations-Faktoren wird ein Proteinkomplex höherer Ordnung gebildet. Ein Teil des fehlerhaften Strangs wird durch die Exonuklease 1 herausgeschnitten und es erfolgt die erneute Synthese des entfernten DNA-Abschnittes durch die Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$ . Als weitere Faktoren beim Herausschneiden und der erneuten Synthese sind PCNA, RPA, RFC und FEL1 involviert (Marti et al., 2002). Es wird angenommen, dass die Strang-Diskriminierung durch den Kontakt der MMR-Proteine mit dem Replikations-Apparat zustande kommt (Buermeyer et al.,

1999). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, dass MLH1 und MSH2 mit dem Replikations-Faktor PCNA interagieren, gestützt (Umar et al., 1996). Defekte in diesem System führen zu erhöhten Frequenzen spontaner Mutationen und erhöhter Mikrosatelliten-Instabilität (MSI). Mutationen in mehreren MMR-Genen führen zu einer Prädisposition für das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) (Peltomaki, 2001).

### 1.1.5 Homologe Rekombination (HR)

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) sind schwere DNA-Schäden, da sie in der Transkription, Replikation und in der Chromosomen-Trennung Probleme bereiten. Fehler in der Doppelstrang-Reparatur können zu Chromosom-Instabilitäten, Fehlern in der Genexpression und zur Krebsentstehung führen (Hoeijmakers, 2001). DSB können durch Homologe Rekombination (HR) oder Nicht-homologe-Endverknüpfung (Kapitel 1.1.6) repariert werden. Die HR erfolgt hauptsächlich in der S- oder G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus, wenn ein homologes Schwester-Chromatid als Matrize zur Verfügung steht.

Durch die RAD52-Epistase-Gruppe mit RAD50, RAD51, RAD52, RAD54 und MRE11 werden gebrochene DNA-Enden erkannt und Überhänge am 3'-Ende erzeugt (Sonoda et al., 2001). RAD52 gilt als initialer Sensor für die gebrochenen DNA-Enden. Der CtIP-BRCA1-BARD1-Komplex interagiert mit dem MRE11-RAD50-NBS1 (MRN)-Komplex und hilft bei der Erzeugung von 3'-Einzelstrang-Überhängen. Die neu generierten Einzelstrang-Überhänge werden zunächst von RPA gebunden, um sekundäre Strukturen der einzelsträngigen DNA zu unterbinden. BRCA1-BARD1 begünstigt die Akkumulation von BRCA2 durch PALB2. BRCA2 wiederum rekrutiert RAD51 (Hartlerode und Scully, 2009). Sobald sich ein RAD51-Nukleoprotein-Filament gebildet hat, sucht es nach einer homologen Matrize auf dem Schwester-Chromatid. Die geschädigte DNA dringt in den homologen, ungeschädigten DNA-Duplex ein und wird durch eine DNA-Polymerase am 3'-Ende der geschädigten DNA verlängert. Durch die DNA-Ligase I werden die Enden verknüpft und der DNA-Heteroduplex wird durch Trennung der so genannten *holliday junction* wieder aufgelöst (Jackson, 2002).

### 1.1.6 Nicht-homologe-Endverknüpfung (NHEJ)

Die Nicht-homologe-Endverknüpfung (NHEJ, *Non-homologous end joining*) findet im Gegensatz zur Homologen Rekombination (Kapitel 1.1.5) vorwiegend in der G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>- und der frühen S-Phase statt und ist fehlerbehaftet, da die DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) ohne eine zur Verfügung stehende Matrize wieder zusammengefügt werden. Das Heterodimer Ku70-Ku80 bindet an die freien DNA-Enden und rekrutiert weitere Faktoren, wie die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), XRCC4 und die DNA-Ligase IV. Durch Binden an die DNA wird die DNA-PK aktiviert und rekrutiert Artemis und andere Faktoren, wie die DNA-Polymerase X, um geeignete DNA-Enden für die Ligation zu generieren (Ma et al., 2002). Abschließend werden die beiden DNA-Enden durch den XRCC4-DNA-Ligase IV-Komplex verknüpft (Grawunder et al., 1997, Hartlerode und Scully, 2009).

### 1.1.7 Transläsionale Synthese (TLS)

Die Transläsionale Synthese (TLS) kann bei der DNA-Synthese über verschiedene DNA-Schäden relativ fehlerfrei hinweg lesen. Dieser Mechanismus ermöglicht das Überleben der Zelle durch Vorantreiben der DNA-Replikation. Replikative DNA-Polymerasen werden durch Schäden in der DNA blockiert und durch spezialisierte Polymerasen ersetzt (Waters et al., 2009). Die meisten TLS spezialisierten Polymerasen sind aus der Y-Familie (REV1, Pol η, Pol ι, Pol κ) der DNA-Polymerasen (Ohmori et al., 2001). Eine weitere wichtige eukaryotische TLS-Polymerase ist Pol ξ (B-Familie). Je nach DNA-Schaden baut eine bestimmte Polymerase die korrekte Base am gegenüberliegenden Strang des Schadens ein. Die weitere Verlängerung des Strangs kann eine weitere spezialisierte Polymerase erfordern, oft Pol ξ (Takata und Wood, 2009). Das Passieren von Thymin-Thymin Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren benötigt die Polymerase η und ist unabhängig von der Polymerase ξ (Shachar et al., 2009). Wenn das Passieren eines DNA-Schadens während der S-Phase oder zum Füllen größerer Lücken erfolgt, muss die spezialisierte Polymerase wieder durch eine replikative Polymerase (Pol δ) ersetzt werden. Für den Austausch der Polymerasen scheinen posttranslationale Modifikationen wie die Monoubiquitinierung des PCNA-Proteins

an blockierten Replikationsgabeln eine Rolle zu spielen (Kannouche und Lehmann, 2004).

### 1.1.8 *Cross-Link* Reparatur

Einige chemotherapeutische Substanzen (Cisplatin, Mitomycin, Psoralen) induzieren Intrastrang-Querverbindungen in der DNA (*DNA cross-links*). In *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* werden diese Querverbindungen durch koordinierte Zusammenarbeit der Nukleotid-Exzisions-Reparatur und der Homologen Rekombination entfernt. In höheren Eukaryoten ist der Mechanismus der *Cross-Link* Reparatur noch nicht gut verstanden (Sancar et al., 2004, Sharova, 2005). Durch das Heterodimer XPF-ERCC1 und weitere Faktoren wird ein 22 bis 28 Nukleotide langes Fragment 5' von der Querverbindung entfernt (Bessho et al., 1997). Die Querverbindung und die entstandene Lücke werden in der Folge vermutlich im Zusammenspiel mit Faktoren der Homologen Rekombination entfernt und aufgefüllt. Außerdem wird der DNA-Polymerase  $\theta$  eine aktive Rolle bei der *Cross-Link* Reparatur zugesprochen (Burgers et al., 2001). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Zellen von Patienten mit Fanconi-Anämie (FA) sehr sensitiv gegenüber Intrastrang-Querverbindung induzierenden Substanzen sind. Ein FA-Komplex (FANC-A, -C, -E, -F) zusammen mit dem MRN-Komplex und BRCA1-BRCA2 scheinen sowohl an der *Cross-Link* Reparatur als auch an der Homologen Rekombination beteiligt zu sein (D'Andrea und Grompe, 2003).

## 1.2 Hautkrebs

### 1.2.1 Übersicht

Hautkrebs bezeichnet jegliche Art bösartiger Veränderungen der Haut. Je nach entarteter Zelle unterscheidet man verschiedene Hautkrebsarten. Die häufigsten Hautkrebsarten sind das Basalzellkarzinom, das Plattenepithelkarzinom (auch Stachelzellkarzinom) und das maligne Melanom. In der Summe stellen die drei genannten Hautkrebsarten die häufigsten malignen Tumoren des Menschen überhaupt dar (Garbe und Blum, 2001, Jemal et al., 2006).

### 1.2.2 Das Basalzellkarzinom und das Plattenepithelkarzinom

Die Hautkrebsarten, Basalzellkarzinom und Plattenepithelkarzinom, gehen aus epidermalen Keratinocyten hervor. Keratinocyten produzieren Keratin und sind der häufigste Zelltyp in der *Epidermis* (Oberhaut). Während sie von der untersten (Basalschicht, *stratum basale*) zur obersten Schicht (Hornschicht, *stratum corneum*) der *Epidermis* wandern, differenzieren sie sich zu Korneozyten (Hornzellen) aus. Keratinocyten bilden im Gegensatz zu Melanocyten kein Pigment, daher werden Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome vor allem in der englischsprachigen Literatur als so genannte nicht-melanocytäre Hautkrebse (*non-melanoma skin cancer*) bezeichnet. Die weltweite altersadjustierte Inzidenz-Rate nicht-melanocytärer Hautkrebse liegt bei etwa 66/100 000 pro Jahr für Männer und bei etwa 50/100 000 pro Jahr für Frauen, wobei das Basalzellkarzinom den deutlich größeren Anteil ausmacht (Katalinic et al., 2003). Es gibt allerdings große regionale Unterschiede; so ist die Inzidenz in Australien deutlich höher (1 000-2 000/100 000 pro Jahr) als in Europa (86/100 000 pro Jahr) (Diepgen und Mahler, 2002). Als Ursache für die Entstehung von nicht-melanocytären Hauttumoren gilt ein direkter Zusammenhang mit der Sonnenexposition als belegt (Greinert, 2009). Über 80 % der nicht-melanocytären Hautkrebse entstehen in Sonnenlicht exponierten Hautarealen (Buettner und Raasch, 1998, Kraemer et al., 1994). Interessanterweise zeigen auch Xeroderma pigmentosum-Patienten, die ein Defekt in der Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden besitzen und deshalb schon im Kindesalter maligne Melanome, Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome entwickeln, dieselbe anatomische Verteilung von nicht-melanocytären Hauttumoren wie die allgemeine Bevölkerung (Kraemer et al., 1994).

### 1.2.3 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom entsteht durch Entartung von Melanocyten und ist eine bösartige und im fortgeschrittenen Stadium äußerst aggressiv wachsende Tumorerkrankung. Melanocyten sind pigmentbildende Zellen, die sich in der Basalschicht (*stratum basale*) der *Epidermis* befinden. Sie synthetisieren Melanin und geben dieses in Form von so genannten Melanosomen an die sie umgebenden Keratinocyten ab. Melanin wandelt 99,9 % der Strahlungsenergie

von UV-Strahlung in Wärme um und stellt daher einen wichtigen Schutz der Haut gegenüber der UV-Strahlung dar (Meredith und Riesz, 2004). Die weltweit altersadjustierte Inzidenz-Rate des malignen Melanoms liegt bei etwa 10/100 000 pro Jahr für Männer und bei etwa 12/100 000 pro Jahr für Frauen (Katalinic et al., 2003). Die Inzidenz des malignen Melanoms liegt damit deutlich unter der von nicht-melanocytären Hauttumoren, ist aber in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen. Sie steigt sogar stärker an als die Inzidenz von allen anderen malignen Tumoren in der hellhäutigen Bevölkerung (Armstrong und Kricger, 1994, Jemal et al., 2005, Rigel et al., 1996). Das Auftreten des malignen Melanoms ist stark abhängig von der Hautfarbe und geografischen Region. Bei dunkelhäutigen Ethnizitäten liegt die Inzidenz unter 1/100 000 pro Jahr, bei hellhäutigen Kaukasiern hingegen bei bis zu 50/100 000 pro Jahr und in manchen Regionen der Welt sogar noch höher (Diepgen und Mahler, 2002, MacLennan et al., 1992). Die mittlere Überlebenszeit von Patienten, bei denen sich bereits Fernmetastasen gebildet haben (Patienten im Stadium IV der Erkrankung), beträgt 8,1 Monate, die Wahrscheinlichkeit fünf Jahre zu überleben 2 % (Lee et al., 2000). Das einjährige Überleben liegt unter 20 % (Keilholz et al., 2001). Im Gegensatz zum Basalzellkarzinom und Plattenepithelkarzinom, für die die chronisch-kumulative lebenslange UV-Exposition als Ursache gilt, gelten für das maligne Melanom eine Kombination aus einer konstitutionellen Prädisposition und Umwelteinflüsse als Risikofaktoren. Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines Melanoms ist die Anzahl an melanocytären Nävi (Muttermale). Das Auftreten von dysplastischen Nävi ist ein weiterer wichtiger Risikofaktor (Garbe und Eigentler, 2007, Holly et al., 1987). Personen mit hundert oder mehr Nävi, von denen fünf oder mehr dysplastisch sind, haben ein etwa fünfzigfach erhöhtes Risiko an malignem Melanom zu erkranken (Garbe et al., 1994). Moderate UV-Exposition und die Anzahl der Nävi der Eltern erhöhen das Risiko von Kindern melanocytäre Nävi zu entwickeln, und damit das Melanom-Risiko (Wiecker et al., 2003). Akute sporadische UV-Exposition erhöht ebenfalls das Risiko einer späteren Melanom-Erkrankung (Bauer et al., 2005, Pfahlberg et al., 2001, Walter et al., 1999). Die anatomische Verteilung der Melanome zeigt, dass neben der UV-Exposition weitere Faktoren eine wichtige Rolle bei der Melanom-Entstehung spielen. Nur etwa 20 % der Melanome liegen in den UV-exponierten Hautarealen wie Kopf, Hals und Handrücken (Kraemer et al., 1994). Ein ähnliches, diffuses

Verteilungsmuster der Melanome am Körper trifft auch auf Xeroderma pigmentosum-Patienten zu. Diese Patienten entwickeln bereits in der Kindheit aufgrund eines DNA-Reparaturdefektes für UV-induzierte DNA-Schäden maligne Melanome, aber nur zu 34 % in den UV-exponierten Hautarealen (Kraemer et al., 1994).

### 1.3 Therapie des kutanen Melanoms

Der Krankheitsverlauf von Patienten mit kutanem Melanom wird in vier Stadien unterteilt. Bei einer Dicke des primären Tumors von  $\leq 1$  mm handelt es sich um Stadium I. Ins Stadium II fallen alle Patienten mit einer Dicke des primären Tumors von  $>1$  mm und ohne Metastasen. Patienten mit regionalen Metastasen (Mikro- und Makrometastasen) werden als Stadium III klassifiziert und Patienten, die bereits Fernmetastasen aufweisen, fallen in die Gruppe der Stadium IV Melanom-Patienten (Garbe und Eigentler, 2007).

Standardtherapie des kutanen Melanoms ist die Exzision (operatives Herausschneiden) des Tumors. Bei inoperablen Primärtumoren oder dem metastasierten Melanom besteht praktisch keine kurative Therapieintervention. Für inoperable Tumoren ist die Strahlentherapie indiziert (Garbe et al., 2008b). Als adjuvante Therapie von Stadium II- und Stadium III-Patienten wurden verschiedene Behandlungen wie Chemotherapie, unspezifische Immuntherapie und Interferon-Behandlung untersucht. Zuträgliche Ergebnisse wurden aber lediglich mit Interferon  $\alpha$  erzielt (Garbe und Eigentler, 2007, Veronesi et al., 1982). Eine Meta-Analyse mit mehr als 6 000 Patienten hat eine signifikante Verlängerung des rückfallfreien Überlebens nachgewiesen. Sogar ein geringer Vorteil für das Gesamtüberleben nach 5 Jahren (3 %) konnte gezeigt werden (Wheatley et al., 2007). Eine systemische Chemotherapie oder Chemoimmuntherapie bei der Behandlung des kutanen Melanoms ist indiziert bei inoperabel wiederkehrenden Tumoren, inoperablen regionalen Metastasen und beim Auftreten von Fernmetastasen (Stadium IV) (Garbe et al., 2008a). Eine palliative Monochemotherapie kann das Tumorwachstum stoppen oder den Tumor schrumpfen lassen und damit eine Reduktion der tumorbedingten Symptome herbeiführen. Hierfür stehen eine Reihe von Substanzen zur Verfügung, von



denen keine einen signifikanten Vorteil für ein verlängertes Überleben zeigen konnte (Tabelle 1.1) (Garbe und Eigentler, 2007).

**Tabelle 1.1: Monochemotherapie für die Behandlung des fortgeschrittenen kutanen Melanoms (Garbe und Eigentler, 2007).**

Medikament	Dosis	Ansprechrate (%)
Dacarbazin (5 x)	250 mg/m <sup>2</sup> i.v. täglich für 5 Tage alle 3-4 Wochen	12,1-17,6
Dacarbazin (1 x)	800-1 200 mg/m <sup>2</sup> i.v. einmal an einem Tag alle 3-4 Wochen	5,3-23
Temozolomid	150-200 mg/m <sup>2</sup> p.o. täglich für 5 Tage alle 4 Wochen	13,5-21
Fotemustin	100 mg/m <sup>2</sup> i.v. an Tag 1, 8 und 15; dann 5 Wochen Pause, dann einmalige Dosis alle 3 Wochen	7,4-24,2
Vindesin	3 mg/m <sup>2</sup> i.v. alle 2 Wochen	12-26
Interferon- $\alpha$	9-18 Millionen IU/m <sup>2</sup> s.c. 3 mal pro Woche	13-25
Interleukin-2	600 000 IU/kg als 15minütige Infusion i.v. alle 8 Std. für 15 Tage (insgesamt 14 Dosen). Alle 2 Wochen wiederholen	16-21,6

i.v.=intravenös, IU=Internationale Einheiten, p.o.=oral, s.c.=subkutan.

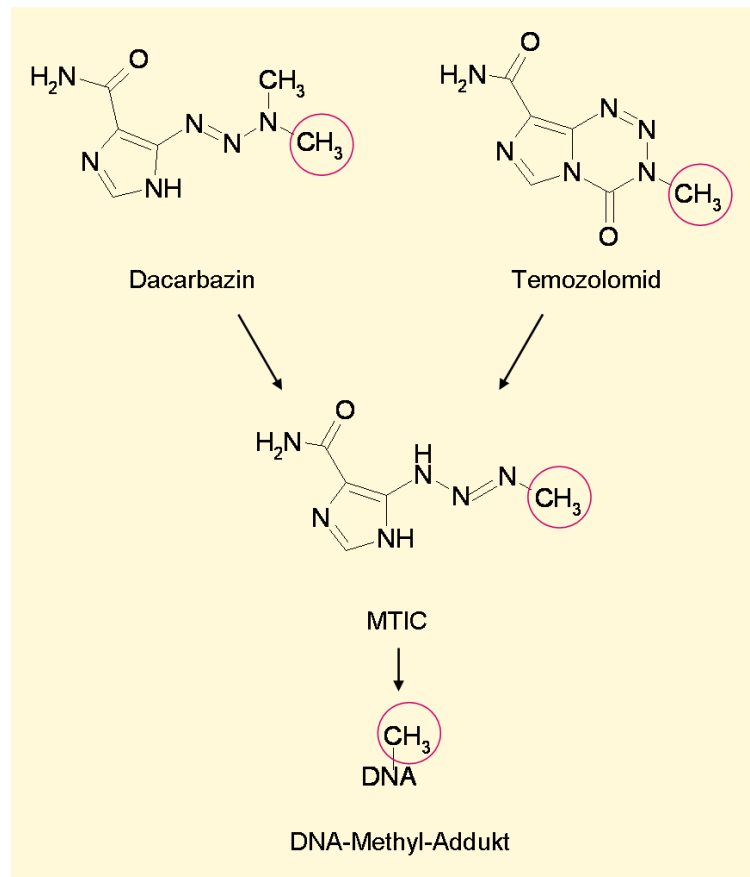
Die Ansprechraten der Substanzen kann durch Kombination mit Cytokinen verbessert werden, führt aber nicht zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens (Eigentler et al., 2003). Auch die Kombination mehrerer Chemotherapeutika untereinander (Polychemotherapie) oder mit Cytokinen (Polychemoimmuntherapie) führt gelegentlich zu besserem Ansprechen der Therapie, ohne aber das Überleben zu verlängern. Im Vergleich zur Monochemotherapie ist die Toxizität durch die Kombination signifikant erhöht (Garbe et al., 2008b).

#### **1.4 Wirkmechanismus der Chemotherapeutika Dacarbazin und Temozolomid**

Dacarbazin wird als Standardtherapie für Patienten mit inoperablem und metastasiertem Melanom betrachtet. Die alternative Substanz Temozolomid wirkt



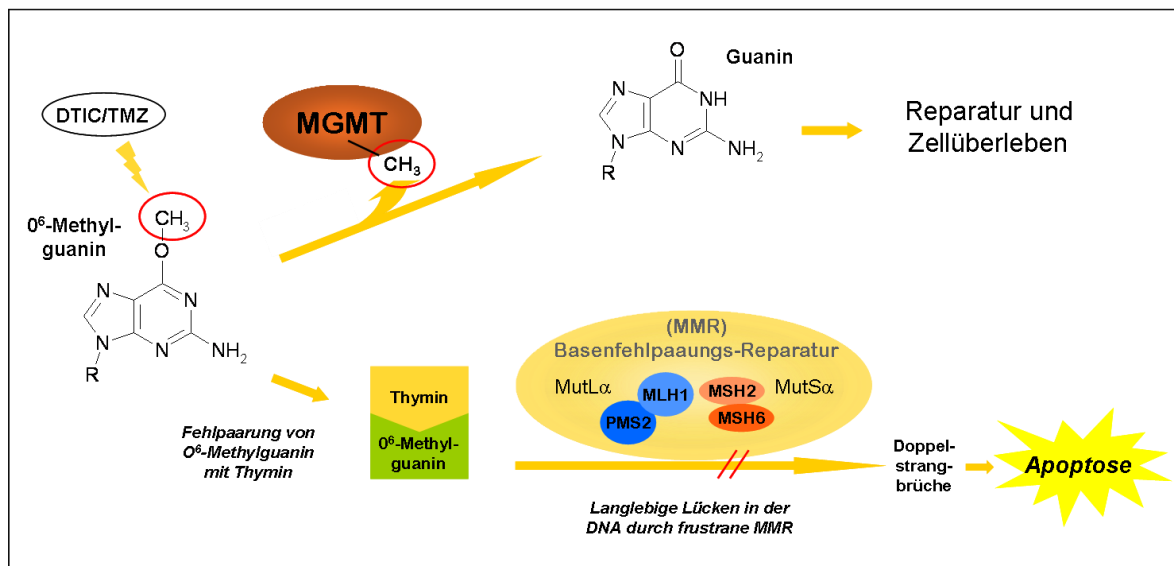
über den gleichen molekularen Mechanismus wie Dacarbazin und erreicht ähnliche Ansprechraten. Mit Dacarbazin oder Temozolomid als Monochemotherapie können Ansprechraten von bis zu 20 % erreicht werden (Garbe und Eigentler, 2007, Middleton et al., 2000, Serrone et al., 2000). Beide Chemotherapeutika sind Vorstufen (*prodrugs*) der cytotoxischen Substanz 5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid (MTIC) (Serrone et al., 2000, Stevens et al., 1987). Während Dacarbazin in der Leber aktiv zu MTIC umgesetzt werden muss, zerfällt Temozolomid bei physiologischen pH-Werten spontan. Die Halbwertszeit von Temozolomid in wässriger Lösung (pH 7 oder pH 7,4) liegt zwischen 74 und 110 Min. während die Halbwertszeit von MTIC zwischen 2 und 8 Min. liegt (Stevens et al., 1987). MTIC ist alkylierend und generiert Methyl-DNA-Addukte (Abbildung 1.1). Mindestens 70 % dieser DNA-Schäden entstehen an N<sup>7</sup>-Guanin, 9,2 % an N<sup>3</sup>-Adenin und 5 % an O<sup>6</sup>-Guanin. Während die DNA-Schäden an N<sup>7</sup>-Guanin und N<sup>3</sup>-Adenin sehr instabil sind und durch Hydrolyse schnell zerfallen oder sehr effizient durch das Basen-Exzisions-Reparatursystem repariert werden, verbleiben die O<sup>6</sup>-Methylguanin-Schäden in der DNA. Der Bildung von O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukten kommt damit eine entscheidende Rolle für die cytotoxische Wirkung von Dacarbazin und Temozolomid zu (Newlands et al., 1997, Stojic et al., 2004).



**Abbildung 1.1: Übertragung einer Methylgruppe von Dacarbazin oder Temozolomid auf die DNA.** Die Chemotherapeutika Dacarbazin und Temozolomid sind Vorstufen der cytotoxischen Substanz 5-(3-Methyltriazen-1-yl)imidazol-4-carboxamid (MTIC). MTIC ist alkylierend und generiert Methyl-DNA-Addukte. Die roten Kreise markieren die Methylgruppe, die auf die DNA übertragen wird.

O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte können durch das DNA-Reparatur-Enzym O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) repariert werden (Abbildung 1.2). Die MGMT überträgt die Methylgruppe vom Guanin auf einen internen Cystein-Rest des Enzyms (Pegg, 1990). Diese Reaktion ist auto-inaktivierend, die MGMT muss also neu synthetisiert werden, um die Reparatur-Fähigkeit wieder herzustellen (Catapano et al., 1987, Newlands et al., 1997, Srivenugopal et al., 1996). Wird die Methylgruppe an der O<sup>6</sup>-Position von Guanin nicht durch die MGMT entfernt, kommt es in der folgenden Replikation zu einer Fehlpaarung von O<sup>6</sup>-Methylguanin mit Thymin anstelle von Cytosin. Diese Guanin-Thymin Fehlpaarungen werden normalerweise durch das Basenfehlpaarungs-Reparatur (MMR)-System korrigiert. Die MMR entfernt einen Teil des neu synthetisierten DNA-Strangs inklusive des Thymins gegenüber von O<sup>6</sup>-Methylguanin, wodurch es zu einer Lücke in der DNA kommt (Karran, 2001). Diese Lücke wird durch Neusynthese wieder gefüllt. Da O<sup>6</sup>-Methylguanin aber im Matrizen-Strang

verbleibt, wird erneut Thymin inkorporiert. Diese frustranen Reparaturversuche, das heißt das wiederholte Ausschneiden und Neusynthetisieren, resultieren in langlebigen Lücken in der DNA (Karran et al., 1993). Aus diesen Lücken entstehen in der folgenden S-Phase Doppelstrangbrüche, die wiederum eine Signalkaskade initiieren, die in einem G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Arrest in der zweiten Replikationsrunde resultieren. Dem Zellzyklus-Arrest folgt entweder die Apoptose, eine mitotische Katastrophe (*mitotic catastrophe*) oder ein Seneszenzähnlicher Zustand (Alvino et al., 2006, Kaina et al., 2007, Roos et al., 2004). Daraus ist abzuleiten, dass ein gutes Ansprechen auf eine Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie abhängig ist von einer niedrigen direkten Reversion durch die MGMT und einer hohen MMR Aktivität (Abbildung 1.2) (Kaina et al., 2007).



**Abbildung 1.2: Zelluläre Antwort auf O<sup>6</sup>-Methylguanin-Schäden.** Dacarbazin (DTIC) oder Temozolomid (TMZ) induzieren O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte. Die Methylgruppe ist durch einen roten Kreis markiert. O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte können durch die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) repariert werden. Wird die Methylgruppe an der O<sup>6</sup>-Position von Guanin nicht durch MGMT entfernt, kommt es in der folgenden Replikation zu einer Fehlpaarung von O<sup>6</sup>-Methylguanin mit Thymin anstelle von Cytosin. Durch frustrane Fehlpaarungs-Reparatur (MMR) entstehen langlebige Lücken in der DNA. In der Folge entstehen Doppelstrangbrüche und Apoptose wird induziert.

## 1.5 Prädiktive Biomarker für das maligne Melanom

Biomarker sind entweder Tumor- oder konstitutive Faktoren, die mit dem biologischen Verhalten des Tumors und der Prognose für den Patienten korrelieren. Die wichtigsten prognostischen Marker fasst das *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) in seiner TNM-Klassifizierung (T=primär Tumor,

N=regionäre Lymphknoten, M=Fernmetastasen) zusammen (Mohr et al., 2009). Die so genannte Breslow-Tumordicke und die Invasionstiefe des Tumors (*Clark level*) sind die am besten etablierten prognostischen Marker für Melanome zum Zeitpunkt der primären Diagnose. Die Tumordicke nach Breslow ist eine histologische Klassifikation, um die Stadien eines malignen Melanoms und die daraus abgeleitete Prognose zu beurteilen (Garbe und Eigentler, 2007). Im Gegensatz zum *Clark-Level* wird die Tumordicke nach Breslow unabhängig von der Invasion verschiedener Hautschichten ermittelt. Bei dickeren Tumoren (>1 mm) sind zusätzliche Informationen über den Status des so genannten Wächter-Lymphknotens hilfreich. Der Status des Wächter-Lymphknotens, ob er bereits von Metastasen befallen ist oder nicht, ist eine der wichtigsten Informationen für die Entscheidung einer adjuvanten Therapie (Gogas et al., 2009). Ein weiterer wichtiger, unabhängiger, prognostisch ungünstiger Marker ist die Ulzeration des primären Tumors. Auch die Anzahl an Lymphknoten-Metastasen und die Trennung von Lungen-Metastasen von anderen viszeralen Metastasen werden für die TNM-Klassifizierung herangezogen. Als einziger prognostischer Serum-Marker wurde eine erhöhte Laktat-Dehydrogenase (LDH) als negativ prognostischer Faktor mit in die TNM-Klassifizierung aufgenommen (Mohr et al., 2009). Neben LDH wurden aber noch eine Reihe anderer Faktoren im Serum untersucht und als prognostische Biomarker vorgeschlagen. Der am besten untersuchte Faktor ist S100B, das in hohen Serum-Konzentrationen als negativer prognostischer Marker gilt (Gogas et al., 2009). In der modernen personalisierten Medizin wird verstärkt versucht, individuelle molekulare Marker zu definieren, um genauere Aussagen zur Prognose des Patienten oder zum Ansprechen auf eine bestimmte Therapie machen zu können. Dazu werden unter anderem Genexpressions-Analysen durchgeführt, genetische Varianten untersucht und auch epigenetische Faktoren wie der Promotor-Methylierungsstatus bestimmter Gene, analysiert. In einer Expressionsstudie primärer Melanome konnte zum Beispiel eine Korrelation der Tumordicke mit der Expression bestimmter Gene im Tumor gezeigt werden (Winnepeninckx et al., 2006). In dickeren Tumoren war die Expression von Genen, die in die DNA-Reparatur, den Zellzyklus, die Protein-Faltung, die Chromatinorganisation oder in Hitze-Schock-Protein-Aktivität involviert sind, erhöht. Im Gegenzug waren Gene der Serin-Typ-Endopeptidase Inhibitor-Aktivität, der Zell-Adhäsion, Zell-Zell-

Kommunikation und der Transkriptionsfaktor-Aktivität niedriger exprimiert (Winnepenninckx et al., 2006). Die Hypermethylierung von CpG-Inseln in Kombination mit einer globalen DNA-Hypomethylierung ist als epigenetisches Muster aus vielen Tumor-Zellen bekannt und gilt daher als Merkmal von Krebs-Zellen (Laird, 2005). Für das Melanom konnten bis zu 50 Gene gezeigt werden, die durch Hypermethylierung der Promotor-Region stillgelegt waren (Rothhammer und Bosserhoff, 2007). Die Verwendung prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine bestimmte Melanom-Therapie ist bisher noch nicht sehr umfangreich untersucht worden. Nur recht wenige Daten stehen hierzu zur Verfügung. Eine potentielle Korrelation konnte zwischen der Ulzeration und dem Ansprechen auf pegyliertes Interferon  $\alpha$ -2b gezeigt werden (Eggermont et al., 2008), zwischen Serum LDH und Ansprechen auf Oblimersen (Bedikian et al., 2006) und zwischen Autoantikörpern und dem Ansprechen auf Interferon (Gogas et al., 2006). In Schleimhaut-Melanomen scheint eine aktivierende Mutation von *c-kit* die Sensitivität des Kinase-Inhibitors Imatinib vorherzusagen (Hodi et al., 2008). Zudem wurde gezeigt, dass die häufigste *BRAF*-Mutation, V600E, mit dem Ansprechen auf die Behandlung mit dem MEK-Kinase-Inhibitor AZD6244 assoziiert ist (Dummer et al., 2008). Da das generelle Therapie-Ansprechen beim Melanom sehr gering ist, bleibt die Suche nach Patientengruppen, die von einer bestimmten Therapie profitieren könnten, weiterhin sehr wichtig.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ansprechen von Patienten mit kutanem Melanom im Stadium IV auf eine Chemotherapie mit Dacarbazin oder Temozolomid ist äußerst gering. Die Vorhersage, welche Patienten von einer solchen Therapie profitieren könnten, ist bisher noch schwer möglich. Daher kommt den prädiktiven Biomarkern für die Entscheidung für oder gegen eine Therapie mit Dacarbazin oder Temozolomid eine entscheidende Rolle zu. Zurzeit steht kein Tumor-unabhängiger prädiktiver Marker für Nebenwirkungen und Ansprechen einer solchen Chemotherapie zur Verfügung.

Durch die Analyse der Genexpression, Genvarianten und des Promotor-Methylierungsstatus der essentiellen DNA-Reparaturgene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* in peripheren Blut-Lymphocyten von Stadium IV-Melanom-Patienten sollten in der vorliegenden Arbeit konstitutive Marker für Nebenwirkungen und Ansprechen einer Therapie mit Dacarbazin oder Temozolomid identifiziert werden.

Zur weiteren Aufklärung der Wirk- und Resistenz-Mechanismen von Temozolomid bei der Behandlung des kutanen Melanoms sollten in Zellkultur-Experimenten die Sensitivität und molekulare Resistenz-Mechanismen von Melanom-Zelllinien gegenüber Temozolomid in zwei verschiedenen Behandlungsschemata untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
<b>PCR, real time PCR</b>	
Geldokumentationsanlage: Fluo-Link UV-Tisch, BioDoc Controller, BioDoc CCD-Kamera	Biometra, Göttingen
LightCycler	Roche, Mannheim
Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Thermocycler UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
<b>Zentrifugen</b>	
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Sigma Typ 1-15	Sigma, Osterode am Harz
<b>Zellkultur</b>	
CO <sub>2</sub> Incubator MCO-18AIC(UV)	Sanyo, München
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Sterilbank Tecnoflow	Integra Bioscience, Fernwald
<b>Mikroskope</b>	
Axio Imager.M1	Zeiss, Jena
Axiovert 100	Zeiss, Jena
<b>Sonstiges</b>	
ABI-Prism <sup>®</sup> Sequenziergerät (Modell 310 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems, Forster City, USA
BD FACSCanto <sup>™</sup> II	Becton-Dickinson; Heidelberg
DU <sup>®</sup> 640 Spectrophotometer	Beckman, Fullerton, CA, USA
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Partec PAS-III	Partec, Münster
pH-Meter	Schütt, Göttingen

Geräte	Hersteller
Photometer Dynatech MR5000	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
Waage BP2100, MC1	Sartorius, Göttingen

Einweg-Artikel sowie technische Geräte die oben nicht aufgelistet sind, wurden von folgenden Firmen erworben: Eppendorf (Hamburg), Schütt (Göttingen), Greiner (Frickenhäuser), Qiagen (Hilden), Brand (Wertheim), Becton-Dickinson (Heidelberg), Squarix (Marl) und Sarstedt (Nümbrecht).

### 2.1.2 Elektronische Datenverarbeitung und Datenbanken

Programm, Datenbank	Herkunft
310 Genetic Analyzer Data Collection Software v3.1	Applied Biosystems, Forster City, USA
Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems GmbH, München
AxioVision 3.0	Zeiss, Jena
BD FACSDiva™	Becton-Dickinson, Heidelberg
BioLinx 2.0	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
CoreIDRAW®9	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
DNA Sequencing Analysis Software v5.2	Applied Biosystems, Forster City, USA
HaploView	Whitehead Institute for Biomedical Research Cambridge, MA, USA
HapMap Datenbank	<a href="http://www.hapmap.org">www.hapmap.org</a>
ImageJ	NIH, USA, ( <a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a> )
ISIS™/Draw 2.1.4	MDL Information Systems, Hayward, CA, USA
LightCycler LCDA Version 3.5.28	Roche, Mannheim
MS Office	Microsoft, USA
NCBI-Datenbank	NCBI, Bethesda, USA <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Partec FloMax	Partec, Münster
Primer3 Input (v.0.4.0)	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</a>
Reference Manager 11	Thomson ResearchSoft, New York, USA
SPSS Version 12.0 für Windows	SPSS Inc., Chicago, USA
Staden Package (Sequenzanalyse)	<a href="http://staden.sourceforge.net">staden.sourceforge.net</a>
WinList™ Version 3.0	Verity Software House, Inc., ME, USA



### 2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Chemikalie	Hersteller
Amphotericin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Borsäure ( $H_3BO_3$ )	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid ( $CaCl_2$ )	Merck, Darmstadt
DAPI (Antifading Mounting Medium)	Squarix, Marl
Dinatriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	Roth, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut (99,8 %)	Th. Geyer, Renningen
Ethidiumbromid (1 %)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Ameresco, Solon, OH, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Merck, Darmstadt
Ladepuffer (Loading Dye 5 x)	Qiagen, Hilden
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )	Merck, Darmstadt
Methanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
NuSieve <sup>®</sup> 3:1 Agarose	Cambrex, Rockland, ME, USA
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pepsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Proteinase-K	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNase A	Roche, Mannheim
RPMI 1640 mit Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Saccharose	Merck, Darmstadt

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
SeaKem <sup>®</sup> LE Agarose	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Taq-DNA-Polymerase (recombinant)	Fermentas, St. Leon-Rot
Temozolomid	Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	Merck, Darmstadt
Zweifach destilliertes Wasser (Millipore-Anlage)	Sartorius, Göttingen
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

#### 2.1.4 Lösungen und Puffer

##### **Alkali-Lösung:**

2,8 g NaOH (70 mM), 8,2 g NaCl (140 mM) auf 1 l zweifach destilliertes H<sub>2</sub>O  
Lagerung bei Raumtemperatur

##### **BSA 1 % (w/v) in 1 × PBS:**

0,1 g BSA in 10 ml 1 × PBS (autoklaviert)

Die Lösung wurde nochmals steril filtriert und bei 4 °C gelagert

##### **Magermilchpulver 5 % in PBS:**

2,5 g Magermilchpulver; 50 ml PBS

Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt

##### **Phosphate Buffered Saline (1 × PBS):**

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,2)

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert

**PBS-Glycin-Lösung 0,2 % (w/v):**

2 g Glycin/1 l PBS

Lagerung bei Raumtemperatur

**PBS-Tween-Lösung 0,25 % (v/v):**

2,5 ml Tween20/1 l PBS

Lagerung bei Raumtemperatur

**Pepsin-Lösung 80 µg/ml:**

4 mg/1 ml zweifach destilliertes H<sub>2</sub>O. Von dieser Pepsin-Lösung 40 µl vorlegen, mit 1920 µl zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O und 40 µl 1M HCl auffüllen

Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt

**Probenauftragspuffer für Agarosegelelektrophorese 5 × konzentrierte Stammlösung:**

50 % (w/v) Saccharose; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 0,2 % EDTA (v/v) (pH 7,5)

Lagerung bei -20 °C

**Proteinase-K-Puffer:**

2,42 g Tris/HCl, pH 7,5 (20 mM), 294 mg CaCl<sub>2</sub> (2 mM) auf 1 l H<sub>2</sub>O

Lagerung bei Raumtemperatur

**Proteinase-K-Stammlösung 1 mg/ml:**

1 mg Proteinase-K/1 ml Proteinase-K-Puffer

Lagerung bei -20 °C

**RNase A-Stammlösung:**

1 mg/1 ml zweifach destilliertes H<sub>2</sub>O

Lagerung bei -20 °C

**TBE-Puffer (1 ×)**

10,8 g Tris, 5,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) auf 1 l H<sub>2</sub>O

Lagerung bei Raumtemperatur

**Trypsin-Lösung (ohne EDTA):**

Zur Ablösung adhärenter Melanom-Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen wurde 0,05 % Trypsin (w/v) in PBS gelöst

Lagerung bei -20 °C

**2.1.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (Kits)**

Reaktionssystem	Hersteller
AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit	Genscript, Piscataway, NJ, USA
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
EpiTect® Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
ExoSAP-IT	USB Corporation, Cleveland, OH, USA
PAXgene™ Blood RNA Tubes und PAXgene™ Blood RNA Kit	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz
QIAmp® DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect® SYBR® Green Kit	Qiagen, Hilden
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot

**2.1.6 Antikörper****2.1.6.1 Primärantikörper**

Freundlicherweise überlassen von PD Dr. Thomale (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Duisburg-Essen)

Anti-O<sup>6</sup>-meG EM-2-3, monoclonal, aus Maus (50 µg/ml)

**2.1.6.2 Sekundärantikörper**

Firma Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (USA)/Dianova (Hamburg)

Ziege anti-Maus IgG (H+L), mit Cy<sup>TM</sup>3 konjugiert

### **2.1.7 Humane Melanom-Zelllinien**

Alle Zelllinien (MeIA [MM-358], MeIB [MM-201], MeIC [MM-254], KAII, LIBR) sind humane Melanom-Zellen, die aus Lymphknoten-Metastasen verschiedener Patienten gewonnen wurden. Alle Zelllinien sind adhärent wachsend und werden unter identischen Bedingungen kultiviert (Poot et al., 1992, Schulten et al., 2002, Soruri et al., 1998).

### **2.1.8 Zellkulturmedien**

#### **RPMI-Medium:**

RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurde bei 4 °C gelagert. Vor dem Einsatz des Mediums zur Kultivierung von Melanom-Zelllinien wurde dem Medium fötales Kälberserum (FCS), Penicillin-Streptomycin und Amphotericin zugesetzt, so dass sich eine Endkonzentration von 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin und 1 % (v/v) Amphotericin ergab.

#### **Einfriermedium:**

RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurde mit 40 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) und 20 % (v/v) DMSO versetzt und bei -20 °C gelagert.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Patienten**

In die prospektive klinische Studie wurden 51 Kaukasier aus Deutschland, die an histopathologisch bestätigtem, chirurgisch nicht entfernbarem, metastasiertem kutanen Melanom (Stadium IV) erkrankt waren, eingeschlossen. Der Einschluss erfolgte mit dem zustimmenden Votum der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen. Die Rekrutierung der Patienten wurde multizentrisch an der Medizinischen Hochschule Hannover, Universitätsmedizin Freiburg, Universitätsmedizin Rostock und an der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte zwischen 2002 und 2007 bei Patienten, die entweder mit Dacarbazin oder mit Temozolomid behandelt wurden. Bei der

Blutentnahme wurde darauf geachtet, dass sie vor der Therapie oder in einem Therapie-freien Intervall durchgeführt wurde. Zur Klassifizierung in die Kategorien komplette Remission, partielle Remission, stabiler Krankheitsverlauf und progredienter Krankheitsverlauf wurden die Kriterien für klinisches Ansprechen der Welt-Gesundheits-Organisation verwendet (World Health Organization, 1979). Patienten mit kompletter Remission, partieller Remission und stabilem Krankheitsverlauf wurden als Ansprecher zusammengefasst und Patienten mit progredientem Krankheitsverlauf als Nicht-Ansprecher bezeichnet. Hämatologische Nebenwirkungen wurden nach den allgemeinen Terminologie-Kriterien für unerwünschte Ereignisse (*Common Terminology Criteria for Adverse Events*, CTCAE v3.0) bestimmt. Die untersuchten Parameter für hämatologische Nebenwirkungen waren Thrombozytopenie (<150/nl), Leukopenie (<4,0/nl) und erniedrigte Hämoglobin-Werte (<11,5 g/dl für Frauen, <13,5 g/dl für Männer). Abweichungen in weniger als einem dieser untersuchten Parameter wurden als begrenzte hämatologische Nebenwirkungen, Abweichungen in zwei oder drei Parametern als erhöhte hämatologische Nebenwirkungen definiert. Alle Patienten haben nach Aufklärung über die Studie schriftlich ihr Einverständnis erklärt. Die ethischen Prinzipien der medizinischen Forschung mit Human-Material wurden nach der Deklaration von Helsinki befolgt (Declaration of Helsinki, 2000).

## **2.2.2 Zellkultur**

### *2.2.2.1 Das Kultivieren humaner Melanom-Zelllinien*

Die Kultivierung der humanen Tumor-Zelllinien wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dies wurde zum einen durch das Arbeiten unter einer Sterilbank gewährleistet, zum anderen durch das Verwenden autoklavierter beziehungsweise steril filtrierter Lösungen und durch die Nutzung von ausschließlich für das Arbeiten mit Zellkulturen bestimmtem Arbeitsgerät. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) kultiviert.

Es wurden ausschließlich adhärent wachsende Melanom-Zellen kultiviert. Für die meisten aus Gewebe stammenden Zelllinien ist die Adhäsion die Voraussetzung für ihre Proliferation. Adhärent wachsende Zellen wachsen als Einzelschicht auf

dem Boden der Zellkulturflasche. Die Zellkulturen werden in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf aufgetaut und in Kultur gebracht (siehe Kapitel 2.2.2.5).

#### 2.2.2.2 *Das Passagieren und Ernten humaner Melanom-Zelllinien*

Sobald die adhärent wachsenden Melanom-Zellen den Boden der Zellkulturflasche nahezu vollständig bedeckt hatten, wurden sie passagiert oder für Experimente geerntet. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen und aufbewahrt. Noch verbleibende Medium-Reste wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Dann wurde etwa 1 ml/25 cm<sup>2</sup> Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02 % w/v) auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation der Zellen für 1-5 Min. bei 37 °C wurden sie durch vorsichtiges Abklopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Zur Hemmung der Trypsinaktivität wurde das aufbewahrte, fötales Kälberserum (FCS) enthaltende RPMI-Medium zurück zu den Zellen gegeben. Sollten die Zellen passagiert und nicht geerntet werden, wurde an dieser Stelle nicht das aufbewahrte Medium, sondern frisches Medium verwendet. In dem kompletten RPMI-Medium sind Proteaseinhibitoren enthalten, die das Trypsin hemmen. Die Zellsuspension wurde 5 Min. bei 188 x g (1 000 upm, Megafuge 1.0R, Heraerus, Hanau) sedimentiert und in komplettem RPMI-Medium aufgenommen. Für die Weiterkultivierung wurde pro 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche etwa ein Fünftel der Zellen in 15 ml komplettem RPMI-Medium aufgenommen. Zellen, die geerntet werden sollten, wurden in der Folge je nach geplantem Experiment unterschiedlich behandelt.

#### 2.2.2.3 *Zellzählung*

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden 10 µl der Zellsuspension abgenommen und mit 90 µl Trypanblau (0,4 % w/v) gemischt. Von dieser Suspension wurden wiederum 10 µl abgenommen und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Jena) wurden die Zellen in 4 mal 16 Quadraten gezählt. Die Zelldichte der Ausgangszellsuspension wurde nach folgender Formel berechnet: Zellzahl in 4 x 16 Quadraten x 2500 x 10 (Verdünnung) x Volumen der Zellsuspension [ml] = Zellen/ml.

#### 2.2.2.4 *Kryokonservierung von Melanom-Zelllinien*

Zur dauerhaften Aufbewahrung vitaler Zellen wurden Stammkulturen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden 0,5 ml kaltes Einfriermedium (Kapitel 2.1.8) auf Eis in ein Kryoröhrchen vorgelegt und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml komplettem RPMI-Medium dazu gegeben. Die Kryoröhrchen wurden gut verschlossen und in einer Isopropanolbox über Nacht bei  $-70\text{ °C}$  gelagert. Durch die Isopropanolbox wird langsames Einfrieren ( $-1\text{ °C/Min.}$ ) gewährleistet. Ab dem Folgetag wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff ( $-196\text{ °C}$ ) gelagert.

#### 2.2.2.5 *Revitalisierung von kryokonservierten Melanom-Zelllinien*

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen können jederzeit wieder in Zellkultur gebracht werden. Dazu wurden zunächst 10 ml komplettes RPMI-Medium in einem 15 ml-Röhrchen und 6 ml in eine  $25\text{ cm}^2$  Gewebekulturflasche vorgelegt. Ein Kryoröhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und schnell unter fließendem Wasser aufgetaut. Bevor die Zellen in das vorbereitete 15 ml-Röhrchen gegeben wurden, wurde das Kryoröhrchen gründlich mit 70 %igem Ethanol gesäubert. Durch fünfminütiges Zentrifugieren bei  $188 \times g$  ( $1\ 000\text{ upm}$ , Megafuge 1.0R, Heraerus, Hanau) wurden die Zellen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml komplettem RPMI-Medium aufgenommen und in die vorbereitete Gewebekulturflasche gegeben. Im Brutschrank ( $\text{CO}_2$  Incubator MCO-18AIC(UV), Sanyo, München) wurden die Zellen bei  $37\text{ °C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert.

#### 2.2.2.6 *Behandlung von Melanom-Zelllinien mit Temozolomid*

Bei allen Zellkulturexperimenten wurden die Zellen bereits 24 Std. vorher ausgesät, um ihnen genügend Zeit zu geben, am Boden des Gefäßes zu adhären. Temozolomid wurde vor jedem Experiment frisch in DMSO gelöst und mit frischem, komplettem RPMI-Medium auf die Zellen gegeben. Für die Behandlung der Zellen mit Temozolomid wurden zwei Behandlungsschemata verfolgt. Für die einfache Gabe wurden die Zellen einmal mit Temozolomid behandelt und für 5 Tage inkubiert (Tabelle 2.1). Das zweite Behandlungsschema bezieht sich auf die aktuelle Praxis in der Klinik, in der Melanom-Patienten an 5



aufeinander folgenden Tagen mit Temozolomid behandelt werden (Tabelle 2.2). Nach 5 Tagen wurde bei beiden Behandlungsschemata frisches Medium ohne Temozolomid auf die Zellen gegeben. Für die Sensitivitätstestung wurde weitere 2 Tage später die Vitalität der Zellen bestimmt (Kapitel 2.2.3). Kontrollzellen wurden mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel (DMSO) ohne Temozolomid behandelt.

**Tabelle 2.1: Einmalige Temozolomid-Gabe.**

Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9
Aussäen	TMZ	-	-	-	-	Medium	-	MTT-Assay

TMZ=Temozolomid, MTT-Assay=Zellproliferations-Untersuchung (Kapitel 2.2.3).

**Tabelle 2.2: Fünfmalige Temozolomid-Gabe.**

Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9
Aussäen	TMZ	TMZ	TMZ	TMZ	TMZ	Medium	-	MTT-Assay

TMZ=Temozolomid, MTT-Assay=Zellproliferations-Untersuchung (Kapitel 2.2.3).

### 2.2.3 CellTiter 96<sup>®</sup> nicht-radioaktive Zellproliferations-Untersuchung (MTT-Assay)

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen nach Behandlung mit Temozolomid wurde ein *CellTiter 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTT-Assay, Promega, Madison, USA) durchgeführt. Die Vitalität wurde über die Aktivität der Succinatdehydrogenase, einer mitochondrialen Dehydrogenase, bestimmt. Der *CellTiter 96<sup>®</sup> Assay* basiert auf der Konversion des Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in ein blaues Formazan-Produkt, welches mittels eines Platten-Lesegeräts leicht detektiert werden kann. Während einer vierstündigen Inkubation wird die Tetrazolium-Komponente einer Färbelösung von vitalen Zellen in ein Formazan-Produkt umgesetzt. Durch die anschließende Zugabe einer Stopplösung wird das Formazan Produkt stabilisiert. Bei einer Wellenlänge von 570 nm wird dann die Absorption bestimmt. Das Verhältnis der Menge der Formazan-Bildung in behandelten Zellen zur Menge der Formazan-Bildung in unbehandelten Zellen, ermöglicht eine Aussage über die Vitalität der Zellen (Produktinformation von Promega, Madison, USA).

Für diesen *CellTiter 96*<sup>®</sup> Assay wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well ( $4 \times 10^5$  Zellen pro Well der Zelllinie MeIC) in 100  $\mu$ l RPMI-Medium ausgesät. Nach der Adhäsion am Boden der Platte über Nacht wurden die Zellen fünf Tage mit Temozolomid behandelt. Dann wurde das Temozolomid-enthaltende Medium abgezogen und die Zellen konnten noch zwei weitere Tage in frischem, Temozolomid-freiem Medium wachsen, bevor 15  $\mu$ l Färbelösung ins Medium gegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von 4 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das gebildete Formazan durch Zugabe von 100  $\mu$ l Stopplösung stabilisiert. Am Folgetag wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm die Absorption mittels eines Platten-Lesegeräts (Dynatech MR5000, Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bestimmt. Die Höhe der Absorption im Vergleich zu der Absorption einer unbehandelten Kontrolle (Zugabe des Lösungsmittels DMSO ohne Temozolomid) gibt Aufschluss über den prozentualen Anteil überlebender Zellen nach Behandlung mit Temozolomid. Zur Bestimmung der Temozolomid-Konzentrationen, bei der 50 % der Zellen überleben, wurden für jede Zelllinie in beiden Behandlungsschemata (Kapitel 2.2.2.6) verschiedene Temozolomid-Konzentrationen (40  $\mu$ M-1600  $\mu$ M) ausgetestet. Jedes Experiment wurde drei- bis fünfmal mit jeweils n=4 wiederholt.

## 2.2.4 Durchflusscytometrie

### 2.2.4.1 Übersicht

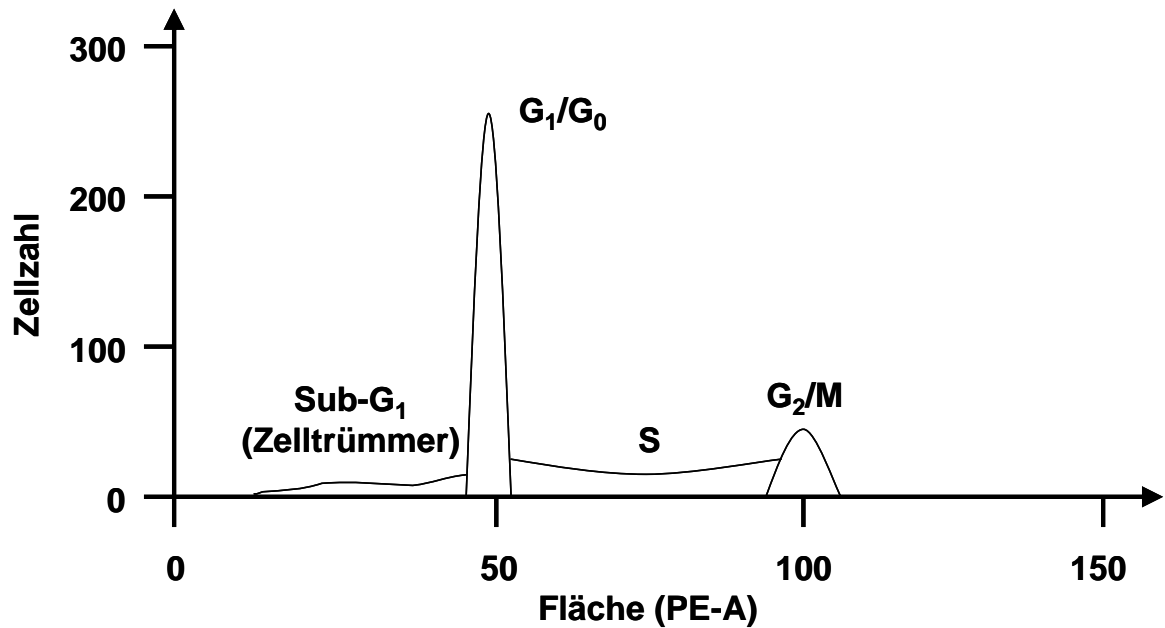
Das Prinzip der Durchflusscytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden in Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle streut dabei Licht (Streulicht), welches durch Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst wird. Zur Einteilung der Zellen in unterschiedliche Fraktionen dienen zwei Parameter: Das Vorwärtstreulicht wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße, während das Seitwärtstreulicht durch Brechung des Lichts hervorgerufen wird und als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns etc.) dient. Anhand des Vorwärtstreulichtes und des Seitwärtstreulichtes können die Zellen also nach ihrer Größe und Granularität sortiert werden. Auch von Fluoreszenzfarbstoffen

emittiertes Licht kann detektiert werden. So können mit der DNA interkalierende Farbstoffe wie DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) und Propidiumiodid eingesetzt werden, um den DNA-Gehalt von Zellen zu bestimmen. Auch Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, können genutzt werden, um Zielzellen zu markieren.

#### *2.2.4.2 Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung*

Die Durchflusscytometrie wurde genutzt, um die Verteilung einer Zellpopulation auf die verschiedenen Zellzyklusphasen zu untersuchen. Anhand des DNA-Gehalts einer Zelle ist ein Rückschluss auf die Phase im Zellzyklus, in der sich die Zelle gerade befindet, möglich. Bei der Messung einer asynchron proliferierenden Zellpopulation ergibt sich ein Verteilungsmuster der Zellen, welches für die Anteile der entsprechenden Zellpopulationen an den einzelnen Phasen des Zellzyklus typisch ist.

Hier wurde das FACS Canto II (Becton-Dickinson, Heidelberg) verwendet und jeweils 10 000 Zellen, bei denen die DNA mit Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gefärbt war, gemessen. Diese Zellzahl entspricht einer Größenordnung, die eine statistische Aussage über die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Phasen im Zellzyklus ermöglicht. Bei der durchflusscytometrischen Messung wird nicht nur die Intensität des fluoreszierenden Signals gemessen, sondern auch dessen Weite. Diese ist notwendig, um bei der Präparation auftretende Aggregate detektieren und bei der Auswertung der Messdaten ausschließen zu können. Aus dem Integral über Signalintensität und Signalweite ergibt sich ein als Fläche bezeichneter Wert. Dieser Flächenwert wird als Abszissenwert gegen die Zahl der Ereignisse pro Messkanal aufgetragen. Bei einer asynchron proliferierenden Zellpopulation liegen die Werte für Zellkerne der G<sub>1</sub>- und G<sub>0</sub>-Phase im Bereich von etwa 50 Flächeneinheiten. Die G<sub>2</sub>-/M-Phase-Werte liegen bei etwa dem doppelten Flächenwert (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der durchflusscytometrischen Daten. Der Flächenwert wird gegen die Zellzahl pro Kanal aufgetragen. Dargestellt ist eine typische Zellzyklusphasenverteilung einer asynchron proliferierenden Zellpopulation.

Für die Durchflusscytometrie wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen geerntet, in 500  $\mu$ l sterilem PBS resuspendiert und in ein 3 ml kaltes Ethanol enthaltendes Messröhrchen gegeben. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugieren ( $400 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 Min.; Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau) sedimentiert. Sofort nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet über Kopf an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 425  $\mu$ l sterilem PBS aufgenommen und mit 50  $\mu$ l RNase (1 mg/ml) und 25  $\mu$ l Propidiumiodid versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen durch ein Sieb gegeben. Dadurch wurden die Zellen vereinzelt und die Bildung von Zellaggregaten vermieden. Anschließend wurde die Probe im Durchflusscytometer gemessen. Die Auswertung der Messergebnisse wurde mit der *BD FACSDiva*<sup>TM</sup> (Becton-Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

#### 2.2.4.3 Nachweis von Apoptose und Nekrose

Für den Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer Zellpopulation wurde ein *Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit* (Genscript, Piscataway, NJ, USA) verwendet und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. In der frühen Phase der Apoptose kehren sich die meisten Phosphatidylserine von der inneren

Oberfläche zur äußeren Oberfläche der Zellen. An der äußeren Zelloberfläche kann das Annexin V-EGFP Fusionsprotein an die Phosphatidylserine binden und somit die apoptotischen Zellen markieren. Das grün fluoreszierende Protein EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*, absorbiert Licht im blauen Spektralbereich und emittiert energieärmeres Licht im grünen Wellenlängenbereich. Der mit der DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid kann nur die Membran von nekrotischen oder spät-apoptotischen Zellen passieren und damit die Nukleinsäure dieser Zellen markieren. Es kann auf diese Weise also das Verhältnis von normalen Zellen, apoptotischen Zellen und nekrotischen beziehungsweise spät-apoptotischen Zellen bestimmt werden (Produktinformation der Firma Genscript, Piscataway, NJ, USA).

Es wurden etwa  $5 \times 10^5$  adhärent wachsende Zellen mit Trypsin ohne EDTA geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und dann in 500  $\mu$ l Binde-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 5  $\mu$ l Annexin V-EGFP und 5  $\mu$ l Propidiumiodid zugegeben und die Probe jeweils durch Vortexen gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5-15 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen durch ein Sieb gegeben. Dadurch wurden die Zellen vereinzelt und die Bildung von Zellaggregaten vermieden. Abschließend wurde die Probe im Durchflusscytometer (Partec PAS-III, Partec, Münster) gemessen. Für die Auswertung der Messergebnisse wurde die *Software WinList™ Version 3.0* (Verity Software House, Inc., ME, USA) verwendet.

## 2.2.5 Immuncytochemie

### 2.2.5.1 Präparation der Melanom-Zellen für die Immunfärbung

Die Immuncytochemie wurde zum quantitativen Nachweis von O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukten nach Behandlung von Melanom-Zellen mit Temozolomid verwendet. Einen Tag vor der Behandlung mit Temozolomid wurden  $3 \times 10^5$  Zellen in 35 mm Petrischalen ausgesät. Alle Zelllinien wurden mit der gleichen Konzentration Temozolomid (800  $\mu$ M) behandelt. Kontrollen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurden

Zellen geerntet, um später die Zu- und Abnahme der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte verfolgen zu können. Jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen wurden dann in 10  $\mu$ l PBS auf einen beschichteten Objektträger (ImmunoSelect<sup>®</sup> Adhäsions-Objektträger, Squarix, Marl) gegeben und bei Raumtemperatur getrocknet. Die adhäsive Beschichtung der Adhäsions-Objektträger vereinigt unterschiedliche Bindungsprinzipien mit natürlichen Oberflächenstrukturen von Zellen und verankert diese dadurch dauerhaft auf der Glasoberfläche. Die Zellen verlieren dabei weder ihre Antigenität noch ihre Funktionalität (Produktinformation der Firma Squarix, Marl). In diesem Zustand konnten die Proben bis zur Immunfärbung bei -20 °C gelagert werden.

### 2.2.5.2 Immunfärbung

Für die Immunfärbung wird die Spezifität von Antikörpern genutzt, um ihre Antigene sichtbar zu machen. Werden Zellen mit Antikörpern inkubiert, binden die Antikörper an die passenden Antigene. Zum Nachweis der Bindung werden sekundäre Antikörper verwendet, die an den ersten (primären) Antikörper binden und mit einem Fluorochrom konjugiert sind. Wird das Fluorochrom mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, so emittiert es Licht einer anderen Wellenlänge. Die Verwendung von sekundären Antikörpern dient als Signalverstärkung. Die primären Antikörper sind bezüglich ihrer Herkunft und Spezifität so zu wählen, dass sie sich gegen eine andere als ihrer Herkunftsspezies richten, die sekundären Antikörper so, dass sie sich gegen die Herkunftsspezies der primären Antikörper richten. Die Zellmembranen der zu untersuchenden Zellen müssen zunächst mit einem Detergenz (z.B. Pepsin, Proteinase-K, Triton X-100) permeabilisiert werden, um das Eindringen der Antikörper in das Cytosol beziehungsweise in den Zellkern zu ermöglichen. Um zu verhindern, dass es zwischen den Antikörpern und den Zellen zu unspezifischen Bindungen kommt, werden die unspezifischen Bindestellen der Zellen mit Proteinen abgesättigt, man spricht von blocken. Häufig verwendete Blocker sind Milchpulver und Albumin. Freie Aldehydgruppen werden durch Glycin geblockt.

Hier wurden die Zellproben auf den Objektträgern für die Immunfärbung zunächst mit einem Fettstift (PAP-Pen, Dako, Hamburg) umrandet und dann für 30 Min. in Methanol bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden die Objektträger für 5 Min. bei

Raumtemperatur in PBS gewaschen und dann die Zellen für 5 Min. bei 0 °C in einer Alkali-Lösung (Kapitel 2.1.4) denaturiert. Die Alkali-Lösung wurde vorher frisch mit 40 % (v/v) Methanol versetzt. Nach erneutem Waschen mit PBS für 5 Min. bei Raumtemperatur wurden 100 µl einer Pepsin-Lösung (Kapitel 2.1.4) auf die Zellen pipettiert und für 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Der Fettrand verhinderte ein Verlaufen der Lösung. Die Objektträger wurden erneut für 5 Min. bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen, dann 100 µl einer Proteinase-K-Lösung (40 µg/ml, Kapitel 2.1.4) auf die Zellen pipettiert und für 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Darauf folgte ein Waschschriff mit einer PBS/Glycin-Lösung (Kapitel 2.1.4) für 10 Min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch 30 Min. Inkubation bei Raumtemperatur in 5 %iger Magermilch-Lösung (Kapitel 2.1.4) geblockt. Der primäre Antikörper (Anti-O<sup>6</sup>-meG EM-2-3, Kapitel 2.1.6.1) wurde 1:6 000 in 1 % BSA verdünnt, jeweils 100 µl auf die Zellen pipettiert und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Objektträger erst 5 Min. in PBS-Tween-Lösung (Kapitel 2.1.4) und dann 5 Min. in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden erneut mit einer 5 %igen Magermilch-Lösung geblockt. Anschließend wurden 100 µl des sekundären Antikörpers (Ziege anti-Maus IgG, mit Cy<sup>TM</sup>3 konjugiert, 1:100 in 1 % BSA, Kapitel 2.1.6.2) auf die Zellen gegeben und für 1 Std. bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Objektträger wurden nochmal für 5 Min. in PBS-Tween-Lösung und dann 5 Min. in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Schließlich wurde etwas DAPI-Lösung (*Antifading Mounting* Lösung mit DAPI, Squarix, Hamburg) auf die Zellen getropft und ein Deckgläschen vorsichtig darauf gelegt. Das DAPI diente dazu, die DNA und damit die Zellkerne anzufärben. Nachdem das Deckgläschen mit Nagellack fixiert wurde, konnten die Proben mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

#### 2.2.5.3 *Quantitativer Nachweis der Immunfärbung mittels Fluoreszenzmikroskopie*

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zur quantitativen Auswertung Temozolomid-induzierter O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte verwendet. Fluoreszenzmikroskope sind ähnlich wie gewöhnliche Lichtmikroskope aufgebaut. Das Licht in einem Fluoreszenzmikroskop wird von einer Quecksilberlampe erzeugt und muss zwei

Filter passieren (Abbildung 2.2). Der erste Filter, der Anregungsfilter, den das Licht von der Quecksilberlampe zum Objekt durchqueren muss, lässt nur die Wellenlänge durch, die den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff anregt. Dieses Licht trifft auf das Objekt und dort, wo es auf den Fluoreszenzfarbstoff trifft, wird langwelligeres, energieärmeres Licht emittiert. Das emittierte Licht passiert nun den zweiten Filter, den Emissionsfilter, bevor es das Okular und in der Folge das Auge des Betrachters erreicht. Licht, das nicht von dem Fluoreszenzfarbstoff emittiert wird, wird vom Emissionsfilter blockiert. Zu jedem nachzuweisenden Fluoreszenzfarbstoff mit einem spezifischen Absorptions- und Emissionsspektrum gehört also ein passender Filtersatz aus zwei Sperrfiltern und einem dichroitischen (zweifarbigen) Spiegel. Der dichroitische Spiegel fungiert dabei als Strahlteiler, der das kurzwelligere Licht, welches vom verwendeten Farbstoff absorbiert wird, auf das Objekt reflektiert, während er das emittierte Fluoreszenzlicht passieren lässt.

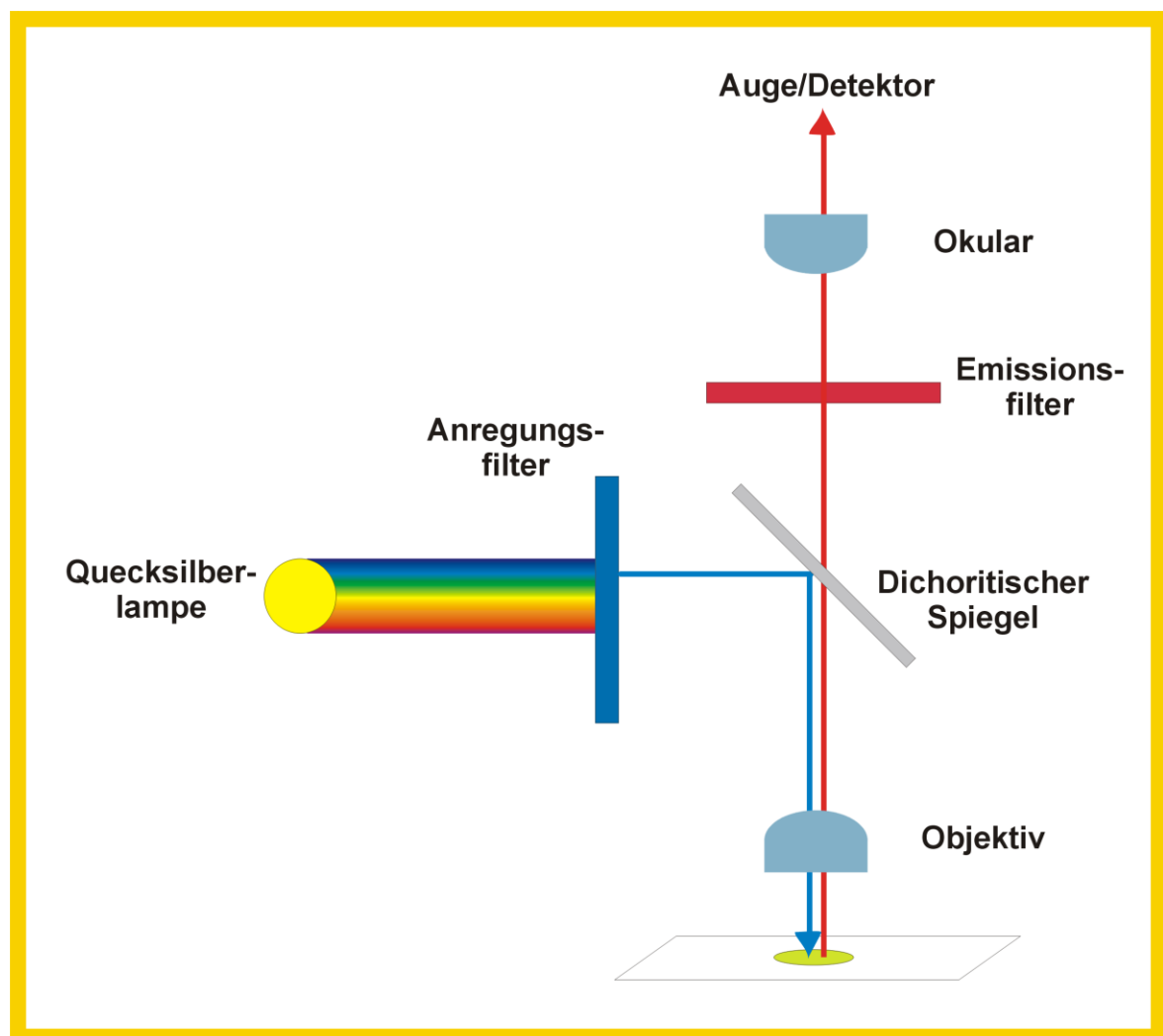


Abbildung 2.2: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.



Von jeder Probe der mittels Immunfluoreszenz gefärbten Zellen wurden an zwei unterschiedlichen Stellen auf dem Objektträger jeweils Bilder der DAPI-Färbung und der Immunfärbung erstellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Belichtungszeit unverändert blieb, um eine quantitative Auswertung der Signalintensitäten zu ermöglichen. Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgte mit Hilfe der *Software ImageJ*. Zunächst wurden anhand der DAPI-Färbung die Zellkern-Bereiche als „Bereich von Interesse“ (*region of interest*, ROI) festgelegt und anschließend in diesem Bereich die Intensität des DAPI-Signals und die Intensität des Fluoreszenz-Signals des Cy3-konjugierten sekundären Antikörpers bestimmt. Je Probe wurden etwa 100 Zellkerne in die Messung einbezogen. Durch Division des DAPI-Signals durch das Cy3-Signal konnte die relative Menge der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte bestimmt werden. Abschließend wurden noch die Werte der Kontrollen von den behandelten Proben subtrahiert, um Hintergrund-Fluoreszenz auszuschließen.

## 2.2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.2.6.1 Extraktion von DNA aus EDTA-Blut

Für die Extraktion von DNA aus EDTA-Blut wurde ein Nukleinsäurereinigungs-Kit (*QIAmp DNA Blood Kit*, Qiagen, Hilden) verwendet und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Mittels einer Protease werden die Zellen lysiert. Dann wird das Gemisch auf eine Säule aufgetragen, so dass die DNA an die Silica-Gel-Membran der Säule binden kann. Durch die bestimmten Salz- und pH-Konditionen wird sichergestellt, dass Proteine und andere Kontaminierungen, welche eine folgende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stören können, nicht von der Membran zurückgehalten werden. Durch zwei verschiedene Waschpuffer werden dann alle restlichen Kontaminierungen entfernt. Die aufgereinigte DNA wird schließlich mit einem Puffer AE (10 mM Tris-Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0) von der Membran gelöst und eluiert.

Zur Extraktion der DNA aus EDTA-Blut wurden 20 µl einer Protease-Lösung (20 mg/ml) in einem 1,5 ml Reagiergefäß vorgelegt und mit 200 µl EDTA-Blut vermischt. Es folgte die Zugabe von 200 µl Puffer AL, die Probe wurde durch

Vortexen für 15 Sek. gemischt, kurz zentrifugiert und für 10 Min. bei 56 °C im Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100 %) wurde die Probe erneut durch Vortexen für 15 Sek. gemischt und kurz zentrifugiert. Dann wurde das gesamte Volumen auf eine QIAamp Spin Säule gegeben. Die Säule wurde 1 Min. bei 6 000 × *g* zentrifugiert (8 000 upm, Sigma Typ 1-15, Sigma, Osterode am Harz). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Reagiergefäß gestellt. Anschließend erfolgte der erste Waschschrift durch Zugabe von 500 µl Puffer AW1, 1-minütiges Zentrifugieren und Verwerfen des Durchflusses. Für den zweiten Waschschrift wurde der Puffer AW2 verwendet, die Säule 2 Min. bei 15 000 × *g* (13 000 upm, Sigma Typ 1-15, Sigma, Osterode am Harz) zentrifugiert und wieder wurde der Durchfluss verworfen. Durch wiederholtes Zentrifugieren bei 15 000 × *g* für 2 Min. wurde die Säule getrocknet und Pufferreste entfernt. Die Säule wurde dann in ein neues, steriles 1,5 ml Reagiergefäß gestellt und es wurden 200 µl Puffer AE zugegeben. Vor der abschließenden Zentrifugation für 1 Min. bei 6 000 × *g* wurde die Säule für 1 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Durchfluss waren 3-12 µg genomische DNA enthalten, die direkt für die PCR eingesetzt werden konnte.

#### 2.2.6.2 Extraktion von RNA aus Blut

Für die Extraktion von RNA aus Blut wurden Blutentnahmeröhrchen (*PAXgene™ Blood RNA Tubes*, PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz) und ein Nukleinsäurereinigungs-Kit (*PAXgene™ Blood RNA Kit*, PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz) verwendet und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Blutentnahmeröhrchen enthalten einen Zusatzstoff, der das Gentranskriptionsprofil *in vivo* durch Reduktion des RNA-Zerfalls *in vitro* und Minimierung der Geninduktion stabilisiert. Die Verwendung dieser Blutentnahmeröhrchen gemeinsam mit dem Nukleinsäurereinigungs-Kit ermöglicht eine exakte Detektion und quantitative Bestimmung von Gentranskripten. Zunächst werden Proteine in einen Proteinase K enthaltenen Puffer verdaut und Zelltrümmer durch Zentrifugieren entfernt. Der Überstand wird auf eine Säule gegeben, so dass die RNA an eine Silica-Gel-Membran der Säule binden kann. Durch drei Waschschriffe wird die RNA aufgereinigt und schließlich mit einem

Puffer von der Membran gelöst und eluiert (Produktinformation der Firma PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz).

Zur Extraktion von RNA wurden 2,5 ml Blut direkt in ein Blutentnahmeröhrchen entnommen. Sofort nach der Blutentnahme wurden die Röhrchen 8-10-mal leicht geschwenkt und zunächst bei 4 °C und später bei -20 °C gelagert. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und für mindestens zwei weitere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Zelllyse sicherzustellen. Die Blutentnahmeröhrchen wurden für 15 Min. bei 755 × g zentrifugiert (2 000 upm, Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau) und der Überstand verworfen. Dann wurden 5 ml RNase freies Wasser dazugegeben, das Röhrchen mit einem neuen Hemograd-Verschluss verschlossen und das Sediment durch Vortexen resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 Min. bei 755 × g wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 360 µl BR1 Puffer durch Vortexen gelöst. Die Probe wurde in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt, 300 µl BR2 Puffer und 40 µl Proteinase K zugefügt und durch Vortexen vermischt. In einem Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) wurde die Probe dann für 10 Min. bei 55 °C und 1 400 upm inkubiert, bevor sie für 3 Min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert (Sigma Typ 1-15, Sigma, Osterode am Harz) wurde. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß gegeben und es wurde 350 µl 96-100 %iger Ethanol zugefügt. Nach kurzem Vortexen wurde die Probe für 1-2 Sek. bei  $\leq 1\,000 \times g$  zentrifugiert ( $\leq 3\,000$  upm, Sigma Typ 1-15, Sigma, Osterode am Harz), eine Säule in ein 2 ml Röhrchen gestellt und 700 µl des Überstands auf eine Säule gegeben. Die Säule wurde für 1 Min. bei  $\geq 9\,000 \times g$  ( $\geq 10\,000$  upm, Sigma Typ 1-15, Sigma, Osterode am Harz) zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, die restliche Probe (Überstand) auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säule erst mit 700 µl BR3 Puffer und dann mit 500 µl BR4 Puffer gewaschen. Der letzte Waschschrift mit 500 µl BR4 Puffer wurde noch einmal wiederholt, dieses Mal wurde die Säule aber für 3 Min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß gesetzt und 40 µl BR5 Puffer direkt auf die Membran pipettiert. Durch Zentrifugieren für 1 Min. bei  $\geq 9\,000 \times g$  wurde die RNA eluiert. Um eine höhere Ausbeute an RNA zu erzielen, wurden nochmals 40 µl BR5 Puffer auf die

Membran pipettiert und erneut zentrifugiert. Zur Denaturierung der RNA wurde die Probe für 5 Min. bei 65 °C im Thermomixer inkubiert und danach sofort auf Eis gelagert.

### 2.2.6.3 Extraktion von DNA und RNA aus Zellkulturen

Zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellkulturen wurde ein Nukleinsäurereinigungs-Kit (*AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit*, Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dieser *Kit* ist speziell dafür ausgelegt, genomische DNA und die gesamte RNA gleichzeitig aus einer Probe aufzureinigen. Zellproben werden zuerst in einem stark denaturierenden Guanidin-isothiocyanat Puffer, der sofort DNasen und RNasen inaktiviert, lysiert und homogenisiert. Die Zellysate werden dann zunächst auf eine Säule gegeben, an welche die DNA bindet. Diese Säule in Kombination mit einer hohen Salzkonzentration erlaubt eine selektive und effiziente Bindung genomischer DNA. Dem Durchfluss wird Ethanol zugesetzt, um geeignete Bindungsbedingungen für RNA zu schaffen. Dann wird der Durchfluss auf eine weitere Säule gegeben, an die die RNA bindet. Nach Waschen der Säulen mit Wasch-Puffern können schließlich aufgereinigte DNA beziehungsweise RNA von den Säulen eluiert werden (Produktinformation der Firma Qiagen, Hilden).

Für die gleichzeitige Extraktion von DNA und RNA aus Zellkulturproben wurden  $3-5 \times 10^6$  Zellen geerntet, in 350 µl RLT Puffer (1 % v/v β-Mercaptoethanol) lysiert und bei -70 °C bis zur Aufreinigung gelagert. Die gefrorenen Zellysate wurden bei 37 °C aufgetaut und solange inkubiert, bis alle Salze wieder gelöst waren. Die homogenisierten Lysate wurden dann auf eine AllPrep DNA Säule gegeben und in einem 2 ml Sammelgefäß für 30 Sek. bei  $9\,000 \times g$  (10 000 upm, Sigma Typ 1-15, Sigma, Osterode am Harz) zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gestellt und bis zur weiteren Aufreinigung bei Raumtemperatur gelagert. Der Durchfluss wurde mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt, durch Pipettieren gemischt und in eine RNeasy Säule überführt. In einem 2 ml Sammelgefäß wurde die Säule für 15 Sek. bei  $9\,000 \times g$  zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen wurden zunächst 700 µl RW1 Puffer auf die RNeasy Säule gegeben, für 15 Sek. bei  $9\,000 \times g$  zentrifugiert und der Durchfluss

verworfen. Dann wurden 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben, für 15 Sek. bei 9 000 × g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Als letzter Waschschrift wurden erneut 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben, für 2 Min. bei 9 000 × g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die RNeasy Säule wurde in ein 1,5 ml RNase-freies Reagiergefäß gestellt, 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert und 1 Min. bei 9 000 × g zentrifugiert, um die aufgereinigte RNA zu eluieren. Zum Waschen der DNA wurden 500 µl AW1 Puffer auf die AllPrep DNA Säule gegeben, für 15 Sek. bei 9 000 × g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. In einem zweiten Waschschrift wurden 500 µl AW2 Puffer auf die Säule gegeben, für 2 Min. bei 18 000 × g (14 000 upm, Sigma Typ 1-15, Sigma, Osterode am Harz) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die AllPrep DNA Säule wurde in ein 1,5 ml Reagiergefäß gestellt, 100 µl EB Puffer direkt auf die Membran pipettiert, 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich 1 Min. bei 9 000 × g zentrifugiert, um die aufgereinigte DNA zu eluieren. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt (Kapitel 2.2.6.4).

#### *2.2.6.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren*

Für die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration wurde ein UV-Spektrometer (DU<sup>®</sup> 640 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) verwendet. Die zu untersuchende Nukleinsäure-Probe wurde zunächst verdünnt (1:10) und in eine Quarzküvette gegeben. Gegen einen Referenzwert (Lösungsmittel der Probe) wurde die verdünnte Probe bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Dabei errechnet sich die Nukleinsäurekonzentration aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm, der Verdünnung der Probe und einem spezifischen Extinktionskoeffizienten. Eine OD von eins bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 µg/ml und bei RNA 40 µg/ml. Darüber hinaus ist es möglich, anhand des Verhältnisses der OD bei 260 nm zu der OD bei 280 nm Aussagen zum Grad der Kontamination der Probe zu machen. Der errechnete Wert sollte für eine reine DNA-Präparation bei 1,8-2,0 liegen. Liegt der Wert darunter, so weist dies auf eine Kontamination der Probe durch Proteine oder Phenol hin, während ein Quotient > 2 für eine Verunreinigung durch RNA spricht.

#### 2.2.6.5 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Für die Synthese von cDNA aus genomischer RNA wurde das *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. In diesem Reagenziensatz wird die *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase* zur Herstellung von cDNA aus RNA genutzt. Diesem Enzym fehlt eine Ribonuklease H-Aktivität, die spezifisch für RNA in RNA-DNA-Hybriden ist. Daher kommt es nicht zur Degradation von RNA während der cDNA-Synthese, was zu höheren cDNA-Ausbeuten von langen RNA-Matrizen führt. Beim Einsatz von oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern, die an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende von mRNA binden, dient nur mRNA als Matrize für die cDNA-Synthese. Die mit diesem System synthetisierte cDNA kann direkt in der quantitativen *real time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR, Kapitel 2.2.6.8) eingesetzt werden.

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µl oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer (0,5 µg/µl) und 1 µl RNase freies Wasser in einem 200 µl PCR-Reagiergefäß vorgelegt und 10 µl RNA (100 ng/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde durch kurzes Schütteln durchmischt und kurz zentrifugiert. In einem Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) wurde der Ansatz für 5 Min. bei 70 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis pipettiert. Eine Vormischung mit 4 µl 5 × Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor und 2 µl 10 mM dNTP-Mischung wurde hergestellt und dem Ansatz zugefügt. Nach Inkubation im Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) für 5 Min. bei 37 °C wurde 1 µl *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase* dazugegeben. Der erste cDNA-Strang komplementär zur mRNA wurde dann im Thermocycler bei 42 °C für 60 Min. und 10 Min. bei 70 °C gebildet und der Ansatz anschließend möglichst schnell bei -20 °C gelagert. Die synthetisierte cDNA wurde später in der qRT-PCR eingesetzt (Kapitel 2.2.6.8).

#### 2.2.6.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Doppelstrangs zu vervielfältigen. Durch zwei Oligonukleotid-Primer, die auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen, wird

der zu amplifizierende Bereich von beiden Seiten begrenzt. Eine DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die bei hohen Temperaturen nicht zerstört wird, repliziert den festgelegten Bereich. Durch zyklische Denaturierung, Primerbindung (*Annealing*), DNA-Replikation (*Elongation*) und mehrfache Wiederholung dieser Schritte wird DNA amplifiziert. Als Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang dienen Nukleotide (dNTPs). Die für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung wird durch Pufferlösungen sichergestellt.

Zur Vervielfältigung von zu sequenzierenden DNA-Segmenten wurde die PCR eingesetzt. In einem Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) wurde die DNA zunächst für 3 Min. bei 95 °C denaturiert. Die im Überschuss vorhandenen Oligonukleotid-Primer konnten anschließend unter hybridisierenden Bedingungen (30-120 Sek., 55-65 °C) an die DNA binden. Die Temperatur, bei der die Oligonukleotid-Primer am besten mit der DNA hybridisieren, ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Bei 72 °C konnte die *Taq*-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) nun Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden knüpfen und so die komplementäre DNA-Sequenz synthetisieren. Die Zeit hierfür betrug 30-60 Sek. und war abhängig von der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Segments. Die neu entstandenen DNA-Doppelstränge wurden wiederum bei 95 °C denaturiert (30-120 Sek.), worauf sich ein neuer Zyklus von Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese anschloss. Durch 25-35-fache Wiederholung dieser Zyklen wurden kleine Mengen DNA millionenfach amplifiziert. Abschließend wurde eine Synthese-Phase bei 72 °C für 3 Min. durchgeführt. Alle PCR wurden mit einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die DNA wurde aufgereinigt und sequenziert (Kapitel 2.2.6.10). Tabelle 2.3 zeigt das Standard-PCR-Programm, Primer sind in Tabelle 2.4 gelistet.



Tabelle 2.3: Standard-PCR-Programm.

Standard-PCR-Programm zur Vervielfältigung von DNA-Segmenten			
3 Min.	95 °C	Denaturierung	25-40 Zyklen
30 Sek.	95 °C	Denaturierung	
30 Sek.	50-65 °C	Annealing	
30-60 Sek.	72 °C	Elongation	
3 Min.	72 °C	Elongation	
∞ Min.	4 °C	Lagerung	

Tabelle 2.4: Primer-Sequenzen, Produktlänge (Prod.) und Annealing-Temperatur (Anneal.) für PCR-Amplifikation und Sequenzierreaktion.

MGMT	Vorwärts Primer 5'-3'	Rückwärts Primer 5'-3'	Prod.	Anneal.
Exon 1	<u>CGACCAGCCTCTTACCTATAC</u>	CTGCCATCAATGGAAAAATG	278 bp	60 °C
Exon 2	<u>GTGTTTGCTTTCCGATGTG</u>	AAACGCTGCCTCTGTTTAG	348 bp	60 °C
Exon 3	<u>TATCAGAGCTGCTGAAGCCG</u>	ATCAGATGACACCCTGCCAC	266 bp	64.5 °C
Exon 4	TGACCCCAAAGACCTCGTTG	<u>CGTCTGAACTCATCCTGCTG</u>	432 bp	60 °C
<b>MLH1</b>	<b>Vorwärts Primer 5'-3'</b>	<b>Rückwärts Primer 5'-3'</b>	<b>Prod.</b>	<b>Anneal.</b>
Exon 1/2*	<u>TGGATGGCGTAAGCTACAG</u>	<u>CTTCGCATGTTCTGCATAC</u>	553 bp	60 °C
Exon 3/4*	GAGCCTGTAAGACAAAGG	<u>CGTAACTCTGCTTAAAACC</u>	891 bp	60 °C
Exon 5	GACTCTGTCTCAAAGGAGGT	<u>CAGACAATGTCTCACAGGAG</u>	386 bp	60 °C
Exon 6	<u>AGTGCTCATCGTTGCCAC</u>	CTGGTGTGAGACAGGATTAC	292 bp	55 °C
Exon 7	<u>TCTCTTTCCCTTGGGATTAG</u>	AGCTTCAACAA TTTACTCTCCC	178 bp	59 °C
Exon 8	<u>TAATGCTGTCTTATCCCTGGC</u>	CACCATCTAGCTCAGCAAC	348 bp	58 °C
Exon 9/10	CTCTGACATCTAGTGTGTG	<u>CAAGCCTGTGTTTTGAC</u>	473bp	58 °C
Exon 11	<u>TGGATGGATGAATGGACAGG</u>	ACCAAATTTGCCATGAGG	414 bp	60 °C
Exon 12	<u>AAGTGGCGACAGGTAAGG</u>	CCTTGACCTGTAAGAAGGGAC	416 bp	62 °C
Exon 13	<u>TCTCCCTCCCACTATCTAAG</u>	AGATGGAGGCAAAGTGAGGAAG	359 bp	62 °C
Exon 14	TCGGGCAGAATTGCTTCT	ACCATTCCAGCACCATTCC	670 bp	60.5 °C
Exon 14seq	<u>CAGAAGCTTGATGCATTTCTGC</u>	<u>ATTTTGGCAGCCACTTCAG</u>		
Exon 15	<u>CACAGGGGTTCAATCACAG</u>	GCCACTCTGACAACATGAC	374 bp	60 °C
Exon 16	<u>GCTTACTTGGTGTCTCTAGTTC</u>	CTCTCCTTAGCTTTGTGCC	295 bp	62 °C
Exon 17	<u>CAGGGATTACTTCTCCCA</u>	AGTTGGCTACCAAATGAC	353 bp	57 °C
Exon 18	<u>TGGTTTCTCACCTGCCATTTC</u>	CTGGGATTACAGCCATGAG	356 bp	58.5 °C
Exon 19/20	TGGCAGATAGGAGCAAAAGG	<u>GATTGTATGAGGTCCTGTC</u>	660 bp	58.5 °C
Exon 21	<u>ACCAAGTCTTTCCAGACCC</u>	<u>GTGACATGTTCAAGCCTTC</u>	532 bp	60 °C
<b>MSH2</b>	<b>Vorwärts Primer 5'-3'</b>	<b>Rückwärts Primer 5'-3'</b>	<b>Prod.</b>	<b>Anneal.</b>
Exon 1	<u>GAAGCTGATTGGGTGTGGTC</u>	TCTGAGGCGGGAAAGGAG	408 bp	60 °C
Exon 2	GCAGCATGAAGTCCAGCTAA	<u>CGACCAGCCAAAAGTCAAC</u>	402 bp	60 °C
Exon 3	GATTGAACCTTGAGGCAGA	<u>CATGTCAATTAAGAGCCTTTCC</u>	551 bp	60 °C
Exon 4	CATCATATCAGTGTCTTGACA	<u>TCATTGATACACAGTTTAGGTTTTG</u>	427 bp	58 °C
Exon 5	<u>GGATCCAGTGGTATAGAAA TCTTCG</u>	AGTGGAGGAGGGGAGAGAAA	372 bp	58 °C
Exon 6	<u>CCTCTGTTTTTCATGGCGTAG</u>	GTGGTATAATCA TGTGGGTA ACTGC	276 bp	60 °C



MSH2	Vorwärts Primer 5'-3'	Rückwärts Primer 5'-3'	Prod.	Anneal.
Exon 7	<u>GCCCAGCAGATTCAAGCTTT</u>	GGACAGCACATTGCCAAGTA	393 bp	60 °C
Exon 8	AGTGGGAAGCTTTGAGTGCT	<u>CTTAAAGTGGCCTTTGCTTTT</u>	394 bp	58 °C
Exon 9	GTTGTGACTGAATAACTTATGGATAGC	<u>ATCATACAAGGGCCTGTTGG</u>	416 bp	58 °C
Exon 10	GCAGCTTTCAAGTCAGAACTAAC	<u>TGCGACAGCTGACTGCTCTA</u>	535 bp	58 °C
Exon 11	<u>GCCATTGCGCTATTCCAAAC</u>	GCCAGGTGACATTCAGAACA	356 bp	58 °C
Exon 12	<u>GGGTTTTGAATTCCTAAATG</u>	ACAAAACGTTACCCCAACA	393 bp	58 °C
Exon 13	<u>AGGCTGTGGTTCTGCCTTTA</u>	TCCTTCTCACAGGACAGAGACAT	407 bp	55 °C
Exon 14	<u>TGGCATA TCCTTCCCAATGT</u>	CCTACCCCA GACTGTGAAT	500 bp	58 °C
Exon 15	ACAGCACTGTGTGCCAAGTC	<u>GCACTAGAAAACACAGAGGAAAAACA</u>	499 bp	61 °C
Exon 16	AGCCTGGGCAACATAGTG	<u>CCCATGGGCACTGACAGTTA</u>	450 bp	61 °C

Unterstrichene Primer dienten als Primer für die Sequenzierreaktion.

\* Diese beiden DNA-Bereiche wurden früher als exonische Bereiche angesehen, werden aber jetzt als intronisch betrachtet.

### 2.2.6.7 Bisulfit-Konversion und Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (MS-PCR)

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus von Promotorsequenzen wurde die Bisulfit-Konversion mit anschließender Methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion (MS-PCR) genutzt.

#### Bisulfit-Konversion:

Methylierung von DNA tritt speziell in kurzen (<500 bp), CpG-Dinukleotid-reichen DNA-Regionen auf. Diese Regionen mit einem GC-Gehalt von >55 % werden als CpG-Inseln bezeichnet und treten in der Regel gehäuft um die regulatorische Region eines Gens auf.

Die Inkubation von DNA mit Natriumbisulfit führt zur Konversion von unmethylierten Cytosin-Resten zu Uracil, während methylierte Cytosine unverändert bleiben (Tabelle 2.5). Damit kann der Methylierungsstatus von DNA-Sequenzen bestimmt werden (Produktinformation der Firma Qiagen, Hilden).

**Tabelle 2.5: Konversion unmethylierter Cytosin-Reste zu Uracil.**

	Unmethylierte DNA	Methylierte DNA
Original-Sequenz	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N
Nach Bisulfit-Behandlung	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

Für die Bisulfit-Konversion wurde das *EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite Kit* von Qiagen (Hilden) verwendet. Zunächst wurde die benötigte Menge an Bisulfit-Mix-Aliquots durch Zugabe von 800 µl RNase freiem Wasser pro Aliquot und anschließendem Vortexen gelöst (ein Aliquot ist ausreichend für acht Proben). Dann wurden die verschiedenen Komponenten für die Bisulfit-Reaktion in 200 µl Reagiergefäßen zusammengegeben (Tabelle 2.6).

**Tabelle 2.6: Reaktionskomponenten für die Bisulfit-Konversion.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen pro Reaktion in µl</b>
DNA-Lösung (1 ng–2 µg)	3 µl
RNase freies Wasser	17 µl
Bisulfit-Mix	85 µl
DNA Protektions-Puffer	35 µl
Gesamtvolumen	140 µl

Durch Vortexen wurden die Reaktionsansätze gemischt, wobei das Umschlagen der Farbe des DNA Protektions-Puffers von grün nach blau das hinreichende Mischen und den korrekten pH-Wert für die Bisulfit-Konversion anzeigte. Die Bisulfit-DNA-Konversion wurde dann in einem Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) durchgeführt (Tabelle 2.7).

**Tabelle 2.7: Thermocycler-Konditionen für die Bisulfit-Konversion.**

<b>Schritt</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Denaturierung	5 Min.	99 °C
Inkubation	25 Min.	60 °C
Denaturierung	5 Min.	99 °C
Inkubation	85 Min.	60 °C
Denaturierung	5 Min.	99 °C
Inkubation	175 Min.	60 °C
Pause	∞Min.	20 °C

Die konvertierte DNA konnte anschließend für die MS-PCR eingesetzt werden.

Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (MS-PCR):

In der Methylierungsspezifischen Polymerase-Kettenreaktion (MS-PCR) wurden spezifische Primer-Paare eingesetzt, um zwischen Cytosin und durch Bisulfit-Konversion aus unmethylierten Cytosin entstandenem Uracil zu unterscheiden. Für jede Bisulfit-konvertierte DNA wurden zwei PCR (Kapitel 2.2.6.6) durchgeführt, einmal mit einem Oligonukleotid-Primer-Paar spezifisch für die methylierte Sequenz und einmal mit einem Oligonukleotid-Primer-Paar spezifisch für die unmethylierte Sequenz. Je nachdem, mit welchem Oligonukleotid-Primer-Paar ein PCR-Produkt mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.6.12) nachgewiesen wurde, konnte auf den Methylierungsstatus der ursprünglich eingesetzten DNA geschlossen werden. Zur Bestimmung des Promotor-Methylierungsstatus von *MGMT* wurde nach Bisulfit-Konversion eine so genannte „*nested*“ PCR durchgeführt, um eine ausreichende Vervielfältigung der gewünschten Region zu erzielen. Dazu wurde zunächst, wie von Lai *et al.* (Lai et al., 2008) beschrieben, ein größerer Promotor-Bereich vervielfältigt und das entstandene PCR-Produkt für die anschließende MS-PCR eingesetzt (Primer-Sequenzen siehe Tabelle 2.8). Zur selektiven Vervielfältigung methylierter oder unmethylierter Allele von *MLH1* wurden Primer und PCR-Bedingungen verwendet, wie von Grady *et al.* (Grady et al., 2001) beschrieben (Tabelle 2.8). Die PCR wurde, wie in Kapitel 2.2.6.6 beschrieben, mit einem Gesamtvolumen von 20 µl und unter Verwendung von *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Zur selektiven Vervielfältigung methylierter oder unmethylierter Allele von *MSH2* wurden Primer, wie von Herman *et al.* (Herman et al., 1998) beschrieben, und modifizierte PCR-Bedingungen (95 °C für 1 Min., gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C für 30 Sek. und 68 °C für 1 Min.; das Protokoll endete mit einer finalen *Elongation* bei 68 °C für 1 Min.) verwendet (Tabelle 2.8). Diese PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 20 µl und unter Verwendung des *BD Advantage™ 2 PCR Kits* (BD Bioscience Clontech, Heidelberg) durchgeführt. DNA von normalen Lymphozyten wurde als Kontrolle für unmethylierte Allele und die gleiche DNA, vorher mit *SssI*-Methyltransferase (New England Biolabs, Frankfurt) behandelt, als Kontrolle für methylierte Allele eingesetzt. PCR-Produkte wurden in einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen (Kapitel 2.2.6.12).

**Tabelle 2.8: Primer-Sequenzen, Produktlänge (Prod.) und *Annealing*-Temperaturen (Anneal.) für die MS-PCR.**

Bezeichnung	Vorwärts Primer 5'-3'	Rückwärts Primer 5'-3'	Prod.	Anneal.
MSP1-MGMT	GGATATGTTGGGATAGTT	CCAAAACCCCAAACCC	289 bp	52 °C für 30 sek
Me-MGMT	TTTCGACGTTTCGTAGTTTT CGC	GCACTCTTCCGAAAACGAAA CG	81 bp	65.5 °C für 30 sek
Ume-MGMT	TTTGTGTTTTGATGTTTGTA GGTTTTGT	AACTCCACACTCTCCAAAA ACAAAACA	93 bp	66 °C für 30 sek
Me-MLH1	AACGAATTAATAGGAAGAG CGGATAGCG	CGTCCCTCCCTAAAACGACT ACTACCC	91 bp	62 °C für 30 sek
Ume-MLH1	TAAAAATGAATTAATAGGAA GAGTGGATAGTG	AATCTCTTCATCCCTCCCTA AAACA	103 bp	57 °C für 30 sek
Me-MSH2	TCGTGGTCGGACGTCGTTC	CAACGTCTCCTTCGACTACA CCG	132 bp	68 °C für 1 min
Ume-MSH2	GGTTGTTGTGGTTGGATGT TGTTT	CAACTACAACATCTCCTTCA ACTACACCA	140 bp	68 °C für 1 min

Für *MGMT* wurde eine „*nested*“ PCR durchgeführt. „MSP1-MGMT“ bezeichnet die Primer für die flankierende PCR, „Me-MGMT“ oder „Ume-MGMT“ bezeichnen Primer-Paare für die anschließende MS-PCR um zu unterscheiden, ob die Cytosine in der betrachteten Region methyliert oder nicht-methyliert sind. Für *MLH1* und *MSH2* konnte eine direkte MS-PCR mit Primer-Paaren für methylierte („Me“) und nicht-methylierte („Ume“) Matrizen durchgeführt werden.

#### 2.2.6.8 Quantitative real time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Für die quantitativen *real time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde das *QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Kit* (Qiagen, Hilden) und ein LightCycler-Gerät (Roche, Mannheim) verwendet. Das Prinzip der qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (Kapitel 2.2.6.6). Ziel der qRT-PCR ist es, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die eingesetzte cDNA-Menge zu schließen. Durch Reverse Transkription (Kapitel 2.2.6.5) von RNA in cDNA und anschließender qRT-PCR kann so die Transkriptmenge bestimmter Gene auf RNA-Ebene quantifiziert werden. Die quantitative Bestimmung erfolgt mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR<sup>®</sup> Green I). Dieser Farbstoff interkaliert an doppelsträngigen Nukleinsäuren (cDNA) und emittiert dabei ein Fluoreszenz-Signal. Die Zunahme der Ausgangs-cDNA-Menge korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Zur Auswertung wird die Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen und ein Schwellenwert über der Hintergrund-Fluoreszenz am Beginn der exponentiellen Phase festgelegt. Der Schwellenwert-Zyklus (*cycle threshold*,  $C_T$ ) ist der Schnittpunkt der Fluoreszenz-Kurve mit dem Schwellenwert. Der  $C_T$  wird zur Quantifizierung der Expression herangezogen, da sich die Mengen an amplifiziertem PCR-Produkt in diesem

Bereich untereinander vergleichen lassen. Zur quantitativen Auswertung ist darüber hinaus noch eine Standardkurve mit bekannten Ausgangs-cDNA-Mengen erforderlich. Mit Hilfe dieser Standardkurve können dann Rückschlüsse auf die Quantität der Ausgangs-cDNA-Menge einer unbekannt Probe gezogen werden (Produktinformation der Firma Qiagen, Hilden).

Für die Erstellung einer Standard-Kurve wurde zunächst eine qRT-PCR ohne Standard durchgeführt und die Konzentration des Produkts photometrisch bestimmt. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes des PCR-Produkts wurde dann die Menge an Produkten pro  $\mu\text{l}$  berechnet und eine Verdünnungsreihe angesetzt. Die Verdünnungsreihe lag angepasst für jedes Gen im Bereich von  $1 \times 10^3 \text{ amol}/\mu\text{l}$  bis  $1 \times 10^{-4} \text{ amol}/\mu\text{l}$ . Mit Hilfe dieser Standard-Verdünnungsreihe konnte in folgenden qRT-PCR die Ausgangs-cDNA-Menge unbekannter Proben ermittelt werden. Der Ansatz einer qRT-PCR setzte sich wie folgt zusammen (Tabelle 2.9):

**Tabelle 2.9: Ansatz für die quantitative *real time* PCR.**

Komponente	Volumen
2 x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (HotStarTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase, PCR-Puffer, SYBR <sup>®</sup> Green I, dNTP-Mix, 5 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 $\mu\text{l}$
Vorwärts-Primer	1 $\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{M}$ )
Rückwärts-Primer	1 $\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{M}$ )
RNase-freies Wasser	6 $\mu\text{l}$
cDNA	2 $\mu\text{l}$ (100 ng)
Gesamt-Volumen	20 $\mu\text{l}$

Für jedes Gen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Eine hohe Spezifität und Sensitivität der PCR wurde durch Verwendung der HotStarTaq DNA Polymerase erreicht. Nach Abschluss der Amplifikation wurde durch eine Schmelzkurven-Analyse die Spezifität der PCR-Produkte untersucht. Dazu wurde die Abnahme der Fluoreszenz bei steigender Temperatur von 50 °C bis 95 °C, welche aus der Trennung der DNA-Doppelstränge und der damit verbundenen Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs resultiert, gemessen. Die Temperatur, bei der es zur Strangtrennung kommt, ist für jedes PCR-Produkt spezifisch. Zusätzliche unspezifische Produkte und Primer-Dimere konnten so

ausgeschlossen werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *LightCycler LCDA Version 3.5.28 Software*. Die Expression der untersuchten Gene wurde durch Verwendung des Referenzgens GAPDH normalisiert. Um die Eignung von GAPDH als Referenzgen zu verifizieren, wurde  $\beta$ -Aktin als zweites Referenzgen in 36 Patienten-Proben evaluiert. Primer für die qRT-PCR wurden entweder mittels *Primer3 Input (v. 0.4.0)* konstruiert (Kapitel 2.2.6.11) und von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen oder es wurden *QuantiTect<sup>®</sup> Primer Assays* verwendet (Qiagen, Hilden). Die mittels *Primer3 Input (v. 0.4.0)* konstruierten Primer wurden so konstruiert, dass sie an zwei Exons binden, um die Amplifikation von Kontaminationen durch genomische DNA zu unterbinden. Primersequenzen und *Annealing*-Temperaturen sind in Tabelle 2.10 aufgeführt.

**Tabelle 2.10: Primer-Sequenzen und *Annealing*-Temperaturen für die quantitative *real time* PCR.**

Gen	Vorwärts Primer 5'-3'	Rückwärts Primer 5'-3'	Anneal.
MGMT	CCTGGCTGAATGCCTATTTTC	GATGAGGATGGGGACAGGATT	51 °C
MLH1	<i>Hs_MLH1_1_SG QuantiTect<sup>®</sup> Primer Assay</i>		44 °C
MSH2	CAGTATATTGGAGAATCGCA	AGGGCATTGTTCACC	46 °C
GAPDH	<i>Hs_GAPDH_2_SG QuantiTect<sup>®</sup> Primer Assay</i>		55 °C
$\beta$ -Actin	CCCAAGGCCAACC GCGAGAAGAT	GTCCC GGCCAGCCAGGTCCAG	63 °C

#### 2.2.6.9 *ExoSAP-IT-Verdauung*

Wenn die PCR-Amplifikation abgeschlossen ist, verbleiben unverbrauchte Nukleotide und Oligonukleotid-Primer in der PCR-Produkt-Mischung zurück. Unverbrauchte Nukleotide und Oligonukleotid-Primer stören nachfolgende Applikationen und müssen daher entfernt werden. *ExoSAP-IT* (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) verwendet hierzu die zwei hydrolytischen Enzyme Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase. Die Exonuklease I degradiert einzelsträngige Oligonukleotid-Primer, die Shrimp Alkaline Phosphatase hydrolysiert unverbrauchte Nukleotide aus der PCR-Mischung (Produktinformation der Firma USB Corporation, Cleveland, OH, USA).

Für die *ExoSAP-IT-Verdauung* wurden 5  $\mu$ l PCR-Produkt zu 2  $\mu$ l *ExoSAP-IT* gegeben und für 15 Min. im Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde das *ExoSAP-IT* durch 15 Min. Inkubation bei

80 °C im Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) inaktiviert. Das so behandelte PCR-Produkt konnte jetzt direkt für die DNA-Sequenzierung eingesetzt werden.

#### 2.2.6.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach Sanger *et al.* (Sanger et al., 1977). Diese Methode wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Dabei wird die DNA zunächst mittels PCR (Kapitel 2.2.6.6) amplifiziert. In dem dafür verwendeten Sequenziermix (*BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sind markierte Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) enthalten. Werden diese eingebaut, kommt es zum Abbruch der Verlängerungsreaktion und ein Fragment mit definierter Länge entsteht. Diese Fragmente können nun über ein Gel aufgetrennt und über ihre markierten ddNTPs am 3'-Kettenende ausgewertet werden (am 5'-Kettenende befindet sich der Primer). Hier erfolgte die Markierung mittels Fluoreszenzfarbstoffen. Diese werden während der Elektrophorese mit einem Laser angeregt und die Fluoreszenzmuster im automatischen ABI-Prism<sup>®</sup> Sequenziergerät (Modell 310 Genetic Analyzer) ausgewertet. Bei diesem System wurden im Ansatz vier Didesoxynukleotide, die mit vier verschiedenen Farbstoffen markiert waren, eingesetzt. Dies bietet den Vorteil, dass die Sequenzierreaktion in einem einzigen Gefäß durchgeführt werden kann. Der Sequenziermix enthielt auch schon die notwendige Polymerase.

In dieser Arbeit wurde durch Sequenzierung der kodierende Bereich, das heißt, alle Exons inklusive der Intron-Exon-Grenzen (Spleißstellen) der drei DNA-Reparaturgene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* auf Einzelnukleotidaustausche (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) überprüft. Für die Sequenzierungsreaktion (*Cycle-Sequencing*) wurde der gesamte Ansatz aus der *Exo-SAP-IT*-Verdauung (Kapitel 2.2.6.9) eingesetzt. Diesem Ansatz wurden dann Sequenz-Primer, 5 × *BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1/3.1 Sequenzier-Puffer* und 2,5 µl *BigDye<sup>®</sup>-Sequenziermix* zugefügt (Tabelle 2.11). Als Sequenz-Primer wurde für jedes Exon einer der beiden PCR-Primer verwendet oder es wurden – wenn diese nicht geeignet waren – zusätzliche Sequenzier-Primer eingesetzt (Primer für die



Sequenzierung sind in Tabelle 2.4 unterstrichen). Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (UNO-Thermoblock, Biometra, Göttingen) durchgeführt (Tabelle 2.12). Anschließend wurde der Ansatz aufgereinigt. Dazu wurden in einem 1,5 ml Reagiergefäß 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,6) und 250 µl 100 % Ethanol vorgelegt. Der Sequenzier-Ansatz wurde in 90 µl zweifach destilliertem Wasser aufgenommen und ebenfalls in das 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Der Ansatz wurde durch Vortexen gemischt und 10 Min. auf Eis gelagert. Nach 20minütigem Zentrifugieren bei 15 000 × g (13 000 upm, Sigma Typ 1-15, Sigma, Osterode am Harz) wurde der Überstand durch Dekantieren verworfen und 250 µl 70 %iger Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 Min. bei 15 000 × g zentrifugiert und der Überstand erneut durch Dekantieren verworfen. Das DNA-Sediment wurde für etwa 10 Min. im Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) bei 37 °C getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in 20 µl Formamid-Lösung (7,5 µl Formamid + 12,5 µl zweifach destilliertes H<sub>2</sub>O) aufgenommen, für 2 Min. bei 90 °C denaturiert und für 5 Min. auf Eis gelagert. Nach kurzem Mischen durch Vortexen wurde der Ansatz in ein Sequenziergefäß überführt und im ABI-Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer Sequenziergerät ausgewertet.

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit der *Software Sequencing Analysis Version 5.2* (Applied Biosystems, Foster City, USA) und anschließend mit dem Programm *Staden Package Version 4.0* (staden.sourceforge.net). Alle Genotyp-Daten wurden in die Standard-Nomenklatur konvertiert (den Dunnen und Antonarakis, 2001). Die Position der Variante bezieht sich in der Gensequenz auf das „A“ des „ATG“ Translations-Startkodons als Position „1“. Dies entspricht der Position 131 224 508 auf Chromosom 10 für *MGMT*, 37 010 043 auf Chromosom 3 für *MLH1* und 47 483 836 auf Chromosom 2 für *MSH2* (nach dem aktuellen *NCBI Genome Build 36.3*).



Tabelle 2.11: Sequenzieransatz.

Komponente	Volumen
DNA aus Exo-SAP-IT-Verdauung	7,0 µl
Sequenz-Primer (5 pmol)	0,5 µl
5 × BigDye <sup>®</sup> Terminator v1.1/3.1 Sequenzier-Puffer	0,5 µl
BigDye <sup>®</sup> -Sequenziermix	2,5 µl

Tabelle 2.12: Programm zur Sequenzierung von DNA-Segmenten.

Sequenzier-Programm			
30 Sek.	96 °C	Denaturierung	30 Zyklen
15 Sek.	55 °C	Annealing	
4 Min.	60 °C	Elongation	
∞ Min.	4 °C	Lagerung	

#### 2.2.6.11 Primerdesign für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Genomische Sequenzen vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dienten als Matrize für das *Primerdesign* (MGMT: NT\_008818.15, MLH1: NT\_022517.17, MSH2: NT\_022184.14). Das *Primerdesign* für die PCR erfolgte mit Hilfe des Programms *Primer3 Input* (v. 0.4.0). Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer wurden so ausgewählt, dass der gesamte kodierende Bereich der Gene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* inklusive der Spleißstellen (Minimum 30 bp der Exon-flankierenden intronischen Sequenzen) abgegriffen wurde. Weitere Kriterien für das *Primerdesign* sind in Tabelle 2.13 aufgeführt.

Tabelle 2.13: Bedingungen für das *Primerdesign*.

	Minimum	Optimum	Maximum
Primergröße	20 bp	22 bp	27 bp
Schmelztemperatur	58 °C	62 °C	65 °C
GC-Gehalt	35 %	45-55 %	60 %

Anschließend wurde die Spezifität der Primer mit Hilfe des Programms *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) überprüft. Die Primer wurden alle von der Firma Eurofins MWG Operon

(Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2.4 und Tabelle 2.10 aufgeführt.

#### 2.2.6.12 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde genutzt, um PCR-Produkte nachzuweisen. Bei der Auftrennung der DNA-Fragmente wird die Tatsache genutzt, dass die Phosphatreste der DNA eine negative Nettoladung erzeugen, die sich proportional zu der Größe der DNA-Moleküle verhält. Dies bedeutet, dass sich die DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld nach der Größe auftrennen lassen und hierbei ihrer Größe entsprechend zur Anode wandern. Die elektrophoretische Mobilität doppelsträngiger DNA-Moleküle ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe. Die Größe der aufgetrennten Fragmente wird durch den Vergleich mit parallel aufgetragenen DNA-Fragmenten bekannter Größe bestimmt.

Für die Herstellung von drei 1,5 %igen Agarosegelen wurden 1,5 g SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf) in 100 ml TBE-Puffer durch Erhitzen im Mikrowellengerät gelöst. Das Gemisch wurde in einen Gelträger gegossen und mit Hilfe eines Kamms Taschen im Gel erzeugt. Für kurze PCR-Produkte wurden 3 %ige Agarosegele mit NuSieve<sup>®</sup> 3:1 Agarose (Cambrex, Rockland, ME, USA) hergestellt. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit TBE-Puffer gefüllt. Die mit Probenauftragspuffer für Agarosegelelektrophorese versehenen Proben wurden neben einem DNA-Längenstandard in die Taschen pipettiert. Es wurde eine konstante Spannung von 150 Volt angelegt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für etwa anderthalb Stunden. Danach wurde das Gel aus der Kammer genommen und die DNA für 5-15 Min. in einem Ethidiumbromid-Färbebad angefärbt. Die gefärbten DNA-Banden wurden dann auf einem UV-Schirm fotografisch dokumentiert.

#### 2.2.6.13 DNA-Extraktion aus Agarosegelfragmenten

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelfragmenten wurde der *MinElute Gel Extraction Kit* von Qiagen (Hilden) verwendet. Dieses System ist darauf ausgelegt,

DNA-Fragmente mit einer Länge von 70 bp bis 4 kb aus Agarosegelen in TBE-Puffer zu extrahieren und aufzureinigen. Pro MinElute-Säule kann die DNA aus bis zu 400 mg Agarose extrahiert werden. In Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert  $\leq 7,5$  können bis zu 5  $\mu\text{g}$  DNA von der Silica-Gel-Membran einer MinElute-Säule adsorbiert werden. Während die DNA an die Membran bindet, werden Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, einzelne Nukleotide, Agarose, Farbstoffe, Ethidiumbromid, DMSO, Öle und Detergenzien nicht gebunden und passieren die Säule. Salze werden quantitativ durch den Ethanol enthaltenden PE-Puffer ausgewaschen. Die Elution der gebundenen DNA findet unter basischen Bedingungen und niedrigen Salzkonzentrationen statt. Hierzu werden 10  $\mu\text{l}$  eines basischen EB-Puffers (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) oder destilliertes Wasser verwendet (Produktinformation der Firma QIAGEN, Hilden).

Die gewünschten DNA-Banden wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Zu diesen Gelfragmenten wurde jeweils das dreifache Volumen ihres Gewichts an QG-Puffer (Bindungs- und Solubilisierungs-Puffer) zugegeben. Zum Lösen der Agarosegelfragmente wurden die Ansätze für 10 Min. in einem Thermomixer bei 50 °C erhitzt und mit 1 400 upm geschüttelt. Nachdem sich die Agarose vollständig gelöst hatte, wurde den Ansätzen jeweils das einfache Volumen des Agarosegelfragmentgewichts an Isopropanol zugefügt. Je eine MinElute-Säule wurde auf ein neues 2 ml Reagiergefäß platziert und die DNA-enthaltende Lösung auf die jeweilige Säule gegeben. Um die DNA an die Silica-Gel-Membran zu binden, wurde die Säule 30 Sek. bei 15 000  $\times g$  (13 000 upm, Sigma Typ 1-15, Sigma, Osterode am Harz) zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Ethanol-enthaltende PE-Waschpuffer zugegeben und erneut bei 15 000  $\times g$  für 1 Min. zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in einem weiteren Schritt für 1 Min. bei 15 000  $\times g$  trocken zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden dann 10  $\mu\text{l}$  EB-Puffer direkt auf die Silica-Gel-Membran gegeben und die Säulen in neue Reagiergefäße gesetzt. Nach einer Inkubation von 1 Min. bei Raumtemperatur wurden die Ansätze bei 15 000  $\times g$  für 1 Min. zentrifugiert und so die DNA von der Membran eluiert.

### 2.2.7 Statistik

Für die statistische Analyse und Darstellung der Daten wurden die Programme MS Excel, SPSS Version 12.0, und CorelDraw<sup>®</sup>9 für Windows verwendet.

Für die Auswertung der Genexpressionsdaten von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* in den Patienten-Untersuchungen wurden die mRNA-Expressionen aller Patienten kategorisiert in: hohe Expression (Expression größer als der Mittelwert plus Standardabweichung), durchschnittliche Genexpression (Expression im Bereich des Mittelwerts plus und minus der Standardabweichung) und niedrige Genexpression (Expression kleiner als der Mittelwert minus Standardabweichung). Für alle Gruppen-Vergleiche wurde der exakte Fischer Test verwendet. Wenn Genotypen analysiert wurden, wurde der exakte Cochran-Armitage Trend Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=5\%$  gesetzt. Korrekturen für multiples Testen wurden für jede wissenschaftliche Fragestellung separat mittels Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Wenn keine globale Signifikanz erreicht wurde, wurden nominale p-Werte angegeben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Übersicht

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung Tumor-unabhängiger Marker für hämatologische Nebenwirkungen und Ansprechen einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie bei der Behandlung des kutanen Melanoms in Assoziation mit DNA-Reparatur. Dabei wurden die hämatologischen Nebenwirkungen und das Ansprechen von Stadium IV-Melanom-Patienten auf die Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie untersucht. Untersuchungen der Genexpression und genetischer Varianten der DNA-Reparaturgene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* sollten einen Beitrag zur Suche nach möglichen prädiktiven Biomarkern einer individualisierten, Tumor-unabhängigen Chemotherapie leisten.

Im Rahmen von Zellkultur-Untersuchungen beschäftigt sich diese Arbeit mit den molekularen Wirkmechanismen von Temozolomid bei der Behandlung von Melanom-Zelllinien. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten dazu beitragen, die Wirkung von Temozolomid auf Melanomzellen weiter aufzuklären. Für die Untersuchungen der molekularen Wirkmechanismen war die laborinterne Etablierung von Methoden zum Nachweis von Apoptose und Nekrose, Zell-Zyklus-Phasen-Verteilung und zur immunchemischen Quantifizierung Temozolomid-induzierter O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte eine wichtige Voraussetzung.

### 3.2 Patienten-Untersuchungen

#### 3.2.1 Übersicht

In die prospektive klinische Studie zur Identifizierung Tumor-unabhängiger Marker für hämatologische Nebenwirkungen und Ansprechen einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie bei der Behandlung des kutanen Melanoms wurden 51 Patienten eingeschlossen. Die Rekrutierung der Patienten wurde multizentrisch an der Medizinischen Hochschule Hannover, Universitätsmedizin Freiburg, Universitätsmedizin Rostock und an der Universitätsmedizin der Georg-August-Universität zu Göttingen durchgeführt. Allen beteiligten Instituten lag ein positives

Votum der zuständigen Ethik-Kommission vor und alle Patienten haben nach Aufklärung über die Studie ihr schriftliches Einverständnis gegeben.

### 3.2.2 Patienten

Alle 51 Patienten waren Kaukasier aus Deutschland, die an histopathologisch bestätigtem, chirurgisch nicht entfernbarem, metastasiertem kutanen Melanom erkrankt waren. Die Verteilung der männlichen und weiblichen Patienten war 50.98 %:49.02 % (26 Männer, 25 Frauen). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme betrug das mittlere Alter der Patienten 60,5 Jahre (Standardabweichung  $\pm$  15,1 Jahre), und das mediane Alter betrug 63 Jahre (28 Jahre bis 86 Jahre). Die Blutentnahme wurde entweder vor der Chemotherapie oder in einem Chemotherapie-freien Intervall durchgeführt.

### 3.2.3 Korrelation von Ansprechen und hämatologischen Nebenwirkungen mit der Genexpression

Zuerst sollte die Frage beantwortet werden, ob hämatologische Nebenwirkungen und/oder Ansprechen auf die Chemotherapie mit den Genexpressionen der DNA-Reparaturgene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* korreliert sind. Diese Gene wurden ausgewählt, da sie bestimmende Faktoren für das klinische Ansprechen einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie darstellen. Dazu wurde zunächst die Basisexpression der drei DNA-Reparaturgene mittels quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR, Kapitel 2.2.6.8) in peripheren Blut-Lymphozyten von allen Patienten bestimmt. Anhand der Genexpressionen wurden die auswertbaren Patienten dann wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben in drei Gruppen pro Gen eingeteilt (Tabelle 3.1). Bei Patienten mit einer hohen Genexpression von *MGMT* war auch eine hohe Expression der Gene *MLH1* und *MSH2* zu beobachten. Ebenso war bei Patienten mit einer niedrigen Genexpression von *MGMT* auch die Expression der Gene *MLH1* und *MSH2* niedrig. Zur Normalisierung wurden zwei verschiedene Referenzgene (GAPDH und  $\beta$ -Aktin) eingesetzt, die eine hohe Korrelation ihrer mRNA-Expression zeigten ( $r=95$ ; Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson; Voraussetzung einer Normalverteilung lag vor). Interessanterweise wurden bei Patienten mit entweder hoher oder niedriger konstitutiver mRNA-Expression von

*MGMT*, *MLH1* und *MSH2* weniger hämatologische Nebenwirkungen beobachtet. Im Vergleich zu den Patienten mit mittlerer Genexpression ist diese Beobachtung auch nach Bonferroni-Korrektur noch statistisch signifikant ( $p=0,008-0,020$ ; exakter Fisher-Test; Tabelle 3.1). Generell haben hämatologische Nebenwirkungen nie zu einem Abbruch der Therapie geführt. Hämatologische Nebenwirkungen führten allerdings gelegentlich zu einem Aussetzen der Therapie, bis sich die Blutwerte wieder stabilisiert hatten.

Für die Korrelation der interindividuellen Unterschiede der mRNA-Expression mit dem Ansprechen wurden die Patienten nach den Kriterien der Welt-Gesundheits-Organisation (*World Health Organization*, 1979) in Ansprecher und Nicht-Ansprecher eingeteilt. Dreizehn Patienten sprachen auf die Chemotherapie an. Davon zeigten 3 Patienten eine komplette Remission, 4 eine partielle Remission und 6 einen stabilen Krankheitsverlauf. Bei 31 Patienten konnte kein Ansprechen beobachtet werden (progredienter Verlauf). Die Korrelation des Therapie-Ansprechens mit dem Status der mRNA-Expression der Gene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* zeigte im Gegensatz zu den hämatologischen Nebenwirkungen keine Assoziation ( $p=0,364-0,824$ ; exakter Fisher-Test; Tabelle 3.1). Aus diesen Daten ist zu schließen, dass hämatologische Nebenwirkungen durch Dacarbazin oder Temozolomid bei der Behandlung des kutanen Melanoms mit der konstitutiven Genexpression der DNA-Reparaturgene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* korrelieren. Das Therapie-Ansprechen korreliert hingegen nicht mit der Genexpression.

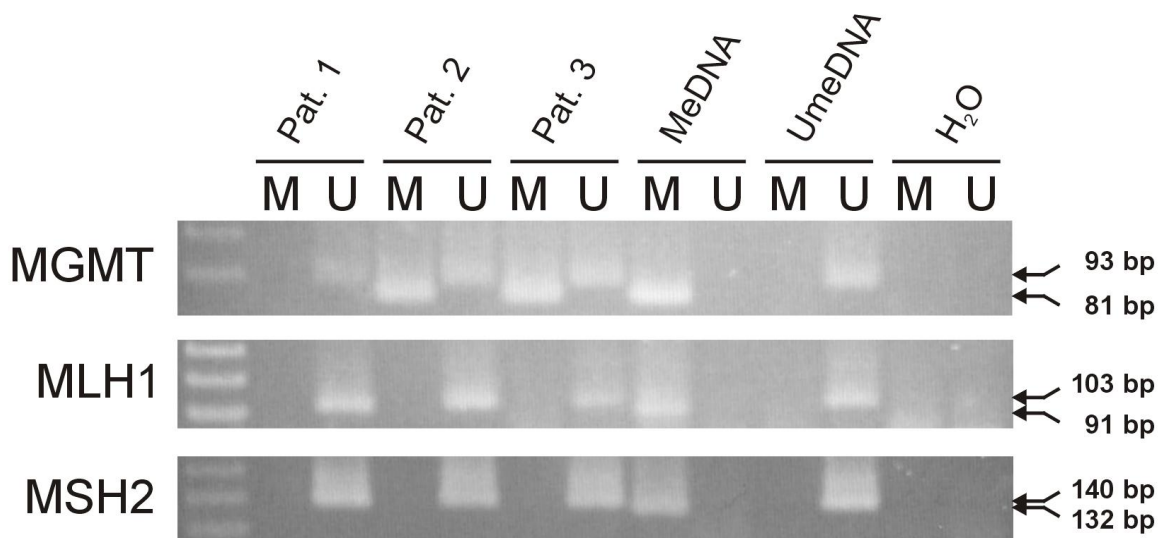
**Tabelle 3.1: Korrelation der Genexpression peripherer Blut-Lymphozyten von Melanom-Patienten mit hämatologischen Nebenwirkungen und Therapie-Ansprechen.**

Gen	Genexpression	Hämatologische Nebenwirkungen			Therapie-Ansprechen		
		Ja	Nein	p-Wert*	Ja	Nein	p-Wert
<b>MGMT</b>	Größer Mittelwert + Stabw	0	4	<b>0.008</b>	3	3	0.364
	Mittelwert ± Stabw	15	10		9	25	
	Kleiner Mittelwert – Stabw	0	3		1	3	
<b>MLH1</b>	Größer Mittelwert + Stabw	0	4	<b>0.008</b>	3	3	0.364
	Mittelwert ± Stabw	15	10		9	25	
	Kleiner Mittelwert – Stabw	0	3		1	3	
<b>MSH2</b>	Größer Mittelwert + Stabw	0	3	<b>0.020</b>	2	3	0.824
	Mittelwert ± Stabw	15	11		10	25	
	Kleiner Mittelwert – Stabw	0	3		1	3	

\*Auch nach Bonferroni-Korrektur noch signifikant. Stabw = Standardabweichung.

### 3.2.4 Bestimmung des Promotor-Methylierungsstatus von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2*

Nach der Analyse der Genexpression sollte die Frage beantwortet werden, ob die Variabilität der konstitutiven Genexpression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* durch Methylierung des Promotors bestimmt wird. Um den Methylierungsstatus in der Promotor-Region jedes der DNA-Reparaturgene im peripheren Blut aller Patienten zu bestimmen, wurde zunächst eine Bisulfit-Konversion genomischer DNA durchgeführt (Kapitel 2.2.6.7). Anschließend wurde die konvertierte DNA mittels methylierungsspezifischer PCR analysiert (Abbildung 3.1). Es konnte beobachtet werden, dass die Promotor-Region der Gene *MLH1* und *MSH2* in allen Patienten nicht methyliert vorlag. Dies korreliert gut damit, dass im peripheren Blut aller Patienten eine messbare Genexpression gezeigt werden konnte. Für die Promotor-Region von *MGMT* wurde bei 2 der 51 Patienten sowohl mit den methylierungsspezifischen- als auch mit den nicht-methylierungsspezifischen Primern eine Bande im Agarosegel festgestellt (Abbildung 3.1). Allerdings wurde keine erniedrigte mRNA-Expression von *MGMT* bei diesen 2 Patienten nachgewiesen. Folglich ist aus diesen Daten zu schließen, dass die Variabilität der konstitutiven Genexpression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* nicht durch Promotor-Methylierung bedingt wird.



**Abbildung 3.1: Nachweis des Promotor-Methylierungsstatus.** (M) Methylierungsspezifische PCR mit Primern für methylierte Promotor-Regionen. (U) Methylierungsspezifische PCR mit Primern für nicht-methylierte Promotor-Regionen. (MeDNA) DNA von normalen Lymphozyten, die *in vitro* mit SssI-Methyltransferase behandelt wurde und als Kontrolle für methylierte Allele diente. (UmeDNA) DNA von normalen Lymphozyten wurde als Kontrolle für nicht-methylierte Allele verwendet. (H<sub>2</sub>O) Kontrolle für PCR-Kontaminationen. (Pat. 1) Repräsentiert alle Patienten, die



eine konstitutiv nicht-methylierte Promotor-Region in allen drei Genen zeigten. (Pat. 2 und Pat. 3) Die beiden Patienten, die konstitutiv methylierte *MGMT* Promotor-Regionen, aber nicht-methylierte *MLH1* und *MSH2* Promotor-Regionen zeigten.

### 3.2.5 Bestimmung genetischer Varianten von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2*

Analog zum Promotor-Methylierungsstatus wurden genetische Varianten in den DNA-Reparaturgenen *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* auf ihre Korrelation mit der Genexpression des entsprechenden Gens untersucht. Zur Untersuchung der genetischen Varianten wurde der gesamte kodierende Bereich inklusive der Spleißstellen der drei DNA-Reparaturgene aller Patienten sequenziert. Insgesamt konnten 5 genetische Varianten im *MGMT*-Gen, 13 Varianten in *MLH1* und 7 Varianten in *MSH2* detektiert werden (Tabelle 3.2). Von den 13 Varianten, die im *MLH1*-Gen nachgewiesen wurden, sind 5 bisher nicht beschrieben gewesen und wurden damit neu identifiziert (g.10825C>A, g.10600delC, g.35399G>A, g.55037T>C und g.57141\_57144delCTT).

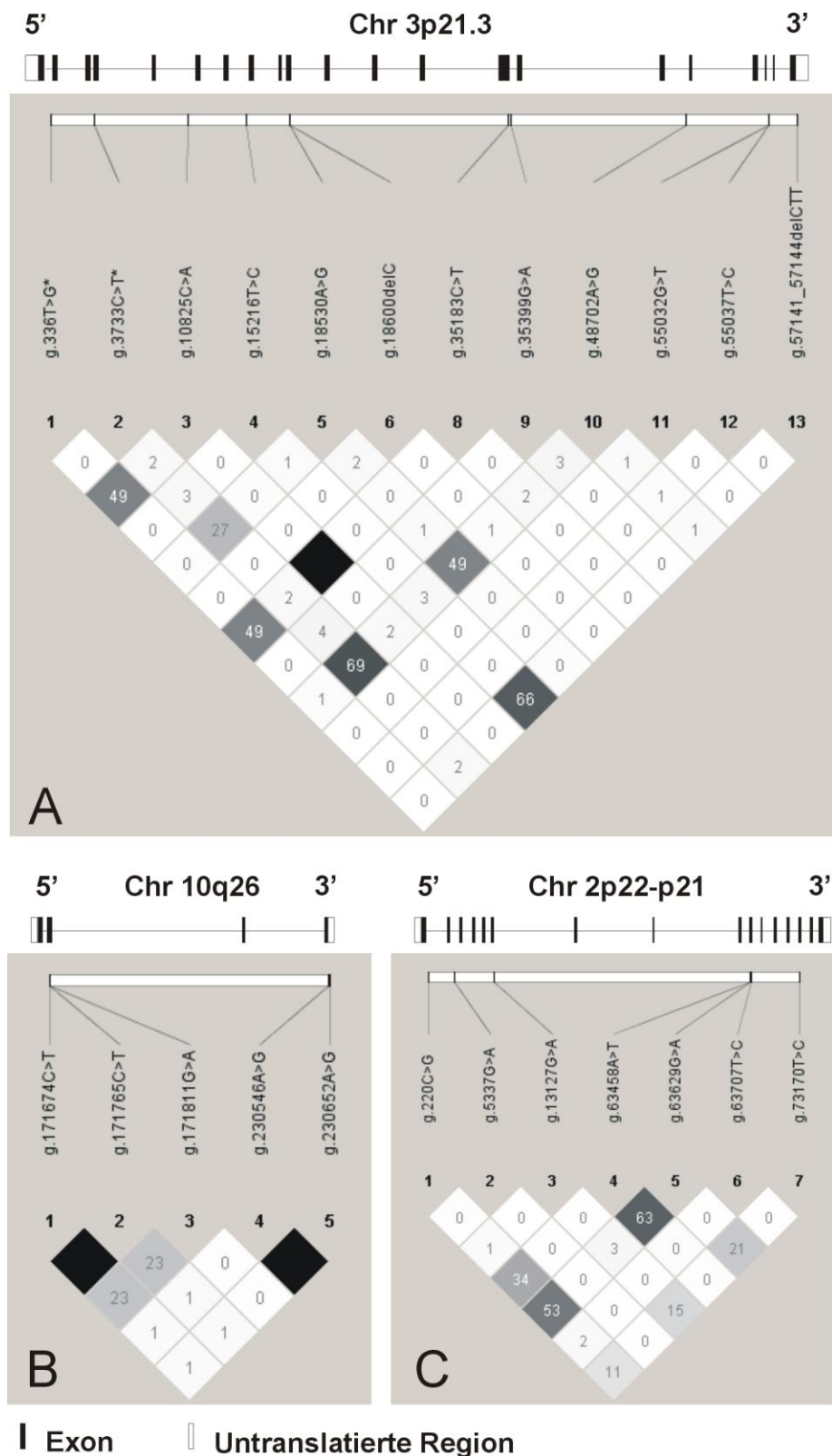
**Tabelle 3.2: Detektierte genetische Varianten in *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* von 51 Melanom-Patienten.**

<b>MGMT</b>	<b>rs-Nummer</b>	<b>Variante</b>	<b>Allel-Frequenz (berichtet in NCBI-Datenbank)</b>
Exon 2	rs1803965	g.171674C>T	0,078 (0,263)
Exon 2	rs12917	g.171765C>T (p.L84F)	0,078 (0,273)
Intron 2	rs2308328	g.171811G>A	0,020 (0,015)
Exon 4	rs2308321	g.230546A>G (p.I143V)	0,167 (0,100)
Exon 4	rs2308327	g.230652A>G (p.K178R)	0,167 (0,075)
<b>MLH1</b>	<b>rs-Nummer</b>	<b>Variante</b>	<b>Allel-Frequenz (berichtet in NCBI-Datenbank)</b>
Exon 2*	rs4647205	g.336T>G	0,010 (0,057)
Exon 4*	rs9852378	g.3733C>T	0,490 (0,443)
Intron 5		g.10825C>A	0,020
Intron 7	rs4647255	g.15216T>C	0,029 (0,028)
Exon 10	rs1799977	g.18530A>G (p.I219V)	0,314 (0,333)
Intron 10		g.18600delC	0,010
Exon 14	rs41294980	g.32268G>A (p.S406N)	0,010 (0,001)
Intron 14	rs7633154	g.35183C>T	0,020 (0,095)
Intron 15		g.35399G>A	0,039
Intron 16	rs9876116	g.48702A>G	0,480 (0,494)
Exon 19	rs1800146	g.55032G>T	0,020 (0,012)

Exon 19		g.55037T>C	0,010
Exon 21 (3'UTR)		g.57141_57144delCTT	0,020
<b>MSH2</b>	<b>rs-Nummer</b>	<b>Variante</b>	<b>Allel-Frequenz (berichtet in NCBI- Datenbank)</b>
Intron 1	rs2303426	g.220C>G	0,353 (0,492)
Exon 2	rs35898375	g.5337G>A	0,010 (N.D.)
Exon 6	rs4987188	g.13127G>A (p.G322D)	0,010 (0,016)
Intron 9	rs12998837	g.63458A>T	0,157 (0,091)
Intron 10	rs3732183	g.63629G>A	0,226 (0,499)
Intron 10	rs10183143	g.63707T>C	0,049 (0,031)
Intron 12	rs2303428	g.73170T>C	0,059 (0,234)

\* Diese beiden Polymorphismen wurden früher als exonische Varianten angesehen, werden aber jetzt als intronisch betrachtet. „rs-Nummer“ bezieht sich auf Eintragungen der Varianten in der dbSNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). „g“ oder „p“ geben die Position der Variante in der Gen- bzw. Proteinsequenz an (mit „A“ des „ATG“ Translations-Startkodons als Position „1“).

Die Visualisierung genetischer Kopplungsungleichgewichte mittels HaploView (Whitehead Institute for Biomedical Research Cambridge, MA, USA) zeigte keine extensiven Haplotyp-Blöcke (Abbildung 3.2). Lediglich für wenige Varianten wurde eine Kopplung beobachtet. Es konnte keine Assoziation der Genexpression mit einer der genetischen Varianten nachgewiesen werden.



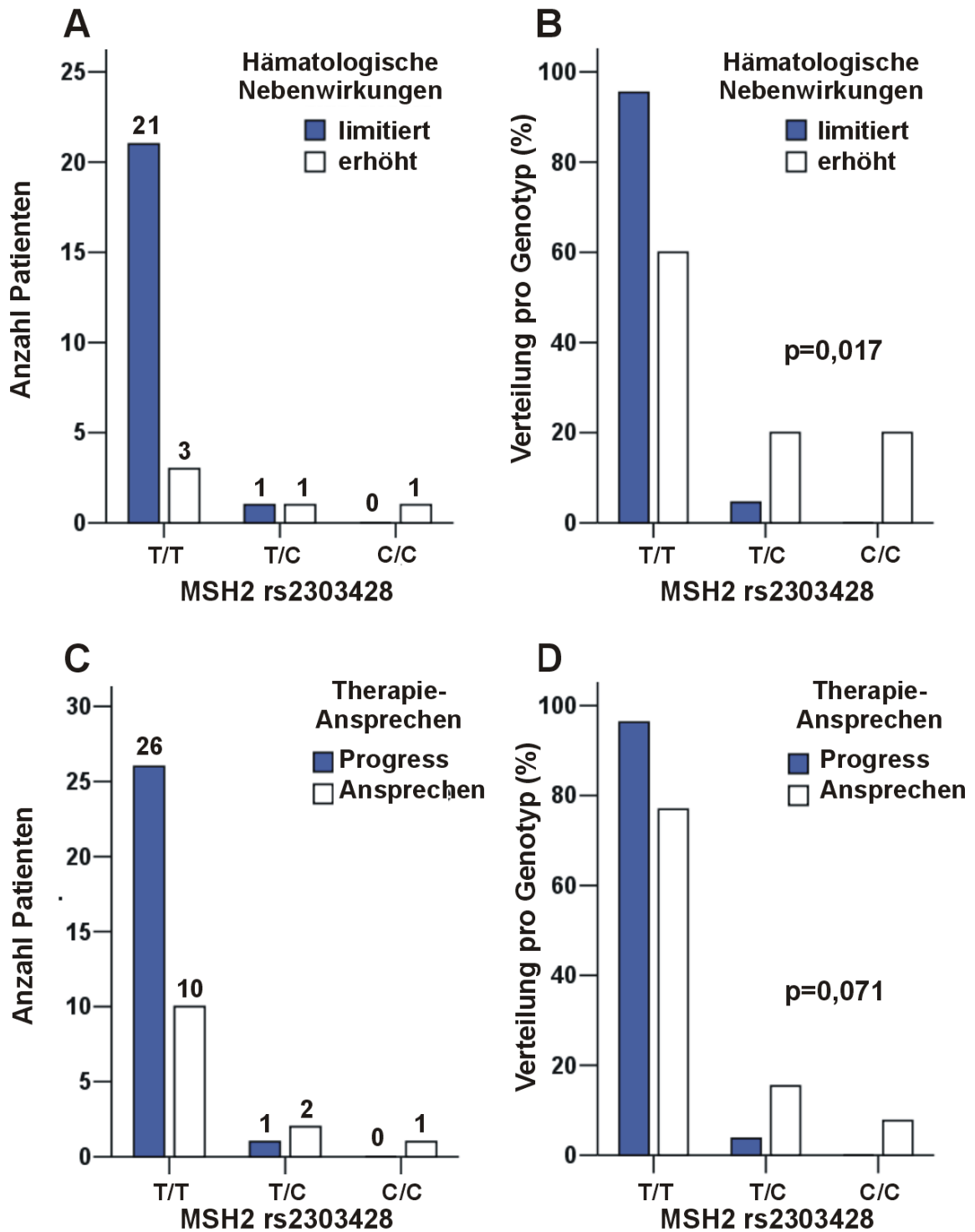
**Abbildung 3.2: Paarweises Kopplungsungleichgewicht der detektierten genetischen Varianten mittels HaploView 4.1.** Der obere Teil zeigt jeweils die Lokalisation der Varianten im entsprechenden Gen. Darunter zeigen die Rauten die paarweisen  $R^2$ -Werte. (A) *MLH1*; \* Diese beiden Polymorphismen wurden früher als exonische Varianten angesehen, werden aber jetzt als intronisch betrachtet. (B) *MGMT*, (C) *MSH2*. Die Positions-Angaben der Varianten beziehen sich auf das „A“ des „ATG“ Translations-Startkodons als Position „1“. Dies entspricht Position 131224508 auf Chromosom 10 für *MGMT*, 37010043 auf Chromosom 3 für *MLH1* und 47483836 auf Chromosom 2 für *MSH2* (nach NCBI Genome Build 36.3).

### 3.2.6 Korrelation von Ansprechen und hämatologischen Nebenwirkungen mit Genvarianten

Nachdem die genetischen Varianten identifiziert worden waren, konnte nun die Frage nach der Korrelation der Varianten mit hämatologischen Nebenwirkungen und Therapie-Ansprechen gestellt werden. Ein exakter Cochran-Armitage Trendtest, der die Anzahl der Allel-Varianten berücksichtigt, wurde angewendet, um Assoziationen genetischer Varianten mit begrenzten oder erhöhten hämatologischen Nebenwirkungen (Kapitel 2.2.1) zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass die intronische *MSH2*-Genvariante g.73170C nominal signifikant mit erhöhten hämatologischen Nebenwirkungen assoziiert war ( $p=0.017$ , Abbildung 3.3 A-D). Träger der Allel-Variante g.73170C im *MSH2*-Gen (rs2303428) neigten eher zu hämatologischen Nebenwirkungen bei einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Behandlung. Darüber hinaus wurde eine Subgruppen-Analyse durchgeführt, die Assoziationen der Variante mit reduzierten Hämoglobin-Werten ( $p=0.037$ ), Thrombozytopenie ( $p=0.067$ ) und Leukopenie ( $p=0.032$ ) zeigte.

Um die Assoziation der detektierten Varianten mit dem Therapie-Ansprechen zu bestimmen, wurde ebenfalls der exakte Cochran-Armitage Trendtest angewendet. Die *MSH2*-Variante g.73170C, die signifikant mit hämatologischen Nebenwirkungen assoziiert war, verpasste nur knapp eine signifikante Assoziation mit besserem Ansprechen auf die Chemotherapie mit Dacarbazin oder Temozolomid ( $p=0.071$ , Abbildung 3.3 C-D). Die Betrachtung der Haplotypen im *MSH2*-Gen, in welchem die Kopplungsungleichgewichte nur limitiert sind, brachte keine signifikanten Assoziationen mit hämatologischen Nebenwirkungen und Ansprechen (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die identifizierte *MSH2*-Genvariante g.73170T>C als ein viel versprechender Kandidat für weitere Untersuchungen, ob sie als Tumor-unabhängiger molekularer Marker einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie geeignet ist, angesehen werden sollte.



**Abbildung 3.3: Assoziation der MSH2-Genvariante rs2303428 (g.73170T>C) mit hämatologischen Nebenwirkungen und Therapie-Ansprechen.** (A-B) Hämatologische Nebenwirkungen in Assoziation mit den unterschiedlichen Genotypen ( $p=0,017$ ). (A) Absolute Anzahl der Patienten mit unterschiedlichen Genotypen, aufgeteilt in Patienten mit begrenzten bzw. erhöhten hämatologischen Nebenwirkungen. (B) Relative Verteilung begrenzter bzw. erhöhter hämatologischer Nebenwirkungen auf die drei Genotypen. (C-D) Therapie-Ansprechen in Assoziation mit den unterschiedlichen Genotypen ( $p=0,071$ ). (C) Absolute Anzahl der Patienten mit unterschiedlichen Genotypen, aufgeteilt in Ansprecher und Nicht-Ansprecher (Progress). (D) Relative Verteilung von Ansprechern und Nicht-Ansprechern (Progress) auf die drei Genotypen.

### 3.3 Zellkultur-Untersuchungen

#### 3.3.1 Übersicht

Die *in vivo* Untersuchungen mit Blut von Dacarbazin- oder Temozolomid-behandelten Melanom-Patienten wurden durch *in vitro* Untersuchungen mit Zellkulturen ergänzt. Verwendet wurden humane Melanom-Zellen, die aus Lymphknoten-Metastasen von verschiedenen Patienten gewonnen wurden. Alle Zelllinien sind adhärent wachsend und wurden unter identischen Bedingungen kultiviert.

#### 3.3.2 Sensitivitätstestung

Um Aussagen über die Sensitivität von Melanom-Zelllinien gegenüber Temozolomid treffen zu können, wurde die Vitalität der Zellen nach Behandlung mit Temozolomid im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels MTT-Assay (Kapitel 2.2.3) bestimmt. Ziel dieser Experimente war es, die Temozolomid-Konzentrationen zu bestimmen, bei denen 50 % der Zellen überleben. Außerdem wurden zwei Behandlungsschemata verglichen (Kapitel 2.2.2.6).

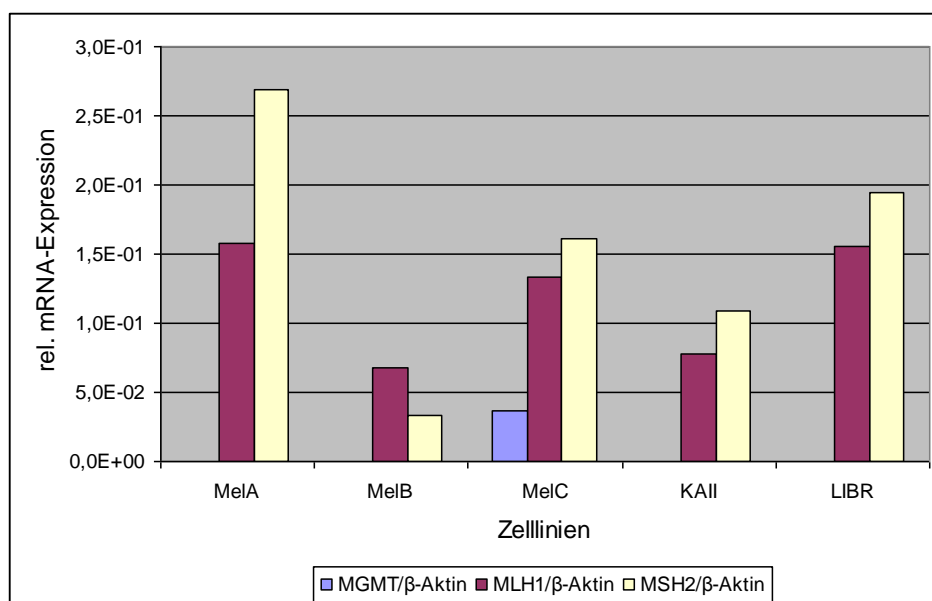
Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass für die Behandlung der Zelllinien MeIA, MeIB und MeIC höhere Temozolomid-Konzentrationen für die fünfmalige Temozolomid-Gabe im Vergleich zur einmaligen Temozolomid-Gabe eingesetzt werden mussten, um ein zelluläres Überleben von 50 % zu erzielen. Die Zelllinien KAII und LIBR zeigten ein differentielles Bild. Hier mussten höhere Temozolomid-Konzentrationen für die einmalige Gabe im Vergleich zur fünfmaligen Gabe eingesetzt werden. Insgesamt zeigen die niedrigeren Temozolomid-Konzentrationen für die Zelllinien KAII und LIBR im Vergleich zu den Temozolomid-Konzentrationen der übrigen drei Zelllinien eine höhere Sensitivität dieser Zelllinien gegenüber Temozolomid.

Tabelle 3.3: Temozolomid-Konzentrationen, bei denen etwa die Hälfte der Zellen überlebt.

Zelllinie	1 x Temozolomid	5 x Temozolomid
MelA	100 $\mu$ M	500 $\mu$ M
MelB	300 $\mu$ M	500 $\mu$ M
MelC	300 $\mu$ M	800 $\mu$ M
KAI1	150 $\mu$ M	50 $\mu$ M
LIBR	150 $\mu$ M	40 $\mu$ M

### 3.3.3 Untersuchung der Genexpression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2*

Die Frage, ob Sensitivitätsunterschiede gegenüber Temozolomid zwischen den Melanom-Zelllinien auf unterschiedliche Expressionen der DNA-Reparaturgene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* gegründet sind, sollte durch quantitative Bestimmung der mRNA untersucht werden. Mittels quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR, Kapitel 2.2.6.8) wurde zunächst die Basisexpression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* bestimmt (Abbildung 3.4). Die Expression der Basenfehlpaarungs-Reparaturgene *MLH1* und *MSH2* konnte in allen untersuchten Melanom-Zelllinien nachgewiesen werden. Das DNA-Reparatur-Gen *MGMT* konnte ausschließlich in der Zelllinie MelC in detektierbarer Menge beobachtet werden.



**Abbildung 3.4: Basisexpression der Gene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* in den untersuchten Melanom-Zelllinien.** Aus unbehandelten Melanom-Zellen (MelA, MelB, MelC, KAI1, LIBR) wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde in der quantitativen *real time* PCR eingesetzt, um die mRNA-Expression der Gene *MGMT* (blau), *MLH1* (rot) und *MSH2* (gelb) zu bestimmen. Die Expressionen wurden auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin normalisiert.

Zur Untersuchung, ob durch Temozolomid-Behandlung eine Verstärkung oder Reduktion der mRNA-Expression der drei untersuchten Gene induziert wird, wurden die Zellen zunächst mit Temozolomid (Temozolomid-Konzentrationen für einmalige Gabe, siehe Tabelle 3.3) behandelt und nach 30 Min., 1, 2, 4, 6, 10 und 24 Std. erneut die Expression bestimmt. Es konnte keine signifikante Veränderung der Expression der Gene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* beobachtet werden (Daten siehe Anhang 8.1).

Ein einziger Behandlungszyklus mit Temozolomid kann eine erhöhte Resistenz von Melanom-Zellen gegenüber weiteren Behandlungszyklen verursachen (Alvino et al., 2006). Diese erhöhte Resistenz wird unter anderem mit einer erhöhten *MGMT*-Expression begründet. Ob es in den hier verwendeten Melanom-Zelllinien zu einer veränderten Expression der Reparaturgene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* nach einem kompletten Behandlungszyklus kommt, wurde untersucht, indem die Zellen nach der einmaligen beziehungsweise fünfmaligen Behandlung mit Temozolomid (Konzentrationen siehe Tabelle 3.3) bis zur Subkonfluenz weiter kultiviert wurden und dann die mRNA-Expression bestimmt wurde. Es konnte keine signifikante Veränderung der Genexpression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* im Vergleich zu unbehandelten beziehungsweise DMSO-behandelten Zellen beobachtet werden (siehe Anhang Tabelle 8.6).

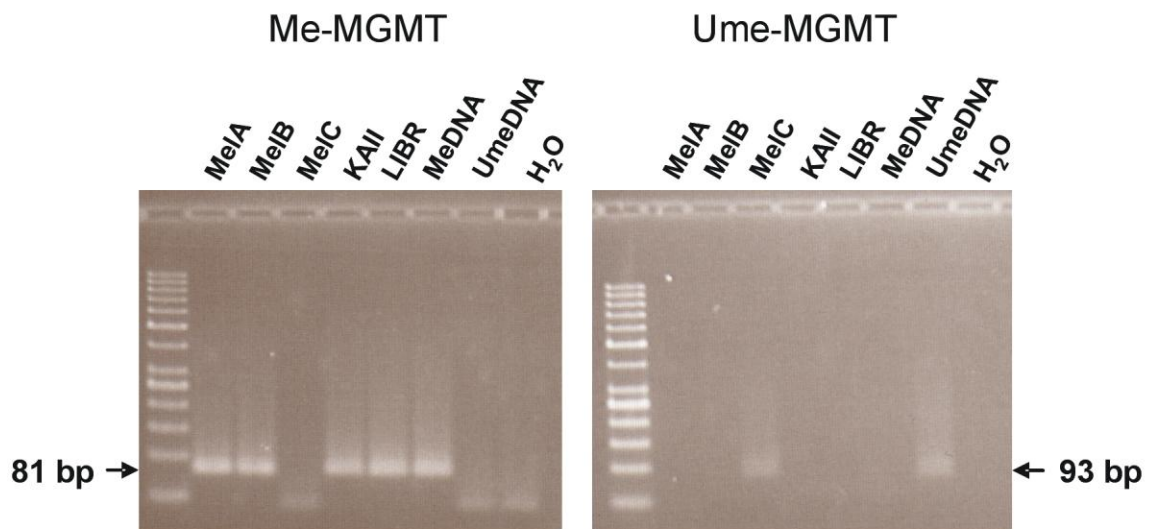
#### **3.3.4 Bestimmung des Promotor-Methylierungsstatus von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2***

Neben der Genexpression sollte auch der Promotor-Methylierungsstatus der Gene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* analysiert werden. Um den Methylierungsstatus in der Promotor-Region jedes der DNA-Reparaturgene in den Melanom-Zelllinien MeIA, MeIB, MeIC, KAII und LIBR zu bestimmen, wurde zunächst eine Bisulfit-Konversion genomischer DNA durchgeführt (Kapitel 2.2.6.7). Anschließend wurde die konvertierte DNA mittels Methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR) analysiert.

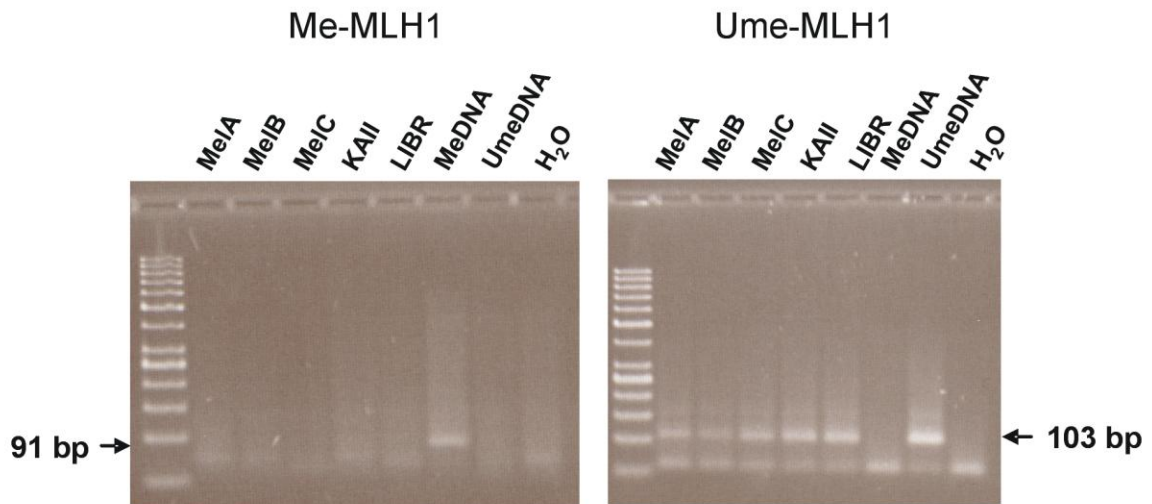
Für das Gen *MGMT* wurde in allen Zelllinien außer in MeIC nach MS-PCR mit Primern spezifisch für methylierte Promotor-Regionen eine Bande im Agarosegel detektiert (Abbildung 3.5). Mit Primern spezifisch für nicht-methylierte Promotor-



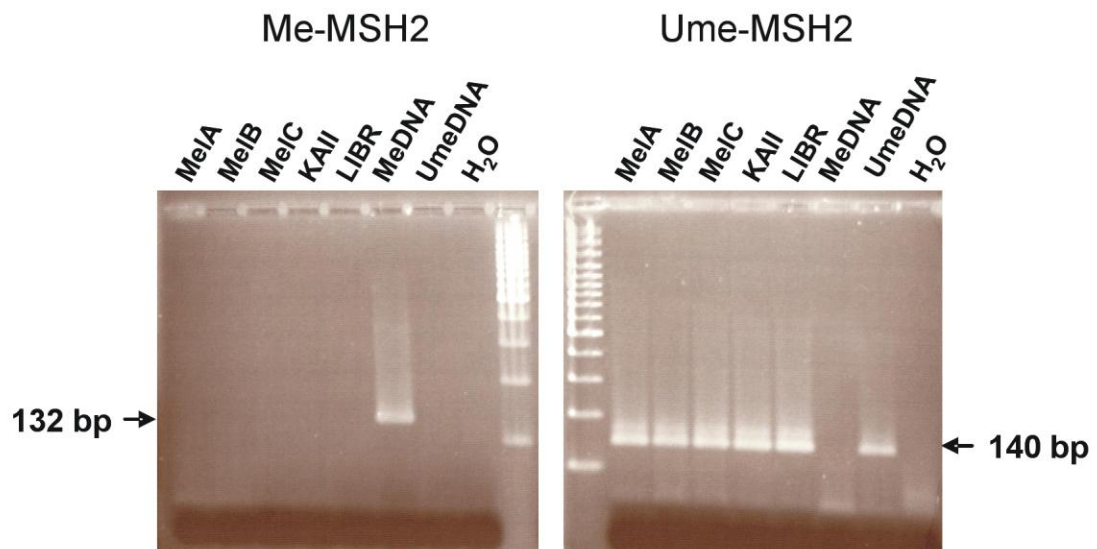
Regionen konnte nur für die Zelllinie MeIC eine Bande im Agarosegel nachgewiesen werden. Daraus ist abzuleiten, dass der Promotor von *MGMT* nur in der Zelllinie MeIC nicht-methyliert vorliegt. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der Beobachtung der Genexpressions-Analysen (Abbildung 3.4) überein, da nur in MeIC eine mRNA-Expression von *MGMT* nachgewiesen werden konnte. Für die Basenfehlpaarungs-Reparaturgene *MLH1* und *MSH2* wurden für alle Zelllinien ausschließlich Banden in Agarosegel nach Verwendung von Primern spezifisch für nicht-methylierte Promotor-Regionen beobachtet (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7). Diese Ergebnisse passen ebenfalls mit dem Ergebnis der Genexpressions-Analysen, die gezeigt haben, dass alle Zelllinien die Gene *MLH1* und *MSH2* exprimieren, zusammen.



**Abbildung 3.5: Nachweis des Promotor-Methylierungsstatus von *MGMT* in Melanom-Zelllinien.** (Me-MGMT) Methylierungsspezifische PCR mit Primern für methylierte Promotor-Regionen. (Ume-MGMT) Methylierungsspezifische PCR mit Primern für nicht-methylierte Promotor-Regionen. (MeDNA) DNA von normalen Lymphozyten, die *in vitro* mit SssI-Methyltransferase behandelt wurde und als Kontrolle für methylierte Allele diente. (UmeDNA) DNA von normalen Lymphozyten wurde als Kontrolle für nicht-methylierte Allele verwendet. (H<sub>2</sub>O) Kontrolle für PCR-Kontaminationen.



**Abbildung 3.6: Nachweis des Promotor-Methylierungsstatus von *MLH1* in Melanom-Zelllinien.** (Me-*MLH1*) Methylierungsspezifische PCR mit Primern für methylierte Promotor-Regionen. (Ume-*MLH1*) Methylierungsspezifische PCR mit Primern für nicht-methylierte Promotor-Regionen. (MeDNA) DNA von normalen Lymphozyten, die *in vitro* mit SssI-Methyltransferase behandelt wurde und als Kontrolle für methylierte Allele diente. (UmeDNA) DNA von normalen Lymphozyten wurde als Kontrolle für nicht-methylierte Allele verwendet. (H<sub>2</sub>O) Kontrolle für PCR-Kontaminationen.



**Abbildung 3.7: Nachweis des Promotor-Methylierungsstatus von *MSH2* in Melanom-Zelllinien.** (Me-*MSH2*) Methylierungsspezifische PCR mit Primern für methylierte Promotor-Regionen. (Ume-*MSH2*) Methylierungsspezifische PCR mit Primern für nicht-methylierte Promotor-Regionen. (MeDNA) DNA von normalen Lymphozyten, die *in vitro* mit SssI-Methyltransferase behandelt wurde und als Kontrolle für methylierte Allele diente. (UmeDNA) DNA von normalen Lymphozyten wurde als Kontrolle für nicht-methylierte Allele verwendet. (H<sub>2</sub>O) Kontrolle für PCR-Kontaminationen.

### 3.3.5 Untersuchungen der Apoptoserate mittels Durchflusscytometrie

Ziel einer Behandlung mit Temozolomid ist es, durch frustrane Basenfehlpaarungs-Reparatur von O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukten, Apoptose zu

induzieren. Wie stark und zu welchem Zeitpunkt nach der Temozolomid-Behandlung der Zelllinien Apoptose beziehungsweise Nekrose induziert wird, sollte mittels Durchflusscytometrie ermittelt werden. Des Weiteren sollten eventuelle Unterschiede in den Behandlungsschemata (Kapitel 2.2.2.6) detektiert werden. Dazu wurden für beide Behandlungsschemata die gleichen Temozolomid-Konzentrationen (der jeweils höhere Wert, der mittels Sensitivitätstestung in Kapitel 3.3.2 ermittelten Werte) je Zelllinie verwendet. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen bis zur Subkonfluenz weiter kultiviert.

Bei der Zelllinie MeIA war nach einmaliger Temozolomid-Behandlung eine Apoptose-Induktion nach 48 Std. zu beobachten (46,2 % Annexin V-gefärbte Zellen, 39,4 % ungefärbte, vitale Zellen; alle Daten sind im Anhang in Kapitel 8.2 aufgeführt). Nach fünfmaliger Behandlung zeigte sich die Apoptose-Induktion etwas verzögert nach 72 Std. (47,6 % Annexin V-gefärbte Zellen, 29,0 % vitale Zellen). Nach 48 Stunden waren noch 72,3 % ungefärbte Zellen zu beobachten. Im Vergleich zu den fünfmal behandelten MeIA-Zellen wuchsen die einmal behandelten MeIA-Zellen nach Behandlung nicht wieder zu einer subkonfluenten Zellpopulation heran. Bei der Zelllinie MeIB war die Induktion der Apoptose durch die einmalige Behandlung deutlich stärker ausgeprägt im Vergleich zur fünfmaligen Temozolomid-Behandlung. Nach 72 Std. waren nach einmaliger Behandlung nur noch 54,0 % der Zellen vital (ungefärbt) und nach fünfmaliger Behandlung noch 74,9 %. Nach 96 Std. war der Unterschied der Menge vitaler Zellen sogar noch stärker ausgeprägt (21,8 % bzw. 73,5 %). Bei der Zelllinie MeIC war eine relativ gleichmäßige Abnahme vitaler Zellen zu beobachten. Nach 48 Std. waren noch 65,8 % (einmal und fünfmal Temozolomid) und nach 72 Std. 45,9 % (einmal Temozolomid) beziehungsweise 41,6 % (fünfmal Temozolomid) ungefärbte Zellen vorhanden. Lediglich eine geringe Abnahme vitaler Zellen war bei der Zelllinie KAII festzustellen. Nach einmaliger Behandlung wurde der niedrigste Wert nach 96 Std. erreicht (70,4 %). Nach fünfmaliger Behandlung betrug der Anteil vitaler Zellen nach 96 Std. 66,2 %, sank dann aber weiter bis auf 57,4 % nach 168 Std.. Ein ähnliches Bild wie für die Zelllinie KAII zeigte sich auch bei der Zelllinie LIBR nach Temozolomid-Behandlung. Der niedrigste Wert vitaler Zellen nach einmaliger Behandlung wurde nach 96 Std. (77,8 %) beobachtet. Nach fünfmaliger Behandlung waren nach 96 Std. noch 65,6 % der Zellen vital.

Der Anteil vitaler Zellen sank hier aber noch weiter auf 52,9 % nach 168 Std.. Es bleibt also festzuhalten, dass die Zelllinien MeIA und MeIB eine stärkere Abnahme vitaler Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung im Vergleich zur fünfmaligen Behandlung zeigten. Bei der Zelllinie MeIC war die Abnahme vitaler Zellen in beiden Behandlungsschemata etwa gleich und in den Zelllinien KAll und LIBR war eine stärkere Abnahme vitaler Zellen nach fünfmaliger Behandlung zu beobachten. Dies entspricht also im Wesentlichen den Daten der Sensitivitätstestung (Tabelle 1.1) und belegt die Hypothese, dass die Zellen hauptsächlich durch Apoptose und nicht Nekrose zugrunde gehen.

### 3.3.6 Untersuchungen der Zellzyklusphasenverteilung mittels Durchflusscytometrie

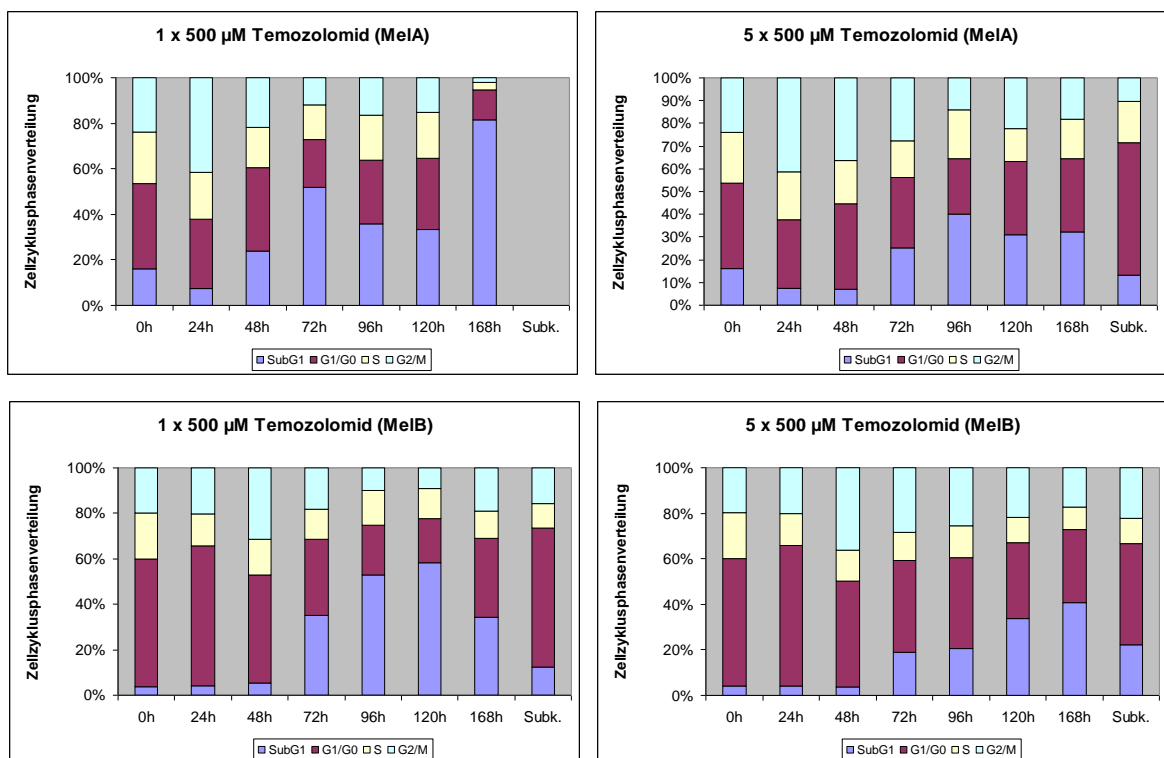
Da die Behandlung mit Temozolomid auch die Zellzyklusphasenverteilung der behandelten Zellen beeinflussen kann, sollte mit Hilfe der Durchflusscytometrie die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Phasen im Zellzyklus untersucht werden. Ziel war es, eventuelle Verschiebungen der Zellzyklusphasen nach Temozolomid-Behandlung zu dokumentieren als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Sensitivitäten (Tabelle 3.3). Dazu wurden für beide Behandlungsschemata die gleichen Temozolomid-Konzentrationen je Zelllinie verwendet (der jeweils höhere Wert, der mittels Sensitivitätstestung in Kapitel 3.3.2 ermittelten Werte). Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen bis zur Subkonfluenz weiter kultiviert.

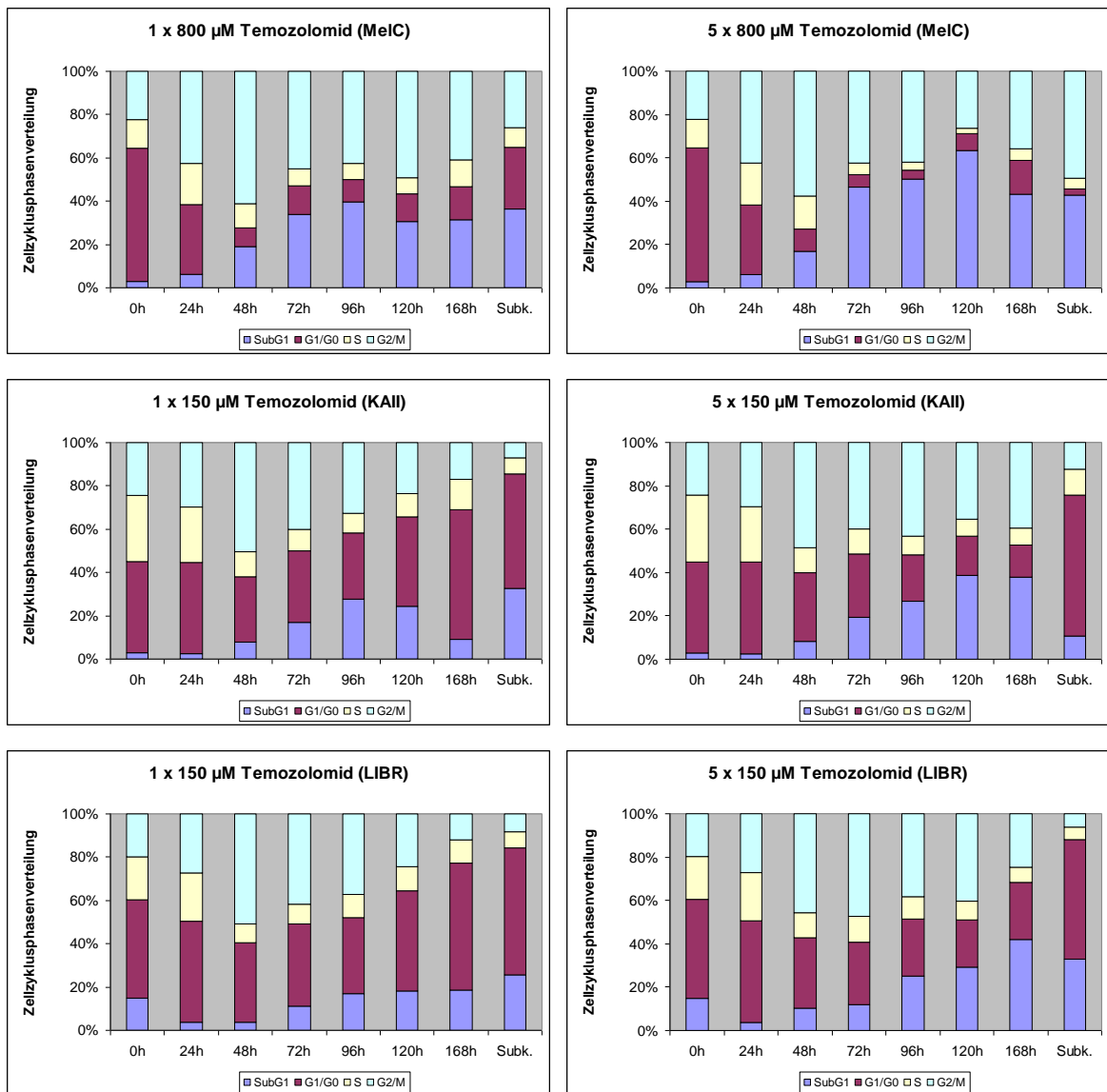
Die Tage vom Zeitpunkt der Medium-Zugabe - ohne Temozolomid - bis zum Zeitpunkt der Subkonfluenz sind in (Tabelle 3.4) aufgeführt. Außer der Zelllinie MeIA, die nach einmaliger Temozolomid-Behandlung nicht wieder bis zur Subkonfluenz auswuchs, dauerte es bei allen Zelllinien nach fünfmaliger Behandlung länger bis zur Subkonfluenz als nach einmaliger Behandlung.

**Tabelle 3.4: Tage bis zur Subkonfluenz.**

<b>Zelllinie</b>	<b>MeIA</b>	<b>MeIB</b>	<b>MeIC</b>	<b>KAll</b>	<b>LIBR</b>
1 × TMZ	-	7	5	5	3
5 × TMZ	31	15	7	15	13

In allen untersuchten Melanom-Zelllinien wurde 24-48 Std. nach Temozolomid-Behandlung ein unterschiedlich stark ausgeprägter Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase beobachtet. Dies galt sowohl für die einmalige Behandlung als auch für die fünfmalige Behandlung (Abbildung 3.8). In den Zelllinien MelA und MelB war der G<sub>2</sub>/M-Arrest weniger stark ausgeprägt als in den anderen drei Zelllinien. Am stärksten war die Verschiebung von der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase zur G<sub>2</sub>/M-Phase in der Zelllinie MelC. Leicht verzögert war in allen Zelllinien nach etwa 48-72 Std. eine deutliche Zunahme des SubG<sub>1</sub>-Peaks zu beobachten. Beim Vergleich der beiden Behandlungsschemata sind keine gravierenden Unterschiede festgestellt worden. Die Zelllinie MelA ist nach der einmaligen Temozolomid-Behandlung nicht wieder zu einer subkonfluenten Population ausgewachsen, so dass hier zu diesem Zeitpunkt keine Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung vorgenommen werden konnte. Für die Zelllinie MelC war die stärkste Abnahme der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase zu beobachten. Zum Zeitpunkt der Subkonfluenz hatte das Verhältnis der Zellen in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase nach einmaliger Temozolomid-Behandlung schon wieder etwas zugenommen, während es nach fünfmaliger Behandlung noch sehr gering war (Abbildung 3.8, MelC).





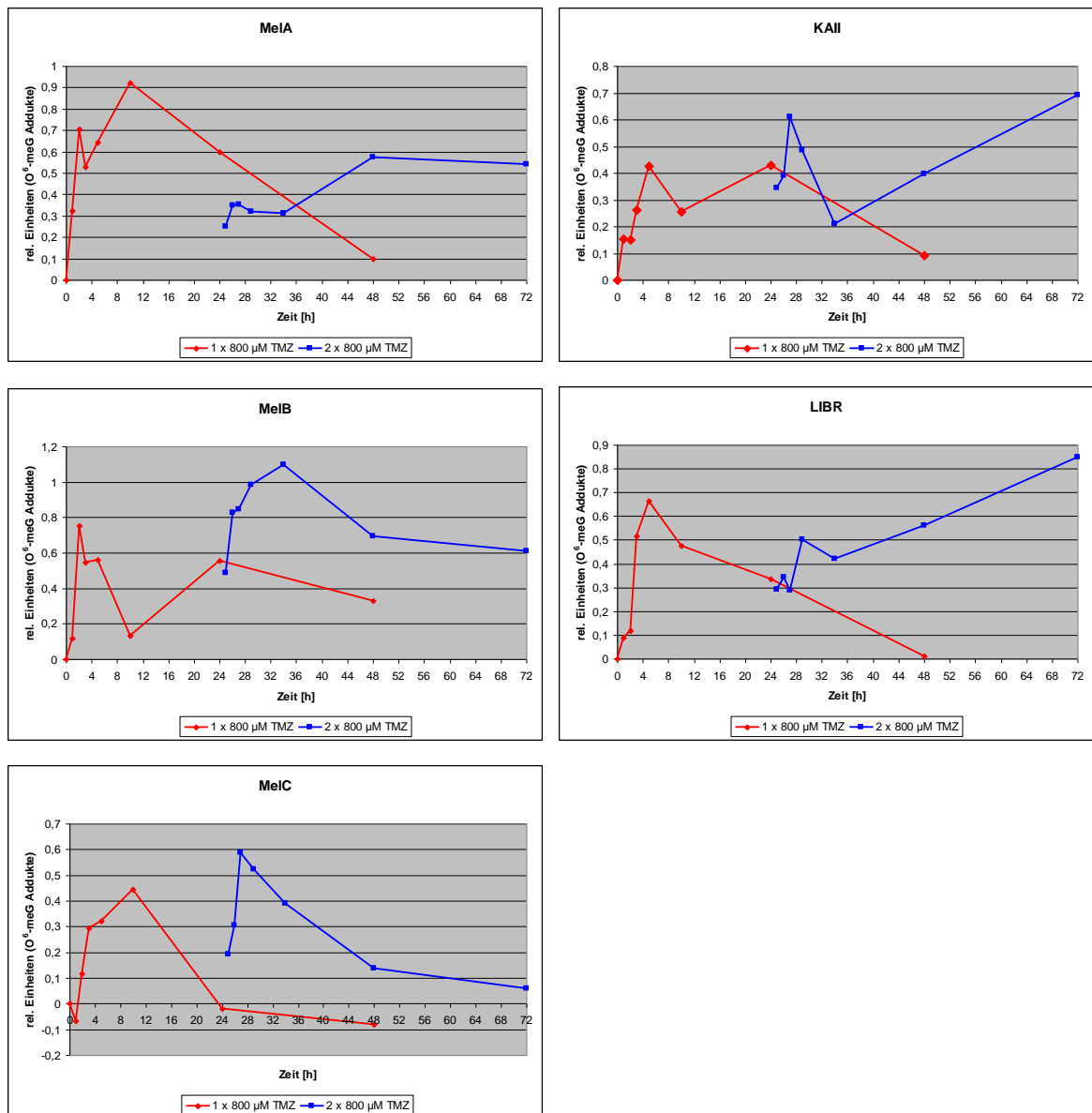
**Abbildung 3.8: Analyse der Zellzyklusphasenverteilung nach Temozolomid-Behandlung.** Die Melanom-Zelllinien MeIA, MeIB, MeIC, KAll und LIBR wurden einmal, bzw. fünfmal mit Temozolomid behandelt und die Verteilung der Zellen in die unterschiedlichen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (Subk.) Zeitpunkt der Subkonfluenz nach Temozolomid-Behandlung. (blau) SubG<sub>1</sub>-Phase. (rot) G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase. (gelb) S-Phase. (türkis) G<sub>2</sub>/M-Phase.

### 3.3.7 Quantitative Bestimmung der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte

Der Frage, wie schnell und wie viele O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte nach Behandlung der Zellen mit Temozolomid entstehen und wie schnell diese Schäden wieder eliminiert werden, sollte mit Hilfe der Immunocytochemie (Kapitel 2.2.5) nachgegangen werden. Dazu wurden alle Melanom-Zelllinien (MeIA, MeIB, MeIC, KAll und LIBR) mit 800 µM Temozolomid behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung die Menge an O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukten quantifiziert. Nach 24 Std. wurde ein Teil der Zellen erneut mit 800 µM

Temozolomid behandelt. Kontroll-Zellen wurden mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO behandelt.

Nach der ersten Behandlung war in allen Zelllinien innerhalb der ersten 5-10 Std. ein starker Anstieg der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte zu beobachten (Abbildung 3.9). Diese O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Schäden wurden in der Folge in allen Zelllinien nahezu vollständig wieder eliminiert. Nach der zweiten Behandlung mit Temozolomid war lediglich in den Zelllinien MeIB und MeIC in den ersten 5-10 Std. nach Temozolomid-Gabe erneut eine deutliche Zunahme der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte festzustellen und in der Folge eine Abnahme der Schäden. In den Zelllinien MeIA, KAI und LIBR stieg die Menge an O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukten nur langsam wieder an. Eine Abnahme konnte in diesen Zelllinien innerhalb von 48 Std. nach der zweiten Temozolomid-Behandlung (bis 72 Std. nach der ersten Temozolomid-Behandlung) nicht beobachtet werden. Wenn man von der ersten Behandlung und der zweiten Behandlung jeweils die Zeitpunkte 24 Std. und 48 Std. nach der Temozolomid-Gabe betrachtet, fällt auf, dass nach der zweiten Behandlung jeweils mehr Schäden bestehen blieben als nach der ersten Behandlung. Dieser Unterschied fällt 48 Std. nach Temozolomid-Gabe in den Zelllinien MeIA, KAI und LIBR besonders stark aus (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9: Quantitative Bestimmung der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte mittels Immuncytochemie.** Die Melanom-Zelllinien MeIA, MeIB, MeIC, KAll und LIBR wurden jeweils mit 800 µM Temozolomid behandelt und dann in einer Kinetik die Menge an O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukten quantifiziert. Nach 24 Std. wurde ein Teil der Zellen erneut mit 800 µM Temozolomid behandelt. (TMZ) Temozolomid, (O<sup>6</sup>-meG) O<sup>6</sup>-Methylguanin.

### 3.3.8 Untersuchung der Genexpression von ABCB1 (MDR1)

Die Beteiligung zellulärer Membran-Transporter bei der Resistenz von Melanom-Zellen gegenüber Temozolomid ist noch weitgehend unklar. Die Frage, ob einer der wichtigsten *Efflux*-Transporter ABCB1 (ATP-bindende Kasette B1, MDR1) eine Rolle bei der Vermittlung von Chemoresistenz der Melanom-Zelllinien gegenüber Temozolomid spielt, sollte durch quantitative Bestimmung der mRNA untersucht werden. Dazu wurden die Melanom-Zelllinien einmal mit Temozolomid



---

(Temozolomid-Konzentrationen für einmalige Gabe, siehe Tabelle 3.3) behandelt und die Expression von *ABCB1* nach 30 Min., 1, 2, 4, 6, 10 und 24 Std. mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt (Daten siehe Anhang 8.3). Zu denselben Zeitpunkten wurde auch die Expression unbehandelter Kontroll-Zellen und DMSO-behandelter Kontroll-Zellen bestimmt. Alle Zelllinien exprimierten *ABCB1*. Es konnte aber keine signifikante Veränderung der Expression von *ABCB1* nach Temozolomid-Behandlung beobachtet werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Übersicht

Die Prognose für Patienten mit kutanem Melanom im Stadium IV ist außerordentlich schlecht (Keilholz et al., 2001, Lee et al., 2000). Die Standardtherapie mit Dacarbazin oder dem alternativen Chemotherapeutikum Temozolomid wird häufig von Nebenwirkungen begleitet und führt nur zu einem mäßigen Therapie-Ansprechen (Garbe und Eigentler, 2007). Die Wirkung von Dacarbazin oder Temozolomid ist abhängig von DNA-Reparatur-Mechanismen, wobei der direkten Reversion durch die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und der Basenfehlarungs-Reparatur (MMR, *mismatch repair*) eine entscheidende Rolle zufällt (Kaina et al., 2007). In dieser Arbeit ging es darum, Tumor-unabhängige Biomarker zu identifizieren, die das Ansprechen und eventuelle hämatologische Nebenwirkungen einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie vorhersagen können und damit als Entscheidungshilfe bei der Auswahl der Therapie dienen sollen.

An der Wirkung von Temozolomid bei der Behandlung des kutanen Melanoms sind, abgesehen von der MGMT und der MMR, offensichtlich noch weitere Faktoren beteiligt (Kato et al., 2007, Naumann et al., 2009). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Sensitivitäten von verschiedenen Melanom-Zelllinien gegenüber Temozolomid beobachtet, die nicht allein durch Expressions-Unterschiede des *MGMT*-Gens und der MMR-Gene *MLH1* und *MSH2* zu erklären sind. Zur Aufklärung dieser unbekanntenen Wirk- beziehungsweise Resistenz-Mechanismen sollte diese Arbeit ebenfalls einen Beitrag leisten.

### 4.2 Patienten-Untersuchungen

#### 4.2.1 Übersicht

In einer prospektiven klinischen Studie sollten Tumor-unabhängiger Marker für hämatologische Nebenwirkungen und Ansprechen einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie bei der Behandlung des kutanen Melanoms identifiziert

werden. Als wichtige Resistenz-Faktoren gegen eine Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie wurden die Reparatur von O<sup>6</sup>-Methylguanin-Schäden und eine defiziente MMR beschrieben (Alvino et al., 2006, Karran et al., 1993, Roos et al., 2004). Wie für das Glioblastom gezeigt wurde, ist die Wirkung von Dacarbazin oder Temozolomid stark abhängig von der MGMT und der MMR (Cahill et al., 2007, Friedman et al., 1998, Kaina et al., 2007, Levin et al., 2006, Nagane et al., 2007). Daher wurden für diese Studie die MGMT und zwei Schlüssel-Enzyme der MMR, MLH1 und MSH2, als potentielle Marker für das Ansprechen oder Nebenwirkungen einer Therapie des kutanen Melanoms mit Dacarbazin oder Temozolomid ausgewählt und untersucht.

#### **4.2.2 Studien-Population**

Das kutane Melanom hat die größte Prävalenz in der kaukasischen Bevölkerung. In Deutschland ist die Inzidenz des kutanen Melanoms repräsentativ für Mitteleuropa (Garbe und Blum, 2001). Daten aus dem Melanomregister der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft zeigen, dass das mediane Alter zum Zeitpunkt der Diagnose von den unterschiedlichen histologischen Subtypen des kutanen Melanoms abhängt. Mit einem medianen Alter von 51 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnose, wird das superfiziell spreitende Melanom am frühesten diagnostiziert und das Lentigo-maligna-Melanom deutlich später mit einem medianen Alter von 68 Jahren. Das Alter von Männern und Frauen ist zum Zeitpunkt der Diagnose annähernd das gleiche. Die meisten Tumoren werden im Alter von 50 bis 60 Jahren diagnostiziert (Garbe und Blum, 2001). Die Studien-Population für diese Arbeit repräsentiert eine homogene, deutsche, kaukasische Population von Patienten, die an metastasiertem kutanen Melanom erkrankt sind. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme betrug das mediane Alter der Patienten 63 Jahre. Zu diesem Zeitpunkt waren die Patienten bereits im Stadium IV der Erkrankung.

#### 4.2.3 Ansprechen und hämatologische Nebenwirkungen in Korrelation mit der Genexpression

Für Temozolomid-behandelte Patienten mit einem Glioblastom wurde die Expression des MGMT-Proteins in Tumor-Zellen als wichtiger prognostischer Marker vorgeschlagen (Anda et al., 2003, Levin et al., 2006, Nagane et al., 2007). Es wurde außerdem berichtet, dass die Methylierung der Promotor-Region von MGMT in Tumor-Zellen die Erfolgchancen einer Temozolomid-Therapie bei Patienten mit Glioblastom verbessert (Esteller et al., 2000, Hegi et al., 2004, Hegi et al., 2005). Da Tumor-Material aber nicht immer zugänglich ist, wäre es ein großer Vorteil, wenn Tumor-unabhängige, aber wirtsspezifische konstitutive Marker zu Verfügung stünden, die das Ansprechen und die Nebenwirkungen einer Temozolomid-Therapie vorhersagen können. Zum derzeitigen Zeitpunkt steht kein geeigneter Tumor-unabhängiger, Blut-basierter Marker zur Verfügung, der in der Lage wäre, individuelle Nebenwirkungen und die Wirkung einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie bei der Behandlung des kutanen Melanoms vorherzusagen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass kaukasische Melanom-Patienten mit gleichzeitig konstitutiv niedriger oder konstitutiv hoher mRNA-Expression der Gene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* keine hämatologischen Nebenwirkungen nach einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie aufweisen (Tabelle 3.1). Wenn also auf der einen Seite die Expression dieser drei Gene niedrig ist, können O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Schäden nicht effizient durch die MGMT repariert werden. Als Konsequenz akkumulieren während der Replikation O<sup>6</sup>-Methylguanin-Thymin Fehlpaarungen (Karran et al., 1993, Roos et al., 2004). Da aber die Expression der MMR-Enzyme *MLH1* und *MSH2* ebenfalls niedrig ist, wird auch keine Apoptose durch frustrane MMR induziert. Wenn auf der anderen Seite die Expression der drei DNA-Reparaturgene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* hoch ist, werden die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Schäden effizient durch die MGMT repariert und Apoptose kann nicht induziert werden, da nicht genügend O<sup>6</sup>-Methylguanin-Thymin Fehlpaarungen erzeugt werden. Folglich sollten, wie in dieser Studie beobachtet, auf der Basis dessen, was über die Rolle der MGMT und der MMR im Zusammenhang mit der Wirkung von Dacarbazin oder Temozolomid bekannt ist, keine hämatologischen Nebenwirkungen erwartet werden. Es ist bemerkenswert,

dass bei Patienten ohne hämatologische Nebenwirkungen eine entweder gleichzeitig niedrige oder gleichzeitig hohe Expression der untersuchten Gene beobachtet wurde. Untersuchungen zur Rolle der MGMT-, MLH1- und MSH2-Protein-Expression bei der Tumor-Progression von Gallenblasen- und Gallengang-Krebs zeigten interessanterweise ebenfalls signifikante Effekte auf den Krankheitsverlauf, wenn alle drei Gene gleichzeitig exprimiert oder nicht exprimiert wurden (Kohya et al., 2002). Dennoch bleibt es eine interessante Frage, ob die Expression der drei Gene in einer koordinierten Art und Weise kontrolliert wird.

In Bezug auf das Ansprechen der Chemotherapie konnte keine Korrelation mit der Genexpression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* gezeigt werden (Tabelle 3.1). Die Tatsache, dass die Genexpression der drei DNA-Reparaturgene mit den hämatologischen Nebenwirkungen, aber nicht mit dem Ansprechen korrelierte, könnte auf eine differenzielle Genexpression in peripheren Blut-Lymphocyten und Tumor-Zellen begründet sein. Variationen in der Genexpression nicht nur zwischen verschiedenen Patienten, sondern auch zwischen individuellen Tumoren und im selben Patient zwischen einzelnen Metastasen und zwischen Primär-Tumor und Metastasen wurden nicht nur für das Melanom beschrieben (Jaeger et al., 2007), sondern auch in anderen Entitäten wie in Brustkrebs-Tumoren (Clemons et al., 2002). Dennoch konnte keine Korrelation des Ansprechens einer Temozolomid-Therapie mit der MGMT Expression oder der Promotor-Methylierung in Tumoren von Melanom-Patienten gefunden werden (Rietschel et al., 2008). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass im Gegensatz zur Situation beim Glioblastom weitere Reparatur-Mechanismen neben der MGMT und der MMR eine wichtige Rolle für die Wirkung von Dacarbazin und Temozolomid in Melanom-Tumoren spielen. Für diese Arbeit stand bedauerlicherweise kein Tumor-Material der Patienten zur Verfügung. Ein Vergleich der Situation im Tumor und im Blut war daher nicht möglich.

#### **4.2.4 Genexpression und Promotor-Methylierung**

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit metastasiertem kutanen Melanom die Promotor-Regionen der DNA-Reparaturgene *MGMT*, *MLH1*

und *MSH2* in peripheren Blut-Lymphocyten nicht oder im Fall der *MGMT* nur sehr rar methyliert sind. Es ist bekannt, dass die Methylierung der Promotor-Region mit einer niedrigeren Genexpression assoziiert ist (Wang et al., 1992). Konsequenterweise waren die untersuchten Gene mit nicht-methylierter Promotor-Region nicht stillgelegt, so dass eine mRNA-Expression im Blut der Patienten detektiert werden konnte (Abbildung 3.1). Sogar Patienten, bei denen für *MGMT* sowohl mit methylierungsspezifischen- als auch mit nicht-methylierungsspezifischen Primern ein Signal detektiert wurde, exprimierten *MGMT* in peripheren Blut-Lymphocyten. Folglich scheint der Promotor-Methylierungsstatus von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* in peripheren Blut-Lymphocyten kein geeigneter Marker für hämatologische Nebenwirkungen und Ansprechen der Therapie zu sein. Die niedrige Detektions-Rate methylierter Promotor-Regionen wurde auch von anderen im Serum von Melanom-Patienten beobachtet (Mori et al., 2005). Es gibt Unterschiede im Methylierungsstatus des *MGMT*-Gens in unterschiedlichen Geweben und im Blut. Brabender *et al.* berichteten von stärkeren Methylierungs-Raten in Tumor-Gewebe als im entsprechenden normalen Gewebe und die Methylierung von *MGMT* in normalem Gewebe geht immer einher mit einer methylierten Promotor-Region im entsprechenden Tumor-Gewebe (Brabender et al., 2003). Es konnte nicht gezeigt werden, dass die Promotor-Methylierung von *MGMT* mit dem Therapie-Ansprechen für das metastasierte Melanom korreliert (Mori et al., 2005). Gleichwohl wurde die Promotor-Methylierung von *MGMT* im Glioblastom-Tumorgewebe als ein guter prädiktiver Marker für das Ansprechen auf alkylierende Substanzen belegt (Esteller et al., 2000). Obwohl der Promotor von *MLH1* im Kolorektal-Karzinom und in anderen Krebs-Entitäten häufig methyliert vorliegt (Herman und Baylin, 2003), ist er im Melanom selten methyliert (Furuta et al., 2004). Folglich bleibt festzuhalten, dass der Promotor-Methylierungsstatus von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* in peripheren Blut-Lymphocyten keinen guten prädiktiven Marker für Nebenwirkungen und Ansprechen auf eine Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie darstellt.

#### 4.2.5 Genexpression und Genvarianten

Die biologischen Auswirkungen durch den Verlust der Gen-Funktion durch Promotor-Methylierung oder durch Genvarianten in kodierenden Gen-Regionen sind ähnlich (Herman und Baylin, 2003). Kürzlich wurde eine genetische Variante des *MLH1*-Gens beschrieben, die mit einer reduzierten Genexpression assoziiert ist und daher einen Marker für Krebs mit MMR-Defekten darstellt (Mao et al., 2008). Nachdem in dieser Studie zunächst die Genexpression und der Promotor-Methylierungsstatus bestimmt wurden, war es interessant, auch Polymorphismen zu untersuchen, die zusätzlich zur Genexpression die Gen-Funktion beeinflussen könnten. Durch Sequenzierung des gesamten kodierenden Bereiches inklusive der Spleiß-Stellen von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* in allen Patienten konnte die Existenz genetischer Varianten in diesen drei DNA-Reparaturgenen bestätigt werden und fünf bisher nicht beschriebene Varianten im *MLH1*-Gen identifiziert werden. Die oben genannte Variante (Mao et al., 2008) wurde in keinem der Patienten identifiziert. Im Übrigen konnte keine Abhängigkeit der Genexpression von den genetischen Varianten in *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* festgestellt werden.

#### 4.2.6 Ansprechen und hämatologische Nebenwirkungen in Korrelation mit den Genvarianten

Genetische Varianten in den Genen *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* können die DNA-Reparaturkapazität beeinflussen und damit die Therapie des Melanoms durch Dacarbazin oder Temozolomid. Zum Beispiel können die Einzelnukleotidaustausche (SNPs, *single nucleotid polymorphisms*) p.L84F und p.I143V die Funktion des *MGMT*-Proteins beeinträchtigen, resultierend in einer reduzierten Reparatur von DNA-Schäden, die durch 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) induziert werden (Hill et al., 2005). Biallelische Inaktivierung von *MLH1* durch einen SNP an der Akzeptor-Spleiß-Stelle von Intron 15 könnte in Melanomen zu einer Störung der MMR führen (Castiglia et al., 2003). In dieser Studie wurde gezeigt, dass der intronische *MSH2*-SNP g.73170T>C signifikant mit erhöhten hämatologischen Nebenwirkungen bei der Melanom-Behandlung mit Dacarbazin oder Temozolomid assoziiert ist. Da die Haplotyp-Analyse der *MSH2*-SNPs keine Assoziation zu anderen SNPs zeigte, scheint der SNP g.73170T>C die relevante Variante für hämatologische

Nebenwirkungen und möglicherweise für das Ansprechen auf die Chemotherapie zu sein. Dass intronische Varianten als Marker dienen können, obwohl sie keine offensichtliche funktionelle Relevanz haben, wurde bereits beschrieben. Intronische Varianten können mit anderen funktionell relevanten genetischen Varianten gekoppelt sein. Zum Beispiel wird der Poly(AT) Insertions-Polymorphismus im Intron 9 des Xeroderma Pigmentosum Gruppe C (*XPC*) Gens normalerweise während der *XPC*-mRNA-Prozessierung herausgespleißt. Es wurde aber gezeigt, dass dieser Polymorphismus mit der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und des Nackens assoziiert ist (Shen et al., 2001). Weitere Studien beobachteten, dass eine Variante (A2920C, Lys939Gln) im Exon 15 von *XPC* eine unveränderte DNA-Reparaturaktivität aufwies, aber mit dem Risiko an Blasenkrebs zu erkranken assoziiert war (Sanyal et al., 2004). Später konnte gezeigt werden, dass beide *XPC*-Varianten im Kopplungsungleichgewicht mit einer dritten *XPC*-Spleiß-Stellen-Variante sind, die funktionell relevant ist (Khan et al., 2002). Folglich könnte die *MSH2*-Variante g.73170T>C als prädiktiver Marker eine wichtige Rolle für die Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie beim Melanom spielen, bedarf aber noch weiterer Untersuchungen.

Abschließend bleibt festzustellen, dass sowohl die gleichzeitig niedrige als auch die gleichzeitig hohe Expression der Gene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* in peripheren Blut-Lymphocyten bei der Behandlung des kutanen Melanoms mit Dacarbazin oder Temozolomid als Marker für reduzierte hämatologische Nebenwirkungen fungieren könnte, aber nicht als Marker für das Therapie-Ansprechen. Weiter konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Genexpression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* nicht durch Promotor-Methylierung verhindert wird und eher unabhängig von genetischen Varianten im kodierenden Bereich inklusive der Spleiß-Stellen ist. Die intronische *MSH2* Variante g.73170T>C könnte einen Tumor-unabhängigen Marker für hämatologische Nebenwirkungen und Therapie-Ansprechen darstellen. Generell und im Besonderen mit Blick auf die relativ kleine Studien-Population, bedarf es weiterer Untersuchungen mit unabhängigen Proben zur Validierung dieser Ergebnisse.



## 4.3 Zellkultur-Untersuchungen

### 4.3.1 Übersicht

Neben den für das Glioblastom gut beschriebenen Resistenz-Faktoren MGMT und MMR bei einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie spielen für das Melanom offensichtlich noch weitere Faktoren eine wichtige Rolle bei der Resistenz-Vermittlung (Kato et al., 2007, Naumann et al., 2009). Im Generellen wurden verschiedene Mechanismen der Chemoresistenz beschrieben; dazu gehören Transport, ein Anstieg des Medikamenten-Entzugs, die Induktion von zell-protectiven Substanzen oder ein Anstieg der DNA-Reparatur von Medikament-induzierten DNA-Schäden (Harris, 1985). Auf der Suche nach weiteren Resistenz-vermittelnden Faktoren sollten Melanom-Zelllinien zunächst auf ihre Sensitivität gegen Temozolomid untersucht und ihr Status der bekannten Resistenz-Mechanismen bestimmt werden. Weitere Untersuchungen sollten Vor- und Nachteile der mehrfachen Temozolomid-Gabe darlegen und unbekannte Mechanismen identifizieren, die für die Wirkung von Bedeutung sind.

### 4.3.2 Temozolomid-Sensitivität von Melanom-Zelllinien

Die Sensitivitätstestung der Melanom-Zelllinien gegenüber Temozolomid ergab interessanterweise, dass zwei Zelllinien (KAI, LIBR) sensitiver gegenüber der fünfmaligen Temozolomid-Gabe waren, während die anderen drei Zelllinien (MeIA, MeIB, MeIC) gegenüber der einmaligen Temozolomid-Gabe sensitiver waren. Zu erwarten wäre eine höhere Sensitivität aller Zellen bei wiederholter Gabe (fünfmalige Gabe) von Temozolomid gegenüber der einmaligen Gabe gewesen, da das DNA-Reparatur-Enzym MGMT durch die ersten Gaben erschöpft wird und O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte nach folgenden Behandlungen nicht mehr effizient repariert werden können (Wedge et al., 1996). Es stellt sich also die Frage, wieso Zellen, die fünfmal mit der gleichen Dosis behandelt wurden, resistenter waren, als Zellen, die nur einmal mit dieser Dosis behandelt wurden? Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Expression der MGMT durch die mehrfache Gabe induziert wird und dadurch mehr Schäden repariert werden können (für die Diskussion zu Untersuchungen der Genexpression siehe Kapitel 4.3.3). Auch die Zellzyklus-Regulation könnte hier eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass

Temozolomid-behandelte Zellen die zweite Replikationsrunde nach der Temozolomid-Gabe erreichen müssen, damit Apoptose induziert wird (Kaina et al., 2007). Verbleiben Temozolomid-behandelte Zellen durch wiederholte Temozolomid-Gabe in einem Zellzyklus-Arrest, bevor sie die zweite Replikationsrunde erreichen, so wird die Apoptose-Induktion verzögert. Es ist also denkbar, dass bei einigen Zelllinien zum Zeitpunkt der Vitalitätsmessung Apoptose aufgrund eines verlängerten Zellzyklus-Arrests nach mehrfacher Temozolomid-Gabe noch nicht so stark induziert war (für die Diskussion zu Untersuchungen der Zellzyklusphasenverteilung und Apoptoserate siehe Kapitel 4.3.5). Eine weitere Ursache für unterschiedliche Sensitivitäten der Zelllinien könnte der zelluläre Transport von Temozolomid darstellen. Zum Transport von Temozolomid ist bisher nur wenig bekannt. Ein Transporter, der eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegen diverse Arzneistoffe spielt, ist ABCB1 (auch bekannt als MDR1, *multi drug resistance protein 1*) (für die Diskussion zu Untersuchungen der ABCB1-Expression siehe Kapitel 4.3.7). Die durch die Sensitivitätstestung ermittelten Temozolomid-Konzentrationen, bei denen etwa die Hälfte der Zellen überleben, schwanken beträchtlich zwischen den Zelllinien und den Behandlungsschemata (40  $\mu\text{M}$ -800  $\mu\text{M}$ ). Die Temozolomid-Konzentrationen bewegen sich in einem Rahmen, wie sie auch in anderen Melanom-Zelllinien ermittelt wurden (Alvino et al., 2006, Passagne et al., 2006, Wedge et al., 1996). Durch die Behandlung von Patienten mit 200  $\text{mg}/\text{m}^2/\text{Tag}$  für fünf Tage werden physiologische Temozolomid-Konzentrationen im Plasma von etwa 50  $\mu\text{M}$  erreicht (Hammond et al., 1999). Die *in vitro* verwendeten Temozolomid-Konzentrationen liegen damit oft über der Konzentration, die im Plasma von Temozolomid-behandelten Patienten zu finden ist.

### **4.3.3 Sensitivität in Korrelation mit der Genexpression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2***

Unterschiede in der Sensitivität von Melanom-Zelllinien gegenüber Temozolomid können in der differentiellen Expression von *MGMT* und den Genen der MMR begründet sein. Eine niedrige *MGMT*-Expression und eine hohe Expression der MMR-Gene ist mit einer hohen Sensitivität assoziiert. Folgerichtig ist die Sensitivität der Zelllinie MelC niedriger im Vergleich zu den anderen Zelllinien, da

sie als einzige Zelllinie *MGMT* exprimiert (Abbildung 3.4). Warum die Zelllinien KAll und LIBR aber sensitiver gegenüber Temozolomid sind als die Zelllinien MelA und MelB, lässt sich mit der Genexpression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* alleine nicht erklären. Diese Zelllinien exprimieren alle kein *MGMT* und die Expression der MMR-Gene differiert nur bedingt. Auch die unterschiedliche Sensitivität gegenüber der einmaligen und der fünfmaligen Temozolomid-Gabe lässt sich so nicht erklären. Die Induktion der Genexpression durch die Behandlung der Zellen mit Temozolomid hätte eine Erklärung sein können, konnte aber weder in den ersten 24 Std. nach der Behandlung noch nach einem kompletten Behandlungszyklus beobachtet werden (Tabelle 8.6). Alvino *et al.* (Alvino *et al.*, 2006) hingegen beobachteten nach einem Behandlungszyklus mit Temozolomid eine starke Chemoresistenz-Entwicklung bei Melanom-Zelllinien. Diese Chemoresistenz-Entwicklung wird auf die Induktion einer verstärkten *MGMT* Expression zurückgeführt. Die Hemmung der *MGMT* durch O<sup>6</sup>-Benzylguanin fördert offensichtlich aber die Entwicklung *MGMT*-unabhängiger Resistenz-Mechanismen (Alvino *et al.*, 2006). Dieser Befund legt nahe, dass weitere zelluläre Mechanismen in die Wirkung von Temozolomid involviert sind und die unterschiedlichen Sensitivitäten begründen.

#### **4.3.4 Promotor-Methylierungsstatus von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* in Korrelation mit Genexpression und Sensitivität**

Es ist bekannt, dass die Methylierung der Promotor-Region mit einer niedrigeren Genexpression assoziiert ist (Wang *et al.*, 1992). Der Promotor-Methylierungsstatus von *MGMT* in Tumor-DNA von Patienten mit Glioblastom wurde als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Therapie mit alkylierenden Substanzen beschrieben. Es wurde gezeigt, dass eine methylierte Promotor-Region von *MGMT* mit einem verlängerten Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben assoziiert ist (Esteller *et al.*, 2000). In dieser Arbeit korrelierte der Promotor-Methylierungsstatus der Gene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* gut mit der Genexpression (vergleiche Abbildung 3.4 mit Abbildung 3.5, Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7). War der Promotor eines Gens in einer Zelllinie nicht-methyliert, so wurde dieses Gen exprimiert. Lag der Promotor hingegen methyliert vor, wurde das Gen nicht exprimiert. Es besteht also eine klare Assoziation des

Promotor-Methylierungssatus mit der Genexpression. Tellez *et al.* (Tellez et al., 2009) untersuchten den Promotor-Methylierungsstatus von 15 Genen in 16 Melanom-Zelllinien und fanden ebenfalls eine Assoziation des Promotor-Methylierungsstatus mit der Genexpression. Der Promotor von *MGMT* lag in etwa der Hälfte der Zelllinien methyliert vor, während der Promotor von *MLH1* in keiner Zelllinie methyliert war (Tellez et al., 2009). Furuta *et al.* (Furuta et al., 2004) hingegen konnten keine Methylierung der Promotor-Region von *MGMT* in 13 Melanom-Zelllinien beobachten. Augustine *et al.* (Augustine et al., 2009) wiederum beobachteten in knapp der Hälfte von 26 Melanom-Zelllinien keine Methylierung der Promotor-Region von *MGMT*. Bemerkenswerterweise korrelierte der Promotor-Methylierungsstatus weder mit der Expression von *MGMT* noch mit der Sensitivität der Zelllinien gegenüber Temozolomid (Augustine et al., 2009). Der Promotor-Methylierungsstatus in Melanom-Zelllinien ist ähnlich dem Promotor-Methylierungsstatus in Melanom-Metastasen, aber signifikant höher als in primären Tumoren (Hoon et al., 2004). Es bleibt also festzuhalten, dass die Promotor-Methylierung von *MGMT* ein häufiges Ereignis in der Tumor-Progression des Melanoms darstellt und damit aufgrund niedrigerer *MGMT*-Expression die Sensitivität gegenüber Temozolomid begünstigt. Die Promotor-Regionen der MMR-Gene *MLH1* und *MSH2* scheinen in Melanom-Zelllinien nicht-methyliert vorzuliegen. Die Methylierung dieser MMR-Gene stellt folglich kein spezifisches Ereignis in der Tumor-Progression des Melanoms dar.

#### **4.3.5 Zellzyklusphasenverteilung und Apoptoserate**

Die Replikation der DNA spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose durch Temozolomid-induzierte  $O^6$ -Methylguanin-Schäden. Nach Temozolomid-Behandlung müssen die Zellen die zweite Replikationsrunde erreichen, damit Apoptose induziert wird (Kaina et al., 2007). Ein früher Zellzyklus-Arrest könnte also die Apoptose-Induktion verzögern und damit eine Erklärung für die höhere Sensitivität der Zelllinien MeIA, MeIB und MeIC gegenüber der einmaligen Temozolomid-Gabe im Vergleich zur fünfmaligen Temozolomid-Gabe liefern. Beim Vergleich der Zellzyklusphasenverteilungen konnte bei den Zelllinien MeIA, MeIB und MeIC kein wesentlicher stärkerer beziehungsweise länger andauernder Zellzyklus-Arrest bei der fünfmaligen Temozolomid-Behandlung im Vergleich zur

einmaligen Temozolomid-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 3.8). Der Zellzyklus-Arrest wurde in allen Zelllinien 24-48 Std. nach Temozolomid-Behandlung beobachtet. Es ist denkbar, dass die Zellen nicht vor, sondern erst während der zweiten Replikation arretieren und zu diesem Zeitpunkt schon Apoptose durch frustrane MMR induziert wird. Die höhere Resistenz einiger Zelllinien gegenüber der fünfmaligen Behandlung im Vergleich zur einmaligen Behandlung lässt sich also nicht mit verzögerter Apoptose-Induktion durch andauernde Zellzyklus-Arretierung erklären. Wichtig bei der Betrachtung der Ergebnisse der Sensitivitätstestung ist auch der Zeitpunkt der Vitalitätsmessung. Die weitere Kultivierung der Zellen nach einem Behandlungszyklus bis zur Subkonfluenz zeigt, dass die fünfmal mit Temozolomid behandelten Zellpopulationen länger brauchen, um sich von der Behandlung zu erholen und um wieder zur subkonfluenten Population heranzuwachsen, als einmal mit Temozolomid-behandelte Zellpopulationen (Tabelle 3.4). Eine Ausnahme bildet die Zelllinie MelA, bei der die einmalige Temozolomid-Behandlung derart toxisch wirkte, dass die Zellpopulation nicht wieder bis zur Subkonfluenz auswuchs. Hierbei ist zu bedenken, dass für diese Versuche jeweils die höhere Temozolomid-Konzentration aus Tabelle 3.3 pro Zelllinie verwendet wurde. Das bedeutet, dass für die einmalige Behandlung von MelA die fünffache Menge Temozolomid (500  $\mu\text{M}$  statt 100  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt wurde, als nötig wäre, damit etwa die Hälfte der Zellen überleben. Die Tatsache, dass nach der einmaligen Behandlung keine Zellen überlebt haben, bestätigt die höhere Sensitivität der Zelllinie MelA gegenüber der einmaligen Behandlung in Vergleich zur fünfmaligen Behandlung. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die höhere Sensitivität der Zelllinien MelA, MelB und MelC gegenüber der einmaligen Temozolomid-Behandlung im Vergleich zur fünfmaligen Behandlung nicht auf einen frühen Zellzyklus-Arrest zurückzuführen ist.

#### 4.3.6 O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte

Die Auswirkungen der Temozolomid-Behandlung auf die Melanom-Zelllinien wurden mittels Sensitivitätstestung, Untersuchungen der Zellzyklusphasenverteilung, Apoptose-/Nekrose-Bestimmungen und auf molekularer Ebene in Bezug auf die DNA-Reparatur-Mechanismen MGMT und

MMR untersucht. Eine ganz entscheidende Frage blieb aber noch ungeklärt: Wie viele O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte entstehen überhaupt durch die Temozolomid-Behandlung, wie schnell werden sie generiert und wie schnell wieder eliminiert? Bestehen hier Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien? In allen Zelllinien werden die O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte relativ schnell gebildet und innerhalb von 48 Std. auch wieder eliminiert (Abbildung 3.9). Auffällig gut und schnell werden sie von der Zelllinie MeIC eliminiert. Diese Beobachtung passt gut mit dem Ergebnis der Genexpression von *MGMT* zusammen. Die effiziente Reparatur der Schäden in MeIC sowohl nach der ersten, als auch nach der zweiten Temozolomid-Gabe kann demnach mit der Expression von *MGMT* erklärt werden. Aber auch in den anderen Zelllinien, in denen keine *MGMT* Expression nachgewiesen werden konnte, werden die Schäden, wenn auch nicht so effizient, eliminiert. Durch Zellteilung kommt es zu einer Ausdünnung der relativen Menge an O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukten, was einen Beitrag zur beobachteten Abnahme der Schäden leisten könnte. Es kann auch über einen bisher unbekanntem Reparatur-Mechanismus zum Beispiel unter Beteiligung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur spekuliert werden (Nickel et al., 2008). Interessant ist die Beobachtung, dass nach der zweiten Temozolomid-Behandlung nicht in allen Zelllinien ein erneuter deutlicher Anstieg der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte zu beobachten war. Dies könnte die Folge einer induzierten Resistenz-Entwicklung durch erhöhte Expression von *Efflux*-Transportern (z. B. *ABCB1*) sein. Als Erklärung für die differentiellen Sensitivitäten der Zelllinien gegenüber den zwei untersuchten Behandlungsschemata kann dies aber nicht dienen, da sich nach der zweiten Behandlung nur ein deutlicher Anstieg der Schäden in den Zelllinien MeIB und MeIC zeigte, nicht aber in der Zelllinie MeIA. Nach der zweiten Temozolomid-Behandlung werden die Schäden offensichtlich nicht mehr so effizient repariert, die Reparaturfähigkeit der Zellen scheint also abzunehmen.

#### **4.3.7 Sensitivität in Korrelation mit der Genexpression von *ABCB1* (*MDR1*)**

Membran-Transporter haben eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Absorption, Verteilung und Exkretion von vielen Arzneistoffen. Zu den meist untersuchten Transportern im Zusammenhang mit Arzneimittel-Disposition gehören Transporter aus der Familie der Adenosintriphosphat (ATP)-bindenden-

Kassette (ABC, *ATP-binding cassette*) (Borst et al., 2000, Evans und McLeod, 2003). Solche Membran-Transporter können auch in die Vermittlung von Chemoresistenz involviert sein (Fischer et al., 2005). Ein Vertreter der ATP-bindenden-Kassette-Familie ist ABCB1 (MDR1, *multidrug resistance protein 1*). Einige auswärtsgerichtete-, so genannte *Efflux*-Transporter, unter anderem ABCB1, sind bekannt für die Resistenz-Vermittlung gegen viele anti-karzinogene Substanzen (Röckmann und Schadendorf, 2003). Sie senken die intrazelluläre Akkumulation der anti-karzinogenen Substanzen durch das Herausschleusen der Substanzen aus der Zelle. Eine negative Korrelation der Expression von ABCB1 mit der Akkumulation multipler Substanzen ist bekannt (Huang et al., 2004). Alle in dieser Arbeit untersuchten Melanom-Zelllinien (MeIA, MeIB, MeIC, KAII und LIBR) exprimieren ABCB1 (Tabelle 8.7 und Tabelle 8.8). Andere Arbeitsgruppen fanden nur eine geringe oder gar keine Expression von ABCB1 in Melanom-Tumoren oder -Zelllinien (Goldstein et al., 1989, Schadendorf et al., 1995). Abe et al. (Abe et al., 1998) beobachteten eine verstärkte Expression von ABCB1 nach Chemotherapie in Glioblastom-Patienten. Eine erhöhte Expression der mRNA-Expression von ABCB1 nach Temozolomid-Behandlung konnte in den hier untersuchten Melanom-Zelllinien nicht festgestellt werden. In Anbetracht dieser Ergebnisse scheint die Resistenz der Melanom-Zellen gegenüber Temozolomid unabhängig von der Expression des *Efflux*-Transporters ABCB1 zu sein. Dies schließt aber die Beteiligung anderer *Efflux*-Transporter oder *Influx*-Transporter nicht aus.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die beobachteten Sensitivitätsunterschiede zwischen den Melanom-Zelllinien MeIA, MeIB, MeIC, KAII und LIBR gegenüber Temozolomid in Bezug auf zwei unterschiedliche Behandlungsschemata nur zum Teil mit der Expression von *MGMT* erklärt werden können. Wichtig bei der Betrachtung der unterschiedlichen Sensitivitäten ist auch der Zeitpunkt, an dem die Sensitivitäten bestimmt wurden, obwohl eine frühe Zellzyklus-Arretierung als Grund für ein verzögertes Sterben der Zellen ausgeschlossen werden konnte. Auch weitere Untersuchungen zur Entstehung und Eliminierung der Temozolomid-induzierten O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte und zur Genexpression von ABCB1 brachten keine Erklärung für die Sensitivitätsunterschiede der Zelllinien. Zur Klärung der molekularen Ursachen der Sensitivitätsunterschiede zwischen den



Zelllinien und den Behandlungsschemata bedarf es also noch weiterer Untersuchungen.

#### 4.3.8 Ausblick

Die Arbeit zur Identifizierung prädiktiver Marker für Ansprechen und Nebenwirkungen einer Temozolomid-Therapie bei der Behandlung des kutanen Melanoms brauchte Anhaltspunkte für möglicherweise geeignete Marker. Zukünftige Untersuchungen sollten darauf abzielen, diese Ergebnisse der Patienten-Untersuchungen zu validieren. Von besonderem Interesse ist die genetische Variante g.73170T>C im *MSH2*-Gen der Basenfehlpaarung Reparatur (MMR). Eine folgende Studie mit einer größeren Studien-Population, in der diese Variante gezielt untersucht wird, wäre sinnvoll. Der Befund, dass die gleichzeitig niedrige oder gleichzeitig hohe Expression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* mit reduzierten hämatologischen Nebenwirkungen korreliert, könnte in einer Studie mit Tumor-Material in Bezug auf das Therapie-Ansprechen untersucht werden. Eine besondere Herausforderung besteht weiterhin vor allem darin, Tumor-unabhängige Marker zu identifizieren. Genetische Varianten in weiteren MMR-Genen, aber auch in Genen der Zellzykluskontrolle und der Apoptose können hier in Betracht gezogen werden. Durch die weitere Aufklärung der Wirkmechanismen von Temozolomid beim kutanen Melanom können Gene identifiziert werden, deren Untersuchung in Bezug auf genetische Varianten ebenfalls von Interesse sein könnte.

In Zellkultur-Untersuchungen wurden Sensitivitätsunterschiede zwischen den Zelllinien und zwei verschiedenen Behandlungsschemata beobachtet. Zur Klärung der molekularen Ursachen wäre die Charakterisierung der Zelllinien mittels *Microarray* sinnvoll. *Microarray*-Untersuchungen könnten Unterschiede in der Genexpression von DNA-Reparaturgenen, Transportergenen, Genen der zellulären Antwort auf DNA-Schäden (*DNA damage response*) und anderen Genen, die zu den unterschiedlichen Sensitivitäten beitragen könnten, aufzeigen. Diese Daten müssten durch quantitative *real time* PCR, Western-Blot oder durch selektiv Gen-defiziente Zelllinien verifiziert werden. Epigenetische Modifikationen könnten mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) detektiert werden. Um in



---

weiteren Experimenten die nahezu untrennbaren Ereignisse der Apoptose von denen des Zellzyklus besser unterscheiden zu können, wären Zellzyklusexperimente sinnvoll, in denen synchronisierte Zellen, die zum Beispiel aus einem Aphidicolin-Block entlassen wurden, mit Temozolomid behandelt würden. Die Zellzyklusphasenverteilung dieser Zellen müsste mittels Durchflusscytometrie verfolgt werden. Zur Verifizierung, dass sich die Zellen tatsächlich nur in einer bestimmten Phase des Zellzyklus befinden und nicht zum Beispiel während der späten S-Phase auch schon mitotische Zellen in der Probe vorhanden sind, sollten die Zellen parallel mikroskopisch untersucht werden. So könnte der exakte Zeitpunkt eines Zellzyklus-Arrests nach Temozolomid-Behandlung besser bestimmt werden.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Untersuchung der Genexpression, Genvarianten und des Promotor-Methylierungsstatus der DNA-Reparaturgene *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* in peripheren Blut-Lymphocyten von Melanom-Patienten, Tumor-unabhängige Marker für hämatologische Nebenwirkungen und Ansprechen einer Dacarbazin- oder Temozolomid-Therapie zu identifizieren. Solche Marker könnten die Entscheidung für oder gegen eine Therapie mit Dacarbazin oder Temozolomid erheblich erleichtern.

Weiteres Ziel war es, durch Zellkultur-Experimente einen Beitrag zur Aufklärung der Wirk- und Resistenz-Mechanismen von Temozolomid auf Melanom-Zelllinien zu leisten.

Im Zuge der Untersuchung von 51 kaukasischen Patienten mit metastasiertem Melanom konnte festgestellt werden, dass die gleichzeitig konstitutiv niedrige oder gleichzeitig konstitutiv hohe mRNA-Expression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* mit reduzierten Nebenwirkungen einer Temozolomid-Therapie assoziiert ist, aber nicht mit dem Ansprechen auf die Therapie korreliert.

Untersuchungen des Promotor-Methylierungsstatus von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* zeigten, dass Variationen der Genexpression nicht auf den Promotor-Methylierungsstatus zurückzuführen sind.

Durch Sequenzierung des kodierenden Bereichs inklusive der Speistellen konnten 5 genetische Varianten im *MGMT*-Gen, 13 im *MLH1*-Gen und 7 im *MSH2*-Gen identifiziert werden. Von den 13 identifizierten Varianten des *MLH1*-Gens waren 5 Varianten bisher nicht beschrieben.

Bemerkenswert ist der Befund, dass die intronische Variante g.73170T>C des *MSH2*-Gens mit erhöhten hämatologischen Nebenwirkungen assoziiert ist und tendenziell auch mit dem Ansprechen korreliert.

Im Rahmen von Zellkultur-Untersuchungen konnten Sensitivitätsunterschiede zwischen fünf Melanom-Zelllinien gegenüber Temozolomid mit Bezug auf zwei unterschiedliche Behandlungsschemata festgestellt werden. Überraschenderweise waren zwei der fünf Zelllinien sensibler gegenüber der einmaligen Temozolomid-Behandlung im Vergleich zur fünfmaligen Temozolomid-Behandlung.

Die Basis mRNA-Expression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* korrelierte gut mit dem Promotor-Methylierungsstatus der Gene. *MGMT* wurde nur von einer Zelllinie exprimiert und auch nur in dieser Zelllinie lag die Promotor-Region nicht-methyliert vor. Nach Temozolomid-Behandlung konnte keine Veränderung der Expression der drei Gene beobachtet werden.

Der Frage, ob Unterschiede in der Zellzyklus-Arretierung und der Apoptose die unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Temozolomid bedingen, wurde durch Experimente zur Zellzyklusphasenverteilung und zur Apoptose-Induktion nachgegangen. Signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien, welche die unterschiedlichen Sensitivitäten erklären würden, konnten nicht gefunden werden.

Experimente zur Quantifizierung der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien offenbaren. Die Ergebnisse deuten aber auf eine Abnahme der Reparaturkapazität nach wiederholter Temozolomid-Behandlung hin.

## 6 Abstract

The aim of this study was to identify individual host markers for hematologic side effects and treatment efficacy of dacarbazine or temozolomide in melanoma treatment. Such markers could facilitate the decision for or against a dacarbazine- or temozolomide-therapy. Fifty-one Caucasian patients with metastasized melanoma were recruited. In each patient, the mRNA expression of *MGMT* and two essential mismatch repair (MMR) genes, *MLH1* and *MSH2*, was measured in peripheral blood. Genetic variants and the promoter methylation status were analyzed as well.

A further aim was to contribute to the elucidation of the mechanisms responsible for the efficacy and resistance of melanoma cell lines to temozolomide.

Either constitutively low or high mRNA expression of *MGMT*, *MLH1*, and *MSH2* was significantly associated with reduced hematologic side effects, but did not correlate with treatment efficacy in the investigated patients.

Investigations of the promoter methylation status revealed that variations of the hosts' gene expression of *MGMT*, *MLH1*, and *MSH2* did not result from promoter methylation.

The coding gene regions including splice sites were sequenced to identify genetic variants. Five variants in the *MGMT* gene, 13 variants in *MLH1*, and 7 variants in *MSH2*, including 5 novel genetic variants in *MLH1* could be identified.

Of note, the variant g.73170T>C in *MSH2* was associated with increased hematologic side effects and showed a tendency for better treatment response.

Cell culture experiment showed different sensitivities of five different melanoma cell lines to temozolomide with respect to two different treatment schedules. Surprisingly, two of the cell lines were more resistant to the single dose treatment compared to the five times temozolomide treatment.

---

The baseline expression of *MGMT*, *MLH1*, and *MSH2* in the cell lines correlated well with the promoter methylation status of the genes. *MGMT* was only expressed by the cell line MeIC and MeIC was the only cell line with unmethylated promoter region of *MGMT*. After temozolomide treatment no change in the expression of the three DNA-repair genes could be observed.

The question whether differences in cell cycle arrest or apoptosis induction after temozolomide treatment are responsible for the observed different sensitivities was analyzed. Differences between the cell lines which could explain the different sensitivities could not be observed.

Experiments to quantify the O<sup>6</sup>-Methylguanin-Adducts could not show any significant differences between the cell lines. The results point at a decrease of repair capacity after repeated temozolomide treatment.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abe T., Mori T., Wakabayashi Y., Nakagawa M., Cole S.P.C. et al. Expression of multidrug resistance protein gene in patients with glioma after chemotherapy. *J Neurocol.* (1998) **40** 11-8.
- Alvino E., Castiglia D., Caporali S., Pepponi R., Caporaso P. et al. A single cycle of treatment with temozolomide, alone or combined with O(6)-benzylguanine, induces strong chemoresistance in melanoma cell clones in vitro: role of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase and the mismatch repair system. *Int.J.Oncol.* (2006) **29** 785-97.
- Anda T., Shabani H.K., Tsunoda K., Tokunaga Y., Kaminogo M. et al. Relationship between expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione-S-transferase pi in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: an immunohistochemical analysis. *Neurol.Res.* (2003) **25** 241-8.
- Armstrong B.K. und Krickler A. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv.* (1994) **19-20** 219-40.
- Augustine C.K., Yoo J.S., Potti A., Yoshimoto Y., Zipfel P.A. et al. Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. *Clin.Cancer Res.* (2009) **15** 502-10.
- Bauer J., Buttner P., Wiecker T.S., Luther H. und Garbe C. Risk factors of incident melanocytic nevi: a longitudinal study in a cohort of 1,232 young German children. *Int.J.Cancer* (2005) **115** 121-6.
- Bedikian A.Y., Millward M., Pehamberger H., Conry R., Gore M. et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J.Clin.Oncol.* (2006) **24** 4738-45.
- Bessho T., Mu D. und Sancar A. Initiation of DNA interstrand cross-link repair in humans: the nucleotide excision repair system makes dual incisions 5' to the cross-linked base and removes a 22- to 28-nucleotide-long damage-free strand. *Mol.Cell Biol.* (1997) **17** 6822-30.
- Blackwell L.J., Martik D., Bjornson K.P., Bjornson E.S. und Modrich P. Nucleotide-promoted release of hMutSalph $\alpha$  from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J.Biol.Chem.* (1998) **273** 32055-62.
- Borst P., Evers R., Kool M. und Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J.Natl.Cancer Inst.* (2000) **92** 1295-302.
- Brabender J., Usadel H., Metzger R., Schneider P.M., Park J. et al. Quantitative O(6)-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in

- curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome. *Clin.Cancer Res.* (2003) **9** 223-7.
- Buermeyer A.B., Deschenes S.M., Baker S.M. und Liskay R.M. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu.Rev.Genet.* (1999) **33** 533-64.
- Buettner P.G. und Raasch B.A. Incidence rates of skin cancer in Townsville, Australia. *Int.J.Cancer* (1998) **78** 587-93.
- Burgers P.M., Koonin E.V., Bruford E., Blanco L., Burtis K.C. et al. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J.Biol.Chem.* (2001) **276** 43487-90.
- Cahill D.P., Levine K.K., Betensky R.A., Codd P.J., Romany C.A. et al. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin.Cancer Res.* (2007) **13** 2038-45.
- Castiglia D., Pagani E., Alvino E., Vernole P., Marra G. et al. Biallelic somatic inactivation of the mismatch repair gene MLH1 in a primary skin melanoma. *Genes Chromosomes.Cancer* (2003) **37** 165-75.
- Catapano C.V., Broggin M., Erba E., Ponti M., Mariani L. et al. In vitro and in vivo methazolastone-induced DNA damage and repair in L-1210 leukemia sensitive and resistant to chloroethylnitrosoureas. *Cancer Res.* (1987) **47** 4884-9.
- Clemons M.J., Bibby M.C., El T.H., Forster G., Kelly J. et al. Heterogeneity of O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase expression in human breast tumours. *Br.J.Cancer* (2002) **86** 1797-802.
- D'Andrea A.D. und Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat.Rev.Cancer* (2003) **3** 23-34.
- Declaration of Helsinki. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* (2000) **284** 3043-5.
- den Dunnen J.T. und Antonarakis S.E. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum.Genet.* (2001) **109** 121-4.
- Diepgen T.L. und Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br.J.Dermatol.* (2002) **146 Suppl 61** 1-6.
- Dummer R., Robert C., Capman P.B., Sosman J.A., Middleton M.R. et al. AZD6244 (ARRY-142886) vs temozolomide (TMZ) in patients (pts) with advanced melanoma: An open-label, randomized, multicenter, phase II study. *J Clin Oncol.* (2008) **26** Abstr. 9033.
- Eggermont A.M., Suci S., Santinami M., Testori A., Kruit W.H. et al. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet* (2008) **372** 117-26.

- Eigentler T.K., Caroli U.M., Radny P. und Garbe C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol.* (2003) **4** 748-59.
- Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E., Goodman S.N., Hidalgo O.F. et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N.Engl.J.Med.* (2000) **343** 1350-4.
- Evans W.E. und McLeod H.L. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N.Engl.J.Med.* (2003) **348** 538-49.
- Fischer V., Einolf H.J. und Cohen D. Efflux transporters and their clinical relevance. *Mini.Rev.Med.Chem.* (2005) **5** 183-95.
- Fousteri M. und Mullenders L.H. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* (2008) **18** 73-84.
- Friedberg, E.C. DNA Repair and Mutagenesis. *ASM Press* (2006) **2. ed.**
- Friedman H.S., McLendon R.E., Kerby T., Dugan M., Bigner S.H. et al. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J.Clin.Oncol.* (1998) **16** 3851-7.
- Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G. et al. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* (1996) **271** 9573-8.
- Furuta J., Umebayashi Y., Miyamoto K., Kikuchi K., Otsuka F. et al. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci.* (2004) **95** 962-8.
- Garbe C. und Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol* (2001) **14** 280-90.
- Garbe C., Buttner P., Weiss J., Soyer H.P., Stocker U. et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J.Invest Dermatol.* (1994) **102** 695-9.
- Garbe C. und Eigentler T.K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res.* (2007) **17** 117-27.
- Garbe C., Hauschild A., Volkenandt M., Schadendorf D., Stolz W. et al. Evidence-based and interdisciplinary consensus-based German guidelines: systemic medical treatment of melanoma in the adjuvant and palliative setting. *Melanoma Res.* (2008a) **18** 152-60.
- Garbe C., Terheyden P., Keilholz U., Kölbl O. und Hauschild A. Treatment of Melanoma. *Dtsch.Arztzebl.Int.* (2008b) **105** 845-51.



- Genschel J., Littman S.J., Drummond J.T. und Modrich P. Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J.Biol.Chem.* (1998) **273** 19895-901.
- Gogas H., Eggermont A.M., Hauschild A., Hersey P., Mohr P. et al. Biomarkers in melanoma. *Ann.Oncol.* (2009) **20 Suppl 6** vi8-13.
- Gogas H., Ioannovich J., Dafni U., Stavropoulou-Giokas C., Frangia K. et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N.Engl.J.Med.* (2006) **354** 709-18.
- Goldstein L.J., Galski H., Fojo A., Willingham M., Lai S.L. et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J.Natl.Cancer Inst.* (1989) **81** 116-24.
- Gradia S., Subramanian D., Wilson T., Acharya S., Makhov A. et al. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol.Cell* (1999) **3** 255-61.
- Grady W.M., Rajput A., Lutterbaugh J.D. und Markowitz S.D. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res.* (2001) **61** 900-2.
- Grawunder U., Wilm M., Wu X., Kulesza P., Wilson T.E. et al. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* (1997) **388** 492-5.
- Greinert R. Skin cancer: new markers for better prevention. *Pathobiology* (2009) **76** 64-81.
- Hammond L.A., Eckardt J.R., Baker S.D., Eckhardt S.G., Dugan M. et al. Phase I and pharmacokinetic study of temozolomide on a daily-for-5-days schedule in patients with advanced solid malignancies. *J.Clin.Oncol.* (1999) **17** 2604-13.
- Harris A.L. DNA repair and resistance to chemotherapy. *Cancer Surv.* (1985) **4** 601-24.
- Hartlerode A.J. und Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem.J.* (2009) **423** 157-68.
- Hegi M.E., Diserens A.C., Godard S., Dietrich P.Y., Regli L. et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin.Cancer Res.* (2004) **10** 1871-4.
- Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., Hamou M.F., de T.N. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N.Engl.J.Med.* (2005) **352** 997-1003.
- Herman J.G. und Baylin S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N.Engl.J.Med.* (2003) **349** 2042-54.

- Herman J.G., Umar A., Polyak K., Graff J.R., Ahuja N. et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1998) **95** 6870-5.
- Hess M.T., Schwitter U., Petretta M., Giese B. und Naegeli H. Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1997) **94** 6664-9.
- Hill C.E., Wickliffe J.K., Wolfe K.J., Kinslow C.J., Lopez M.S. et al. The L84F and the I143V polymorphisms in the O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) gene increase human sensitivity to the genotoxic effects of the tobacco-specific nitrosamine carcinogen NNK. *Pharmacogenet.Genomics* (2005) **15** 571-8.
- Hodi F.S., Friedlander P., Corless C.L., Heinrich M.C., Mac R.S. et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J.Clin.Oncol.* (2008) **26** 2046-51.
- Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* (2001) **411** 366-74.
- Holly E.A., Kelly J.W., Shpall S.N. und Chiu S.H. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J.Am.Acad.Dermatol.* (1987) **17** 459-68.
- Hoon D.S., Spugnardi M., Kuo C., Huang S.K., Morton D.L. et al. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene* (2004) **23** 4014-22.
- Huang Y., Anderle P., Bussey K.J., Barbacioru C., Shankavaram U. et al. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* (2004) **64** 4294-301.
- Jackson S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* (2002) **23** 687-96.
- Jaeger J., Koczan D., Thiesen H.J., Ibrahim S.M., Gross G. et al. Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. *Clin.Cancer Res.* (2007) **13** 806-15.
- Jean M., Pelletier J., Hilpert M., Belzile F. und Kunze R. Isolation and characterization of AtMLH1, a MutL homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Mol.Gen.Genet.* (1999) **262** 633-42.
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J. et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J.Clin.* (2006) **56** 106-30.
- Jemal A., Ward E., Hao Y. und Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA* (2005) **294** 1255-9.

- Kaina B., Christmann M., Naumann S. und Roos W.P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* (2007) **6** 1079-99.
- Kannouche P.L. und Lehmann A.R. Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle* (2004) **3** 1011-3.
- Karran P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* (2001) **22** 1931-7.
- Karran P., Macpherson P., Ceccotti S., Dogliotti E., Griffin S. et al. O6-methylguanine residues elicit DNA repair synthesis by human cell extracts. *J.Biol.Chem.* (1993) **268** 15878-86.
- Katalinic A., Kunze U. und Schafer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br.J.Dermatol.* (2003) **149** 1200-6.
- Kato Y., Okollie B., Raman V., Vesuna F., Zhao M. et al. Contributing factors of temozolomide resistance in MCF-7 tumor xenograft models. *Cancer Biol.Ther.* (2007) **6** 891-7.
- Keilholz U., Kaufmann R. und Tilgen W. Systemische Behandlung beim fortgeschrittenen Melanom. *Onkologe* (2001) **7** 61-70.
- Khan S.G., Muniz-Medina V., Shahlavi T., Baker C.C., Inui H. et al. The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic Acids Res.* (2002) **30** 3624-31.
- Kohya N., Miyazaki K., Matsukura S., Yakushiji H., Kitajima Y. et al. Deficient expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase combined with mismatch-repair proteins hMLH1 and hMSH2 is related to poor prognosis in human biliary tract carcinoma. *Ann.Surg.Oncol.* (2002) **9** 371-9.
- Kraemer K.H., Lee M.M., Andrews A.D. und Lambert W.C. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch.Dermatol.* (1994) **130** 1018-21.
- Lai J.C., Cheng Y.W., Goan Y.G., Chang J.T., Wu T.C. et al. Promoter methylation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase in lung cancer is regulated by p53. *DNA Repair (Amst)* (2008) **7** 1352-63.
- Laird P.W. Cancer epigenetics. *Hum.Mol.Genet.* (2005) **14 Spec No 1** R65-R76.
- Lee M.L., Tomsu K. und Von Eschen K.B. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. *Melanoma Res.* (2000) **10** 81-92.
- Levin N., Lavon I., Zelikovitsh B., Fuchs D., Bokstein F. et al. Progressive low-grade oligodendrogliomas: response to temozolomide and correlation

- between genetic profile and O6-methylguanine DNA methyltransferase protein expression. *Cancer* (2006) **106** 1759-65.
- Ma Y., Pannicke U., Schwarz K. und Lieber M.R. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* (2002) **108** 781-94.
- MacLennan R., Green A.C., McLeod G.R. und Martin N.G. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *J.Natl.Cancer Inst.* (1992) **84** 1427-32.
- Mao G., Pan Y. und Gu L. Evidence That a Mutation in the MLH1 3'-Untranslated Region Confers a Mutator Phenotype and Mismatch Repair Deficiency in Patients with Relapsed Leukemia. *J.Biol.Chem.* (2008) **283** 3211-6.
- Marti T.M., Kunz C. und Fleck O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J.Cell Physiol* (2002) **191** 28-41.
- Matsumoto Y. und Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* (1995) **269** 699-702.
- Matsumoto Y., Kim K. und Bogenhagen D.F. Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol.Cell Biol.* (1994) **14** 6187-97.
- McCullough A.K., Dodson M.L. und Lloyd R.S. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu.Rev.Biochem.* (1999) **68** 255-85.
- Memisoglu A. und Samson L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat.Res.* (2000) **451** 39-51.
- Meredith P. und Riesz J. Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem.Photobiol.* (2004) **79** 211-6.
- Middleton M.R., Grob J.J., Aaronson N., Fierlbeck G., Tilgen W. et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J.Clin.Oncol.* (2000) **18** 158-66.
- Mohr P., Eggermont A.M., Hauschild A. und Buzaid A. Staging of cutaneous melanoma. *Ann.Oncol.* (2009) **20 Suppl 6** vi14-vi21.
- Mori T., O'Day S.J., Umetani N., Martinez S.R., Kitago M. et al. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J.Clin.Oncol.* (2005) **23** 9351-8.
- Nagane M., Kobayashi K., Ohnishi A., Shimizu S. und Shiokawa Y. Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression in patients with recurrent glioblastoma treated with temozolomide. *Jpn.J.Clin.Oncol.* (2007) **37** 897-906.

- Naumann S.C., Roos W.P., Jost E., Belohlavek C., Lennerz V. et al. Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br.J.Cancer* (2009) **100** 322-33.
- Newlands E.S., Stevens M.F., Wedge S.R., Wheelhouse R.T. und Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat.Rev.* (1997) **23** 35-61.
- Nickel A., Jerabek-Willhelmsen M., Andreasen P., Emmert S., Bueren JA. et al. MGMT-independent repair of O6-methylguanine: Which components are necessary? *Abstract DNA Repair 2008 10th Biennial Meeting of the DGDR* (2008) **P-5-3** 119
- Ohmori H., Friedberg E.C., Fuchs R.P., Goodman M.F., Hanaoka F. et al. The Y-family of DNA polymerases. *Mol.Cell* (2001) **8** 7-8.
- Passagne I., Evrard A., Depeille P., Cuq P., Cupissol D. et al. O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT) overexpression in melanoma cells induces resistance to nitrosoureas and temozolomide but sensitizes to mitomycin C. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (2006) **211** 97-105.
- Pegg A.E. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* (1990) **50** 6119-29.
- Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat.Res.* (2001) **488** 77-85.
- Pfahlberg A., Kolmel K.F. und Gefeller O. Timing of excessive ultraviolet radiation and melanoma: epidemiology does not support the existence of a critical period of high susceptibility to solar ultraviolet radiation- induced melanoma. *Br.J.Dermatol.* (2001) **144** 471-5.
- Poot M., Hoehn H., Bogdahn U. und Otto F. Bromodeoxyuridine hypersensitivity of metastatic melanoma cells. *Melanoma Res.* (1992) **2** 241-6.
- Rietschel P., Wolchok J.D., Krown S., Gerst S., Jungbluth A.A. et al. Phase II study of extended-dose temozolomide in patients with melanoma. *J.Clin.Oncol.* (2008) **26** 2299-304.
- Rigel D.S., Friedman R.J. und Kopf A.W. The incidence of malignant melanoma in the United States: issues as we approach the 21st century. *J.Am.Acad.Dermatol.* (1996) **34** 839-47.
- Röckmann H. und Schadendorf D. Drug resistance in human melanoma: mechanisms and therapeutic opportunities. *Onkologie* (2003) **26** 581-7.
- Roos W., Baumgartner M. und Kaina B. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* (2004) **23** 359-67.
- Rothhammer T. und Bosserhoff A.K. Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res.* (2007) **20** 92-111.

- Rybanska I. und Pirscl M. Involvement of the nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA base damage in mammalian cells. *Neoplasma* (2003) **50** 389-95.
- Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem.Rev.* (2003) **103** 2203-37.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz K. und Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu.Rev.Biochem.* (2004) **73** 39-85.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (1977) **74** 5463-7.
- Sanyal S., Festa F., Sakano S., Zhang Z., Steineck G. et al. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis* (2004) **25** 729-34.
- Schadendorf D., Herfordt R. und Czarnetzki B.M. P-glycoprotein expression in primary and metastatic malignant melanoma. *Br.J.Dermatol.* (1995) **132** 551-5.
- Schulten H.J., Gunawan B., Otto F., Hassmann R., Hallermann C. et al. Cytogenetic characterization of complex karyotypes in seven established melanoma cell lines by multiplex fluorescence in situ hybridization and DAPI banding. *Cancer Genet.Cytogenet.* (2002) **133** 134-41.
- Sedgwick B. Nitrosated peptides and polyamines as endogenous mutagens in O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase deficient cells. *Carcinogenesis* (1997) **18** 1561-7.
- Seeberg E., Eide L. und Bjoras M. The base excision repair pathway. *Trends Biochem.Sci.* (1995) **20** 391-7.
- Serrone L., Zeuli M., Segal F.M. und Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* (2000) **19** 21-34.
- Shachar S., Ziv O., Avkin S., Adar S., Wittschieben J. et al. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J.* (2009) **28** 383-93.
- Sharova N.P. How does a cell repair damaged DNA? *Biochemistry (Mosc.)* (2005) **70** 275-91.
- Shen H., Sturgis E.M., Khan S.G., Qiao Y., Shahlavi T. et al. An intronic poly (AT) polymorphism of the DNA repair gene XPC and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Res.* (2001) **61** 3321-5.
- Shuck S.C., Short E.A. und Turchi J.J. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res.* (2008) **18** 64-72.



- Sonoda E., Takata M., Yamashita Y.M., Morrison C. und Takeda S. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (2001) **98** 8388-94.
- Soruri A., Fayyazi A., Gieseler R., Schlott T., Runger T.M. et al. Specific autologous anti-melanoma T cell response in vitro using monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology* (1998) **198** 527-38.
- Srivenugopal K.S., Yuan X.H., Friedman H.S. und li-Osman F. Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* (1996) **35** 1328-34.
- Stevens M.F., Hickman J.A., Langdon S.P., Chubb D., Vickers L. et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res.* (1987) **47** 5846-52.
- Stojic L., Brun R. und Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* (2004) **3** 1091-101.
- Takata K. und Wood R.D. Bypass specialists operate together. *EMBO J.* (2009) **28** 313-4.
- Tellez C.S., Shen L., Estecio M.R., Jelinek J., Gershenwald J.E. et al. CpG island methylation profiling in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.* (2009) **19** 146-55.
- Thoms K.M., Kuschal C. und Emmert S. Lessons learned from DNA repair defective syndromes. *Exp.Dermatol.* (2007) **16** 532-44.
- Umar A., Buermeyer A.B., Simon J.A., Thomas D.C., Clark A.B. et al. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* (1996) **87** 65-73.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J. et al. The sequence of the human genome. *Science* (2001) **291** 1304-51.
- Veronesi U., Adamus J., Aubert C., Bajetta E., Beretta G. et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy and immunotherapy in cutaneous melanoma. *N.Engl.J.Med.* (1982) **307** 913-6.
- Walter S.D., King W.D. und Marrett L.D. Association of cutaneous malignant melanoma with intermittent exposure to ultraviolet radiation: results of a case-control study in Ontario, Canada. *Int.J.Epidemiol.* (1999) **28** 418-27.
- Wang Y., Kato T., Ayaki H., Ishizaki K., Tano K. et al. Correlation between DNA methylation and expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in cultured human tumor cells. *Mutat.Res.* (1992) **273** 221-30.

- Waters L.S., Minesinger B.K., Wiltrout M.E., D'Souza S., Woodruff R.V. et al. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* (2009) **73** 134-54.
- Wedge S.R., Porteus J.K., May B.L. und Newlands E.S. Potentiation of temozolomide and BCNU cytotoxicity by O(6)-benzylguanine: a comparative study in vitro. *Br.J.Cancer* (1996) **73** 482-90.
- Wheatley K., Ives N., Eggermont A., Kirkwood J., Cascinelli N. et al. Interferon-alpha as adjuvant therapy for melanoma: An individual patient data meta-analysis of randomised trials. *J.Clin.Oncol.* (2007) **25** 8526.
- Wiecker T.S., Luther H., Buettner P., Bauer J. und Garbe C. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* (2003) **97** 628-38.
- Winnepeninckx V., Lazar V., Michiels S., Dessen P., Stas M. et al. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J.Natl.Cancer Inst.* (2006) **98** 472-82.
- World Health Organization. Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment. *WHO publication no.48.Geneva, Switzerland, World Health Organization* (1979)
- Zhou B.B. und Elledge S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* (2000) **408** 433-9.



## 8 Anhang

### 8.1 Daten zur mRNA-Expression von *MGMT*, *MLH1* und *MSH2* nach Temozolomid-Behandlung von Melanom-Zelllinien (zu Kapitel 3.3.3)

Tabelle 8.1: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie Me1A.

Probe	Mittelwert MGMT	Mittelwert β-Aktin	MGMT/ β-Aktin	Mittelwert MLH1	Mittelwert β-Aktin	MLH1/ β-Aktin	Mittelwert MSH2	Mittelwert β-Aktin	MSH2/ β-Aktin
30' K	2,18E-05	3,25E+00	6,70E-06	1,09E-01	3,25E+00	3,35E-02	4,14E+00	3,25E+00	1,27E+00
30' DMSO	4,04E-05	4,35E+00	9,28E-06	1,09E-01	4,35E+00	2,50E-02	3,13E+00	4,35E+00	7,20E-01
30' TMZ	1,66E-05	2,62E+00	6,33E-06	9,36E-02	2,62E+00	3,57E-02	2,59E+00	2,62E+00	9,88E-01
1h K	1,23E-05	3,91E+00	3,14E-06	1,02E-01	3,91E+00	2,60E-02	3,15E+00	3,91E+00	8,06E-01
1h DMSO	4,43E-05	1,11E+00	4,01E-05	1,22E-01	1,11E+00	1,10E-01	3,14E+00	1,11E+00	2,84E+00
1h TMZ	3,15E-05	3,23E+00	9,77E-06	1,02E-01	3,23E+00	3,16E-02	3,12E+00	3,23E+00	9,66E-01
2h K	3,33E-05	4,87E+00	6,82E-06	1,12E-01	4,87E+00	2,30E-02	3,78E+00	4,87E+00	7,76E-01
2h DMSO	6,19E-07	4,06E+00	1,52E-07	9,06E-02	4,06E+00	2,23E-02	2,84E+00	4,06E+00	7,01E-01
2h TMZ	8,30E-06	3,81E+00	2,18E-06	9,63E-02	3,81E+00	2,53E-02	4,05E+00	3,81E+00	1,06E+00
4h K	3,53E-05	6,46E+00	5,46E-06	4,90E-02	6,46E+00	7,58E-03	4,10E+00	6,46E+00	6,34E-01
4h DMSO	6,31E-05	6,40E+00	9,86E-06	5,87E-02	6,40E+00	9,16E-03	4,16E+00	6,40E+00	6,50E-01
4h TMZ	2,59E-05	5,17E+00	5,01E-06	5,97E-02	5,17E+00	1,16E-02	3,42E+00	5,17E+00	6,62E-01
6h K	3,48E-05	8,48E+00	4,10E-06	6,31E-02	8,48E+00	7,44E-03	4,07E+00	8,48E+00	4,80E-01
6h DMSO	4,33E-05	8,10E+00	5,35E-06	7,09E-02	8,10E+00	8,76E-03	4,17E+00	8,10E+00	5,15E-01
6h TMZ	6,02E-05	8,83E+00	6,82E-06	5,67E-02	8,83E+00	6,43E-03	4,37E+00	8,83E+00	4,95E-01
10h K	5,75E-05	6,18E+00	9,30E-06	6,03E-02	6,18E+00	9,76E-03	4,35E+00	6,18E+00	7,03E-01
10h DMSO	3,01E-05	4,51E+00	6,66E-06	5,73E-02	4,51E+00	1,27E-02	3,85E+00	4,51E+00	8,53E-01
10h TMZ	4,87E-05	5,20E+00	9,38E-06	5,32E-02	5,20E+00	1,02E-02	3,56E+00	5,20E+00	6,85E-01
24h K	5,09E-05	6,51E+00	7,82E-06	5,98E-02	6,51E+00	9,19E-03	4,00E+00	6,51E+00	6,14E-01
24h DMSO	1,02E-04	6,65E+00	1,53E-05	8,28E-02	6,65E+00	1,25E-02	5,07E+00	6,65E+00	7,62E-01
24h TMZ	8,22E-06	4,08E+00	2,01E-06	5,70E-02	4,08E+00	1,39E-02	4,25E+00	4,08E+00	1,04E+00

K=unbehandelte Kontrollen, DMSO=Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, TMZ=Temozolomid-behandelte Zellen. Die Werte wurden mittels quantitativer *real time* PCR ermittelt und geben die relative mRNA-Expression wieder.

**Tabelle 8.2: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie MelB.**

Probe	Mittelwert MGMT	Mittelwert β-Aktin	MGMT/ β-Aktin	Mittelwert MLH1	Mittelwert β-Aktin	MLH1/ β-Aktin	Mittelwert MSH2	Mittelwert β-Aktin	MSH2/ β-Aktin
30' K	1,97E-06	1,94E+01	1,01E-07	3,92E-01	1,94E+01	2,02E-02	3,16E-01	1,94E+01	1,63E-02
30' DMSO	1,61E-05	2,56E+01	6,28E-07	4,52E-01	2,56E+01	1,76E-02	3,66E-01	2,56E+01	1,43E-02
30' TMZ	1,46E-05	2,06E+01	7,08E-07	4,97E-01	2,06E+01	2,42E-02	2,93E-01	2,06E+01	1,43E-02
1h K	2,66E-05	2,49E+01	1,07E-06	5,42E-01	2,49E+01	2,18E-02	3,50E-01	2,49E+01	1,41E-02
1h DMSO	1,86E-05	2,59E+01	7,16E-07	4,40E-01	2,59E+01	1,70E-02	3,38E-01	2,59E+01	1,30E-02
1h TMZ	1,47E-05	2,72E+01	5,39E-07	5,12E-01	2,72E+01	1,88E-02	3,91E-01	2,72E+01	1,44E-02
2h K	2,40E-05	2,73E+01	8,79E-07	5,30E-01	2,73E+01	1,94E-02	3,49E-01	2,73E+01	1,28E-02
2h DMSO	1,30E-05	3,02E+01	4,30E-07	5,19E-01	3,02E+01	1,72E-02	3,57E-01	3,02E+01	1,18E-02
2h TMZ	1,06E-05	3,48E+01	3,06E-07	5,45E-01	3,48E+01	1,57E-02	3,70E-01	3,48E+01	1,06E-02
4h K	1,47E-05	3,91E+01	3,77E-07	5,53E-01	3,91E+01	1,41E-02	3,51E-01	3,91E+01	8,99E-03
4h DMSO	2,79E-05	4,00E+01	6,97E-07	5,17E-01	4,00E+01	1,29E-02	3,68E-01	4,00E+01	9,20E-03
4h TMZ	4,26E-05	3,03E+01	1,41E-06	2,94E-01	3,03E+01	9,73E-03	3,30E-01	3,03E+01	1,09E-02
6h K	4,29E-05	4,30E+01	9,96E-07	5,17E-01	4,30E+01	1,20E-02	3,87E-01	4,30E+01	9,00E-03
6h DMSO	1,75E-05	3,97E+01	4,42E-07	4,92E-01	3,97E+01	1,24E-02	3,52E-01	3,97E+01	8,88E-03
6h TMZ	2,00E-05	4,23E+01	4,72E-07	4,04E-01	4,23E+01	9,56E-03	3,65E-01	4,23E+01	8,64E-03
10h K	1,74E-05	4,96E+01	3,50E-07	6,56E-01	4,96E+01	1,32E-02	4,04E-01	4,96E+01	8,14E-03
10h DMSO	1,22E-05	4,43E+01	2,76E-07	4,63E-01	4,43E+01	1,04E-02	3,62E-01	4,43E+01	8,17E-03
10h TMZ	2,07E-05	3,50E+01	5,93E-07	4,77E-01	3,50E+01	1,36E-02	4,05E-01	3,50E+01	1,16E-02
24h K	2,65E-05	3,43E+01	7,72E-07	6,24E-01	3,43E+01	1,82E-02	3,87E-01	3,43E+01	1,13E-02
24h DMSO	7,94E-06	3,35E+01	2,37E-07	5,34E-01	3,35E+01	1,60E-02	4,01E-01	3,35E+01	1,20E-02
24h TMZ	9,08E-06	2,56E+01	3,55E-07	5,36E-01	2,56E+01	2,10E-02	3,91E-01	2,56E+01	1,53E-02

K=unbehandelte Kontrollen, DMSO=Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, TMZ=Temozolomid-behandelte Zellen. Die Werte wurden mittels quantitativer *real time* PCR ermittelt und geben die relative mRNA-Expression wieder.

**Tabelle 8.3: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie MelC.**

Probe	Mittelwert MGMT	Mittelwert β-Aktin	MGMT/ β-Aktin	Mittelwert MLH1	Mittelwert β-Aktin	MLH1/ β-Aktin	Mittelwert MSH2	Mittelwert β-Aktin	MSH2/ β-Aktin
30' K	3,56E-01	2,55E+01	1,39E-02	3,63E-01	2,55E+01	1,42E-02	1,13E+00	2,55E+01	4,44E-02
30' DMSO	3,30E-01	3,78E+01	8,75E-03	4,04E-01	3,78E+01	1,07E-02	1,23E+00	3,78E+01	3,25E-02
30' TMZ	3,63E-01	2,53E+01	1,43E-02	4,55E-01	2,53E+01	1,80E-02	1,21E+00	2,53E+01	4,76E-02
1h K	3,74E-01	2,41E+01	1,55E-02	4,94E-01	2,41E+01	2,05E-02	1,24E+00	2,41E+01	5,14E-02
1h DMSO	3,71E-01	2,49E+01	1,49E-02	3,97E-01	2,49E+01	1,59E-02	1,23E+00	2,49E+01	4,95E-02
1h TMZ	4,26E-01	3,14E+01	1,36E-02	4,90E-01	3,14E+01	1,56E-02	1,32E+00	3,14E+01	4,20E-02
2h K	4,02E-01	3,18E+01	1,26E-02	4,34E-01	3,18E+01	1,36E-02	1,27E+00	3,18E+01	3,98E-02
2h DMSO	3,57E-01	3,27E+01	1,09E-02	4,64E-01	3,27E+01	1,42E-02	1,19E+00	3,27E+01	3,63E-02
2h TMZ	3,94E-01	4,06E+01	9,71E-03	4,70E-01	4,06E+01	1,16E-02	1,32E+00	4,06E+01	3,25E-02
4h K	3,97E-01	4,46E+01	8,91E-03	5,54E-01	4,46E+01	1,24E-02	1,38E+00	4,46E+01	3,09E-02
4h DMSO	4,09E-01	5,18E+01	7,89E-03	4,72E-01	5,18E+01	9,11E-03	4,66E-01	5,18E+01	9,00E-03
4h TMZ	4,65E-01	6,51E+01	7,14E-03	7,28E-01	6,51E+01	1,12E-02	1,76E+00	6,51E+01	2,70E-02
6h K	4,12E-01	5,67E+01	7,26E-03	6,70E-01	5,67E+01	1,18E-02	1,39E+00	5,67E+01	2,46E-02
6h DMSO	4,13E-01	6,25E+01	6,61E-03	5,13E-01	6,25E+01	8,21E-03	1,58E+00	6,25E+01	2,53E-02
6h TMZ	3,83E-01	5,70E+01	6,72E-03	6,08E-01	5,70E+01	1,07E-02	1,33E+00	5,70E+01	2,33E-02
10h K	3,67E-01	4,93E+01	7,45E-03	4,19E-01	4,93E+01	8,49E-03	1,23E+00	4,93E+01	2,50E-02
10h DMSO	3,84E-01	5,34E+01	7,19E-03	4,17E-01	5,34E+01	7,81E-03	1,28E+00	5,34E+01	2,40E-02
10h TMZ	3,98E-01	5,69E+01	7,00E-03	4,29E-01	5,69E+01	7,54E-03	1,35E+00	5,69E+01	2,37E-02
24h K	4,59E-01	4,76E+01	9,64E-03	6,41E-01	4,76E+01	1,35E-02	1,31E+00	4,76E+01	2,76E-02
24h DMSO	4,63E-01	3,65E+01	1,27E-02	4,44E-01	3,65E+01	1,22E-02	1,40E+00	3,65E+01	3,85E-02
24h TMZ	3,91E-01	3,40E+01	1,15E-02	4,44E-01	3,40E+01	1,31E-02	1,17E+00	3,40E+01	3,44E-02

K=unbehandelte Kontrollen, DMSO=Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, TMZ=Temozolomid-behandelte Zellen. Die Werte wurden mittels quantitativer *real time* PCR ermittelt und geben die relative mRNA-Expression wieder.

**Tabelle 8.4: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie KALI.**

Probe	Mittelwert MGMT	Mittelwert β-Aktin	MGMT/ β-Aktin	Mittelwert MLH1	Mittelwert β-Aktin	MLH1/ β-Aktin	Mittelwert MSH2	Mittelwert β-Aktin	MSH2/ β-Aktin
30' K	0,00E+00	6,84E+00	0,00E+00	1,74E+04	6,84E+00	2,55E+03	1,05E+00	6,84E+00	1,54E-01
30' DMSO	0,00E+00	1,10E+01	0,00E+00	1,90E+04	1,10E+01	1,73E+03	1,25E+00	1,10E+01	1,14E-01
30' TMZ	0,00E+00	8,01E+00	0,00E+00	1,69E+04	8,01E+00	2,11E+03	1,18E+00	8,01E+00	1,47E-01
1h K	0,00E+00	5,85E+00	0,00E+00	1,80E+04	5,85E+00	3,07E+03	1,17E+00	5,85E+00	1,99E-01
1h DMSO	0,00E+00	5,91E+00	0,00E+00	1,25E+04	5,91E+00	2,11E+03	8,27E-01	5,91E+00	1,40E-01
1h TMZ	0,00E+00	8,85E+00	0,00E+00	1,93E+04	8,85E+00	2,18E+03	9,31E-01	8,85E+00	1,05E-01
2h K	0,00E+00	1,07E+01	0,00E+00	2,24E+04	1,07E+01	2,10E+03	1,28E+00	1,07E+01	1,20E-01
2h DMSO	0,00E+00	1,71E+01	0,00E+00	2,62E+04	1,71E+01	1,53E+03	1,41E+00	1,71E+01	8,25E-02
2h TMZ	0,00E+00	9,64E+00	0,00E+00	1,61E+04	9,64E+00	1,67E+03	1,05E+00	9,64E+00	1,09E-01
4h K	0,00E+00	1,69E+01	0,00E+00	2,35E+04	1,69E+01	1,39E+03	1,44E+00	1,69E+01	8,53E-02
4h DMSO	0,00E+00	1,20E+01	0,00E+00	1,95E+04	1,20E+01	1,63E+03	1,16E+00	1,20E+01	9,67E-02
4h TMZ	0,00E+00	1,76E+01	0,00E+00	2,09E+04	1,76E+01	1,19E+03	1,46E+00	1,76E+01	8,31E-02
6h K	0,00E+00	1,55E+01	0,00E+00	1,74E+04	1,55E+01	1,13E+03	1,33E+00	1,55E+01	8,63E-02
6h DMSO	0,00E+00	1,49E+01	0,00E+00	1,89E+04	1,49E+01	1,27E+03	1,42E+00	1,49E+01	9,56E-02
6h TMZ	0,00E+00	1,54E+01	0,00E+00	2,01E+04	1,54E+01	1,30E+03	1,74E+00	1,54E+01	1,13E-01
10h K	0,00E+00	1,34E+01	0,00E+00	1,82E+04	1,34E+01	1,36E+03	1,53E+00	1,34E+01	1,14E-01
10h DMSO	0,00E+00	1,46E+01	0,00E+00	1,95E+04	1,46E+01	1,33E+03	1,82E+00	1,46E+01	1,24E-01
10h TMZ	0,00E+00	1,67E+01	0,00E+00	2,05E+04	1,67E+01	1,22E+03	2,35E+00	1,67E+01	1,40E-01
24h K	0,00E+00	1,86E+01	0,00E+00	3,34E+04	1,86E+01	1,80E+03	2,26E+00	1,86E+01	1,22E-01
24h DMSO	0,00E+00	1,59E+01	0,00E+00	2,83E+04	1,59E+01	1,78E+03	2,49E+00	1,59E+01	1,57E-01
24h TMZ	0,00E+00	1,40E+01	0,00E+00	2,94E+04	1,40E+01	2,11E+03	2,34E+00	1,40E+01	1,67E-01

K=unbehandelte Kontrollen, DMSO=Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, TMZ=Temozolomid-behandelte Zellen. Die Werte wurden mittels quantitativer *real time* PCR ermittelt und geben die relative mRNA-Expression wieder.

**Tabelle 8.5: Genexpression auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in der Melanom-Zelllinie LIBR.**

Probe	Mittelwert MGMT	Mittelwert β-Aktin	MGMT/ β-Aktin	Mittelwert MLH1	Mittelwert β-Aktin	MLH1/ β-Aktin	Mittelwert MSH2	Mittelwert β-Aktin	MSH2/ β-Aktin
30' K	0,00E+00	7,47E+00	0,00E+00	2,68E+00	7,47E+00	3,58E-01	1,18E+00	7,47E+00	1,58E-01
30' DMSO	0,00E+00	8,28E+00	0,00E+00	3,18E+00	8,28E+00	3,84E-01	1,32E+00	8,28E+00	1,59E-01
30' TMZ	0,00E+00	1,03E+01	0,00E+00	4,71E+00	1,03E+01	4,58E-01	1,62E+00	1,03E+01	1,57E-01
1h K	0,00E+00	8,48E+00	0,00E+00	4,10E+00	8,48E+00	4,83E-01	1,54E+00	8,48E+00	1,82E-01
1h DMSO	0,00E+00	1,04E+01	0,00E+00	3,84E+00	1,04E+01	3,69E-01	1,57E+00	1,04E+01	1,51E-01
1h TMZ	0,00E+00	8,12E+00	0,00E+00	2,92E+00	8,12E+00	3,59E-01	1,41E+00	8,12E+00	1,73E-01
2h K	0,00E+00	1,18E+01	0,00E+00	4,69E+00	1,18E+01	3,96E-01	1,62E+00	1,18E+01	1,37E-01
2h DMSO	0,00E+00	1,16E+01	0,00E+00	4,59E+00	1,16E+01	3,95E-01	1,49E+00	1,16E+01	1,28E-01
2h TMZ	0,00E+00	1,39E+01	0,00E+00	3,09E+00	1,39E+01	2,23E-01	1,67E+00	1,39E+01	1,20E-01
4h K	0,00E+00	1,28E+01	0,00E+00	4,06E+00	1,28E+01	3,17E-01	1,52E+00	1,28E+01	1,19E-01
4h DMSO	0,00E+00	1,54E+01	0,00E+00	3,36E+00	1,54E+01	2,18E-01	1,84E+00	1,54E+01	1,19E-01
4h TMZ	0,00E+00	1,44E+01	0,00E+00	4,23E+00	1,44E+01	2,94E-01	1,49E+00	1,44E+01	1,04E-01
6h K	0,00E+00	1,43E+01	0,00E+00	4,23E+00	1,43E+01	2,95E-01	1,41E+00	1,43E+01	9,84E-02
6h DMSO	0,00E+00	1,46E+01	0,00E+00	4,25E+00	1,46E+01	2,91E-01	1,62E+00	1,46E+01	1,11E-01
6h TMZ	0,00E+00	1,38E+01	0,00E+00	3,45E+00	1,38E+01	2,50E-01	1,66E+00	1,38E+01	1,20E-01
10h K	0,00E+00	1,42E+01	0,00E+00	3,36E+00	1,42E+01	2,36E-01	1,46E+00	1,42E+01	1,03E-01
10h DMSO	0,00E+00	1,45E+01	0,00E+00	3,40E+00	1,45E+01	2,34E-01	1,75E+00	1,45E+01	1,21E-01
10h TMZ	0,00E+00	1,53E+01	0,00E+00	4,66E+00	1,53E+01	3,04E-01	1,83E+00	1,53E+01	1,19E-01
24h K	0,00E+00	1,17E+01	0,00E+00	3,42E+00	1,17E+01	2,91E-01	1,83E+00	1,17E+01	1,56E-01
24h DMSO	0,00E+00	1,13E+01	0,00E+00	3,38E+00	1,13E+01	3,00E-01	1,88E+00	1,13E+01	1,66E-01
24h TMZ	0,00E+00	1,11E+01	0,00E+00	4,29E+00	1,11E+01	3,87E-01	1,76E+00	1,11E+01	1,59E-01

K=unbehandelte Kontrollen, DMSO=Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, TMZ=Temozolomid-behandelte Zellen. Die Werte wurden mittels quantitativer *real time* PCR ermittelt und geben die relative mRNA-Expression wieder.

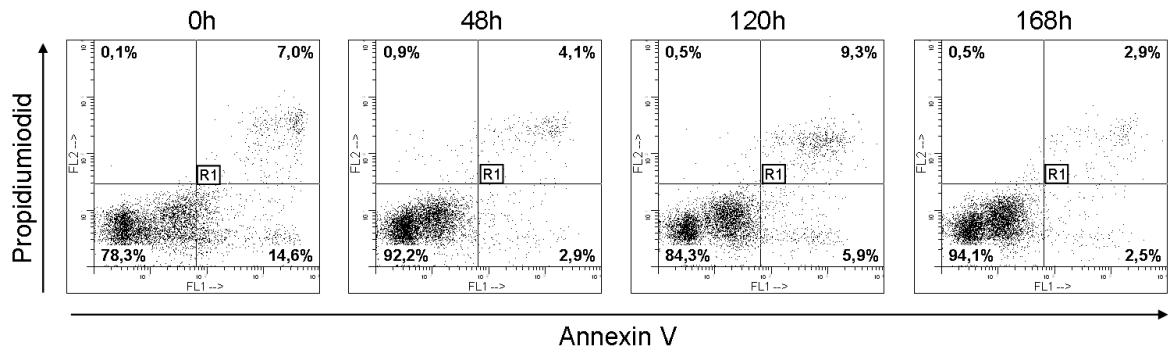
**Tabelle 8.6: Genexpression auf mRNA-Ebene nach einem kompletten Behandlungszyklus mit Temozolomid.**

<b>Mel A</b>	<b>MGMT</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MGMT/ β-Aktin</b>	<b>MLH1</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MLH1/ β-Aktin</b>	<b>MSH2</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MSH2/ β-Aktin</b>
1 × K	1,07E-07	4,55E+00	2,36E-08	8,91E-01	4,55E+00	1,96E-01	1,11E+00	4,55E+00	2,45E-01
1 × DMSO	0,00E+00	4,72E+00	0,00E+00	1,06E+00	4,72E+00	2,24E-01	1,27E+00	4,72E+00	2,69E-01
1 × TMZ	2,47E-04	4,50E+00	5,48E-05	1,77E+00	4,50E+00	3,93E-01	2,27E+00	4,50E+00	5,04E-01
5 × K	7,13E-06	2,48E+00	2,88E-06	6,24E-01	2,48E+00	2,52E-01	8,06E-01	2,48E+00	3,25E-01
5 × DMSO	1,13E-05	3,29E+00	3,43E-06	7,71E-01	3,29E+00	2,35E-01	9,23E-01	3,29E+00	2,81E-01
5 × TMZ	1,63E-05	4,95E+00	3,29E-06	1,04E+00	4,95E+00	2,10E-01	1,18E+00	4,95E+00	2,39E-01
<b>Mel B</b>	<b>MGMT</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MGMT/ β-Aktin</b>	<b>MLH1</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MLH1/ β-Aktin</b>	<b>MSH2</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MSH2/ β-Aktin</b>
1 × K	0,00E+00	6,54E+00	0,00E+00	8,95E-01	6,54E+00	1,37E-01	3,87E-01	6,54E+00	5,91E-02
1 × DMSO	9,56E-07	6,45E+00	1,48E-07	8,23E-01	6,45E+00	1,28E-01	4,36E-01	6,45E+00	6,76E-02
1 × TMZ	0,00E+00	6,74E+00	0,00E+00	9,95E-01	6,74E+00	1,48E-01	5,33E-01	6,74E+00	7,91E-02
5 × K	0,00E+00	5,39E+00	0,00E+00	5,63E-01	5,39E+00	1,05E-01	1,97E-01	5,39E+00	3,66E-02
5 × DMSO	0,00E+00	6,03E+00	0,00E+00	7,63E-01	6,03E+00	1,26E-01	2,41E-01	6,03E+00	4,00E-02
5 × TMZ	7,66E-06	5,24E+00	1,46E-06	7,99E-01	5,24E+00	1,52E-01	3,08E-01	5,24E+00	5,88E-02
<b>Mel C</b>	<b>MGMT</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MGMT/ β-Aktin</b>	<b>MLH1</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MLH1/ β-Aktin</b>	<b>MSH2</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MSH2/ β-Aktin</b>
1 × K	1,50E-01	3,73E+00	4,01E-02	7,76E-01	3,73E+00	2,08E-01	9,70E-01	3,73E+00	2,60E-01
1 × DMSO	2,00E-01	4,15E+00	4,82E-02	9,94E-01	4,15E+00	2,40E-01	1,27E+00	4,15E+00	3,06E-01
1 × TMZ	2,78E-01	7,85E+00	3,54E-02	1,48E+00	7,85E+00	1,89E-01	1,56E+00	7,85E+00	1,99E-01
5 × K	2,98E-01	6,56E+00	4,54E-02	1,49E+00	6,56E+00	2,27E-01	1,09E+00	6,56E+00	1,66E-01
5 × DMSO	2,16E-01	3,93E+00	5,50E-02	9,12E-01	3,93E+00	2,32E-01	6,55E-01	3,93E+00	1,66E-01
5 × TMZ	3,04E-01	4,81E+00	6,31E-02	1,15E+00	4,81E+00	2,39E-01	1,18E+00	4,81E+00	2,44E-01
<b>KAI</b>	<b>MGMT</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MGMT/ β-Aktin</b>	<b>MLH1</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MLH1/ β-Aktin</b>	<b>MSH2</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MSH2/ β-Aktin</b>
1 × K	3,00E-04	9,91E+00	3,03E-05	1,15E+00	9,91E+00	1,16E-01	1,27E+00	9,91E+00	1,28E-01
1 × DMSO	9,16E-06	8,08E+00	1,13E-06	8,85E-01	8,08E+00	1,10E-01	1,50E+00	8,08E+00	1,86E-01
1 × TMZ	6,93E-05	1,35E+01	5,14E-06	1,81E+00	1,35E+01	1,34E-01	2,65E+00	1,35E+01	1,97E-01
5 × K	0,00E+00	7,82E+00	0,00E+00	8,91E-01	7,82E+00	1,14E-01	1,21E+00	7,82E+00	1,55E-01
5 × DMSO	0,00E+00	7,27E+00	0,00E+00	8,68E-01	7,27E+00	1,19E-01	1,13E+00	7,27E+00	1,55E-01
5 × TMZ	4,18E-06	8,36E+00	5,01E-07	1,03E+00	8,36E+00	1,24E-01	1,59E+00	8,36E+00	1,90E-01
<b>LIBR</b>	<b>MGMT</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MGMT/ β-Aktin</b>	<b>MLH1</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MLH1/ β-Aktin</b>	<b>MSH2</b>	<b>β-Aktin</b>	<b>MSH2/ β-Aktin</b>
1 × K	0,00E+00	6,38E+00	0,00E+00	1,53E+00	6,38E+00	2,40E-01	1,67E+00	6,38E+00	2,62E-01
1 × DMSO	0,00E+00	7,35E+00	0,00E+00	1,95E+00	7,35E+00	2,65E-01	2,08E+00	7,35E+00	2,83E-01
1 × TMZ	9,15E-05	6,64E+00	1,38E-05	1,45E+00	6,64E+00	2,19E-01	1,49E+00	6,64E+00	2,24E-01
5 × K	4,90E-06	3,94E+00	1,25E-06	1,06E+00	3,94E+00	2,70E-01	1,15E+00	3,94E+00	2,91E-01
5 × DMSO	0,00E+00	3,94E+00	0,00E+00	1,11E+00	3,94E+00	2,83E-01	1,06E+00	3,94E+00	2,70E-01
5 × TMZ	3,73E-05	3,41E+00	1,10E-05	1,06E+00	3,41E+00	3,10E-01	1,08E+00	3,41E+00	3,16E-01

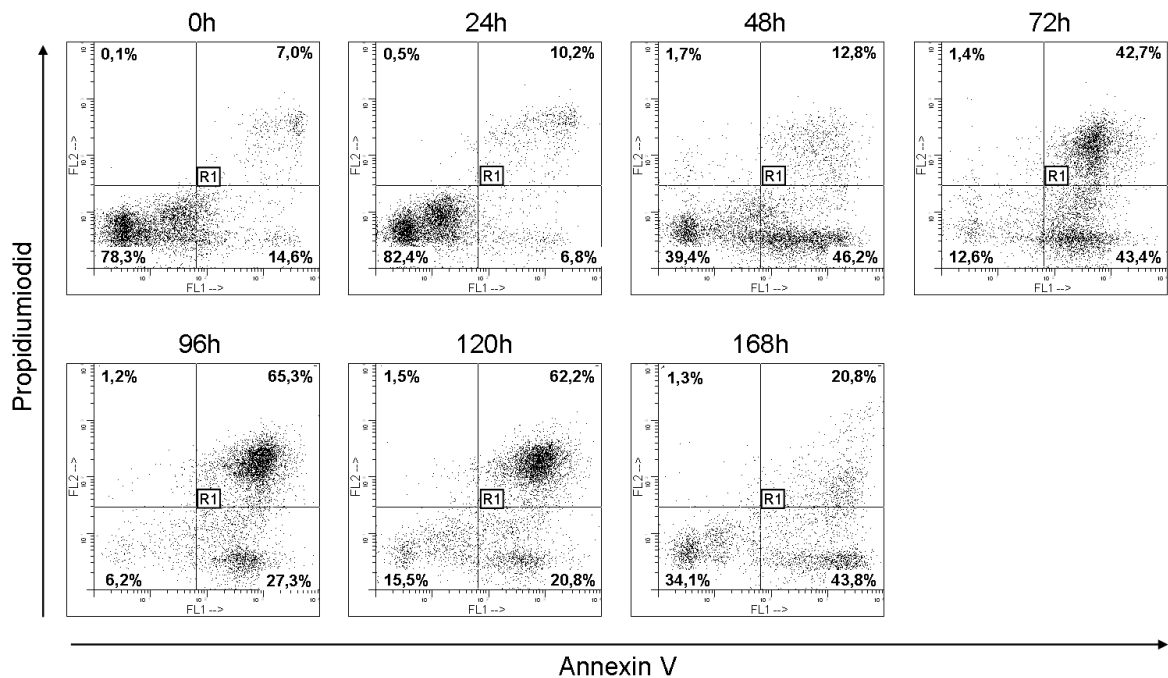
K=unbehandelte Kontrollen, DMSO=Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, TMZ=Temozolomid-behandelte Zellen, 1 × =einmalige Temozolomid-Behandlung, 5 × =fünfmalige Temozolomid-Behandlung Die Werte wurden mittels quantitativer *real time* PCR ermittelt und geben die relative mRNA-Expression wieder.

## 8.2 Daten zur Apoptose-/Nekrose-Bestimmung (zu Kapitel 3.3.5)

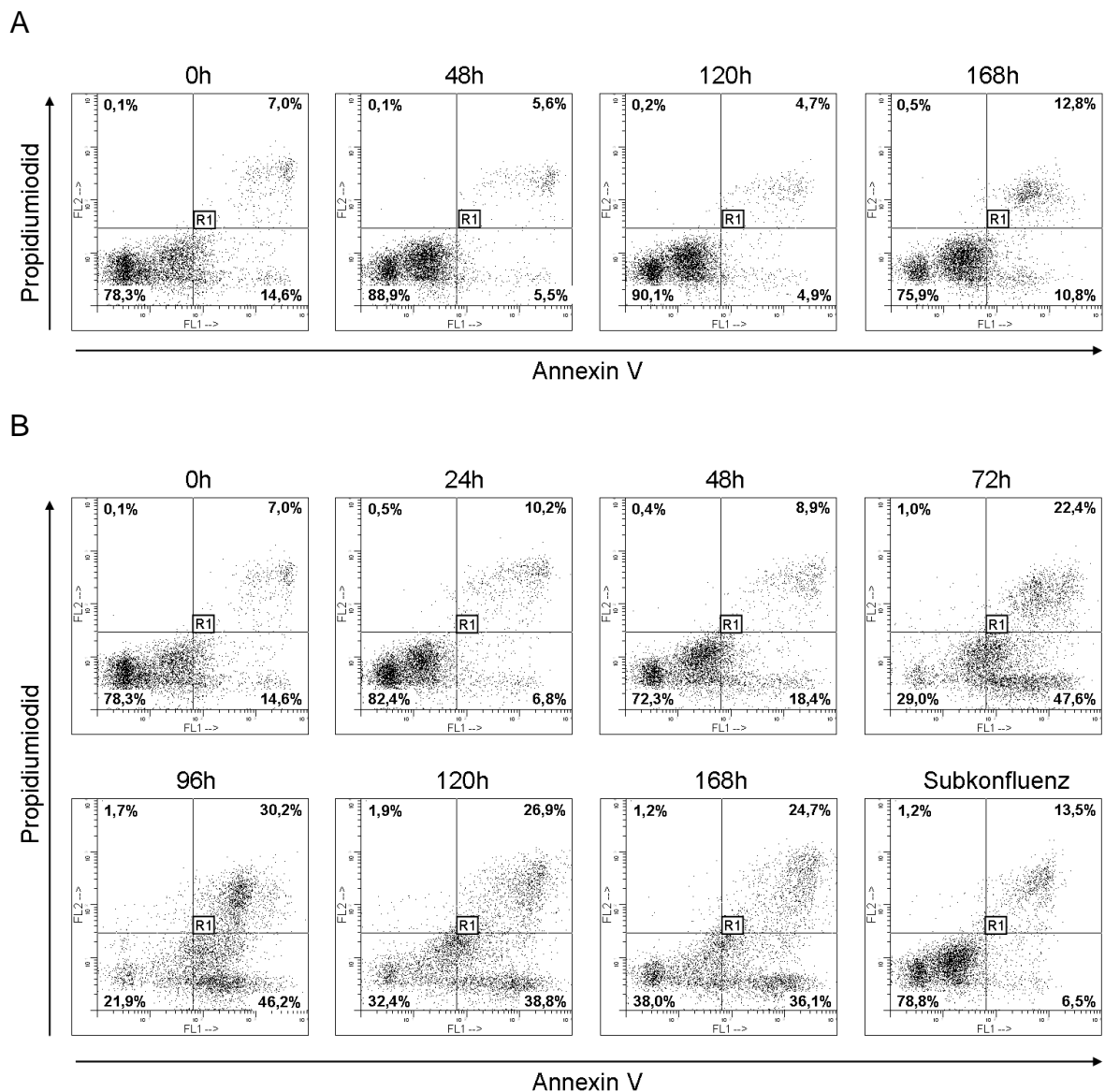
A



B



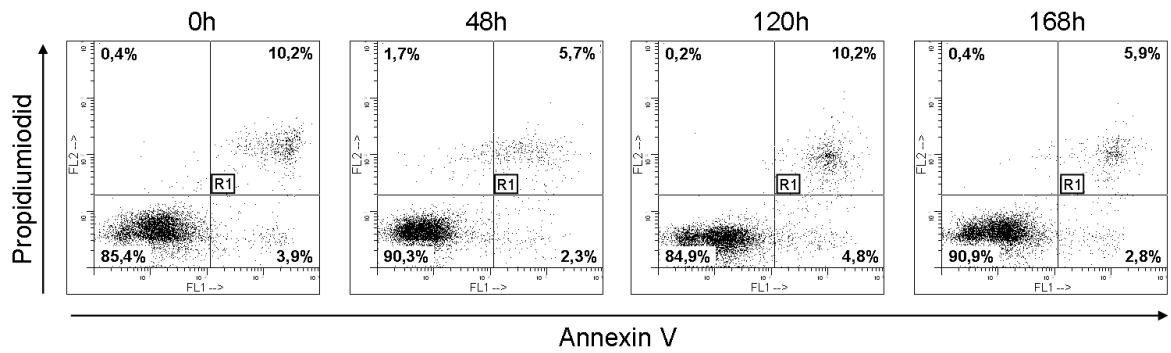
**Abbildung 8.1: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer Mela-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden einmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden einmal mit 500 µM Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.



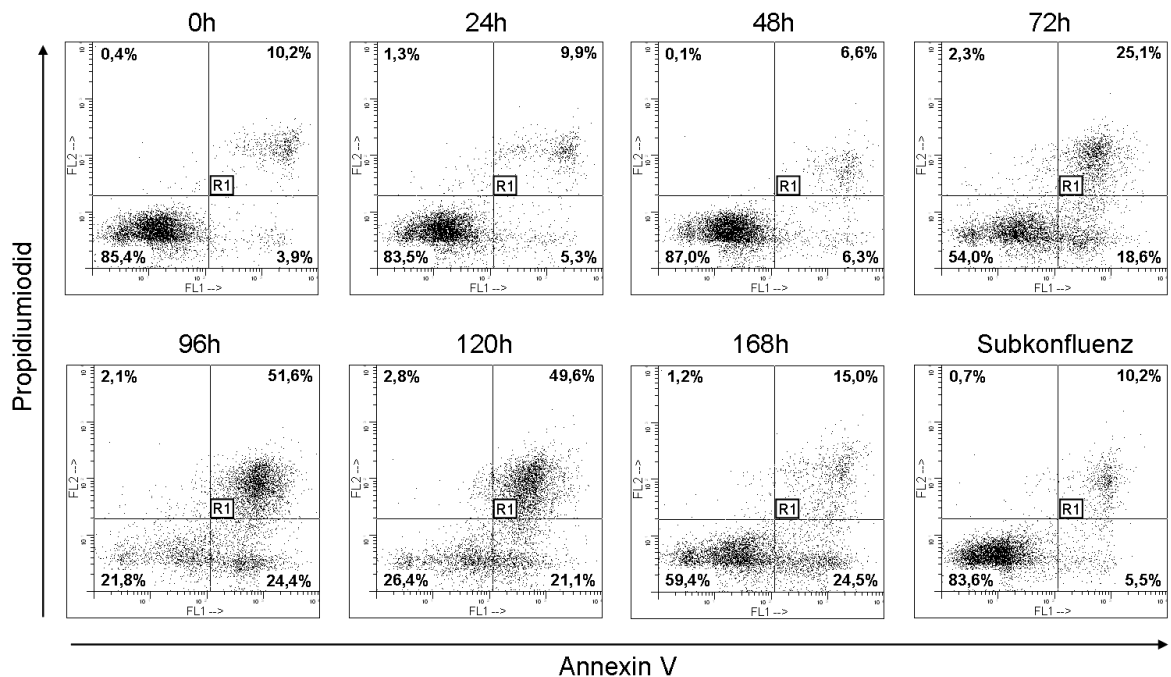
**Abbildung 8.2: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MeIA-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden fünfmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden fünfmal mit 500  $\mu\text{M}$  Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.



A

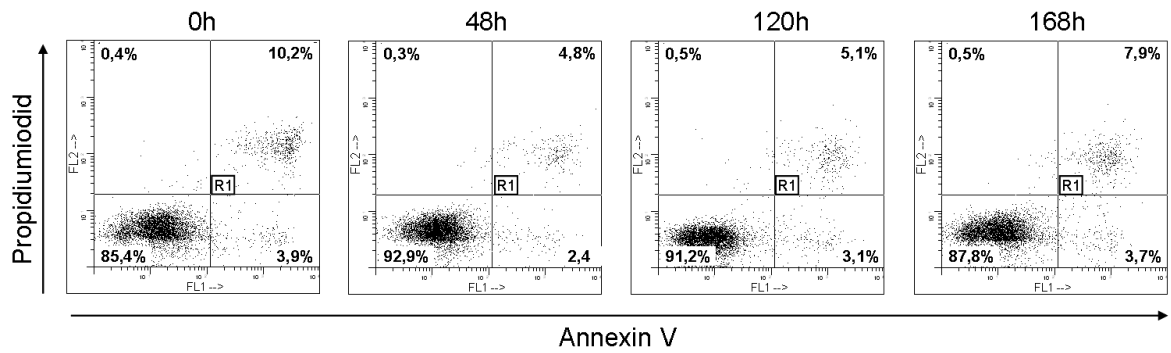


B

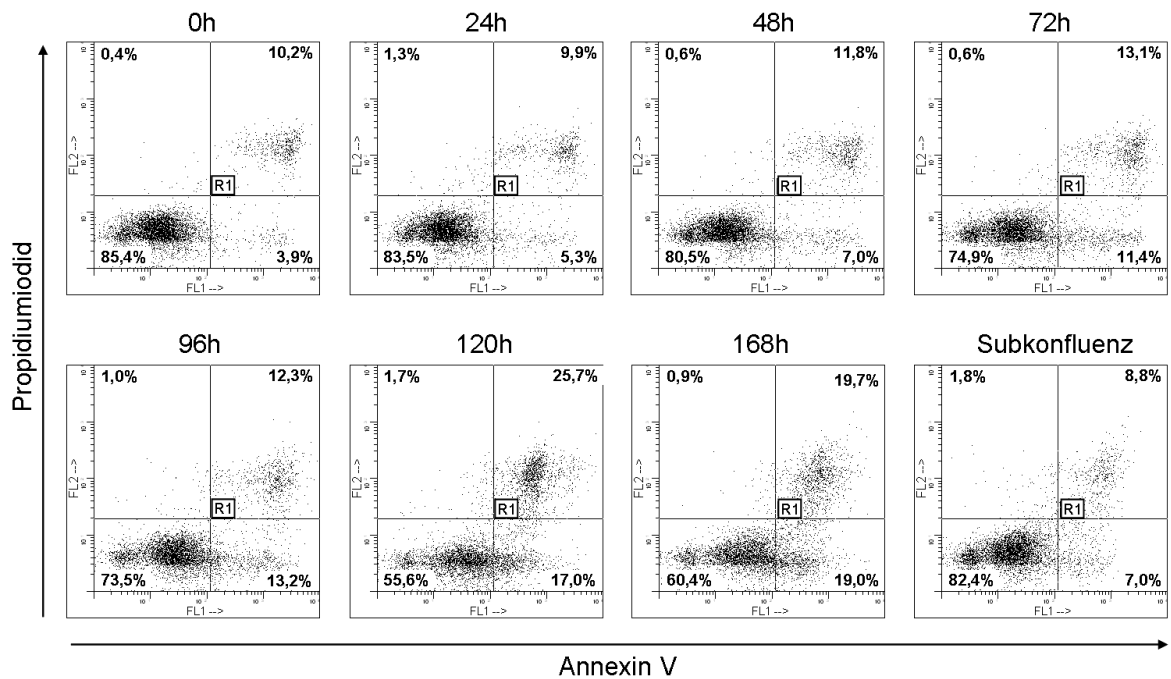


**Abbildung 8.3: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MeIB-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden einmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden einmal mit 500  $\mu$ M Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

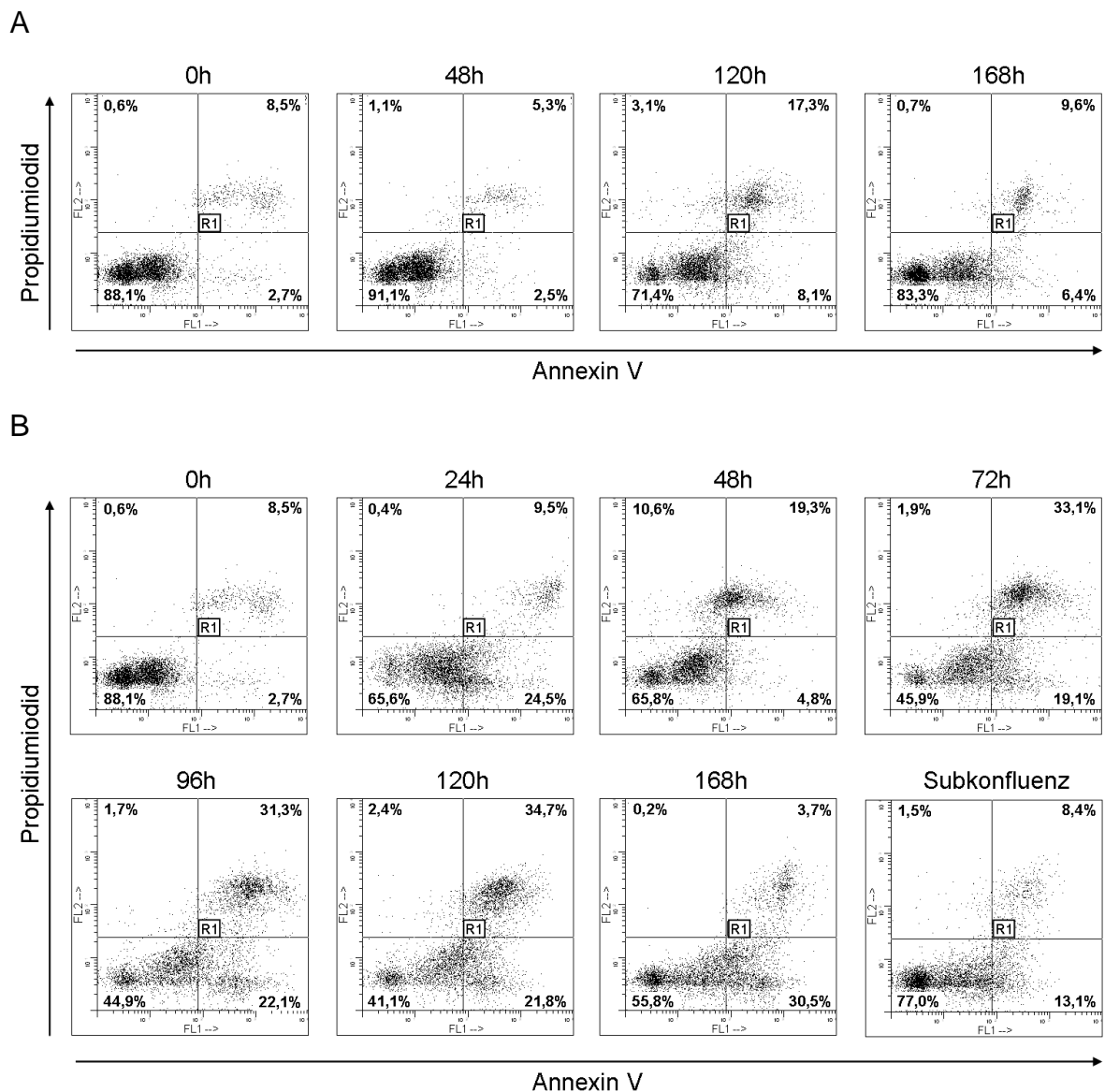
A



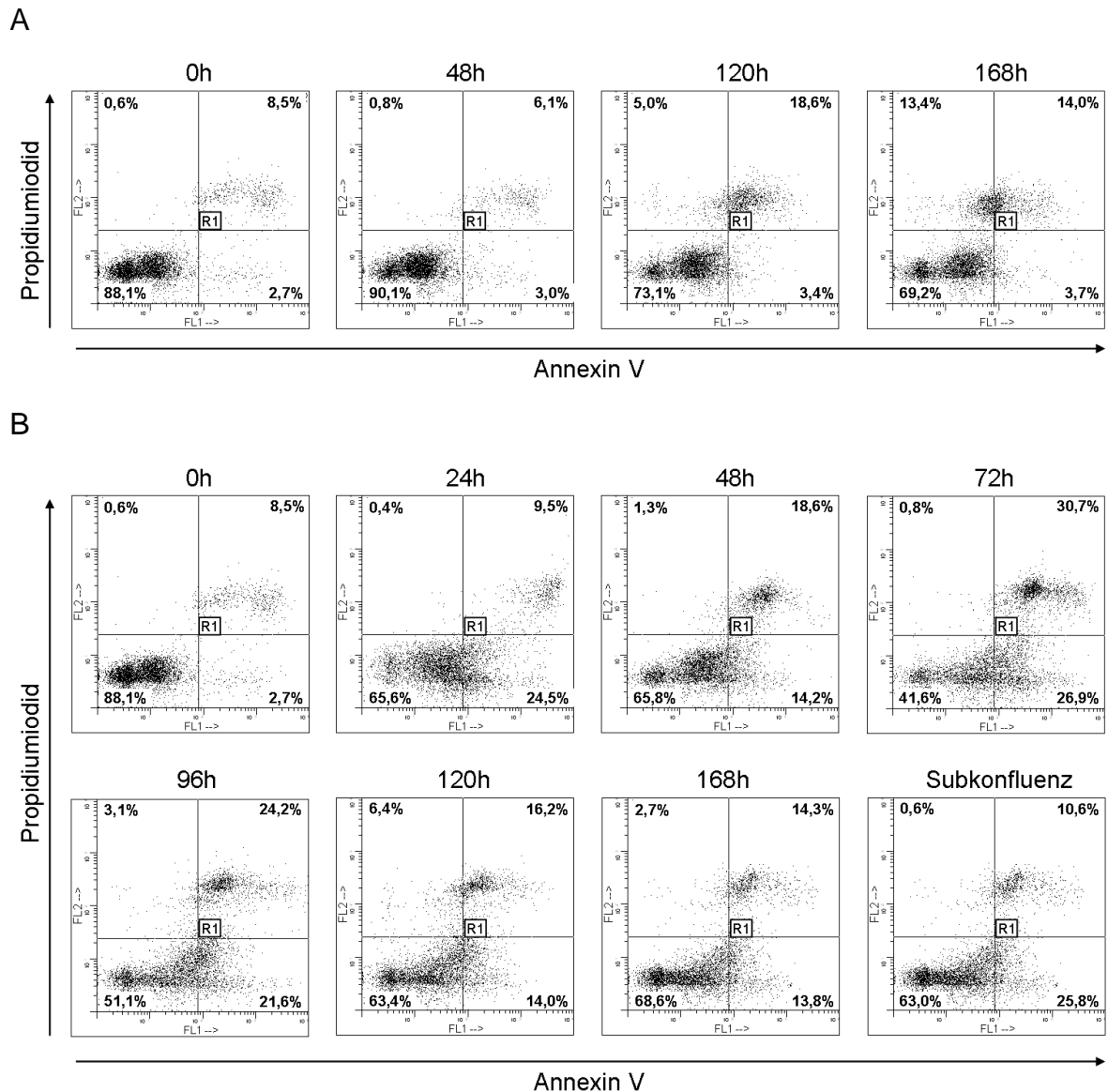
B



**Abbildung 8.4: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MeIB-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden fünfmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden fünfmal mit 500 µM Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

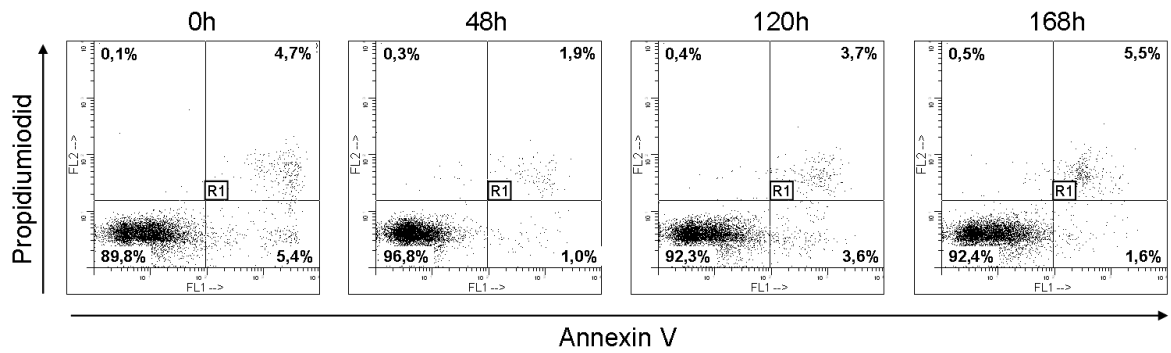


**Abbildung 8.5: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MeIC-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden einmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden einmal mit 800  $\mu$ M Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

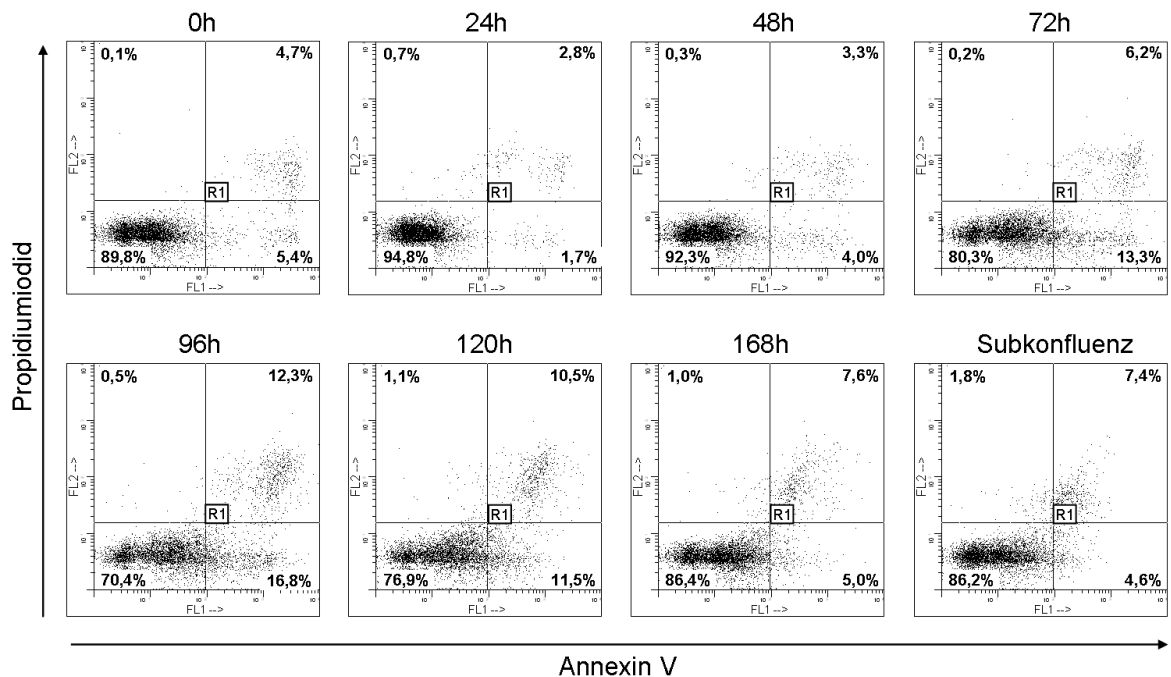


**Abbildung 8.6: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer MeIC-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden fünfmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden fünfmal mit 800  $\mu\text{M}$  Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

A

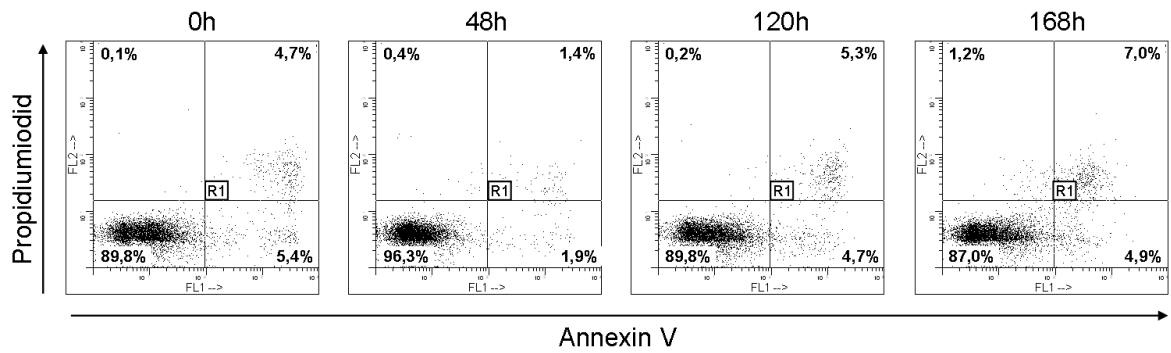


B

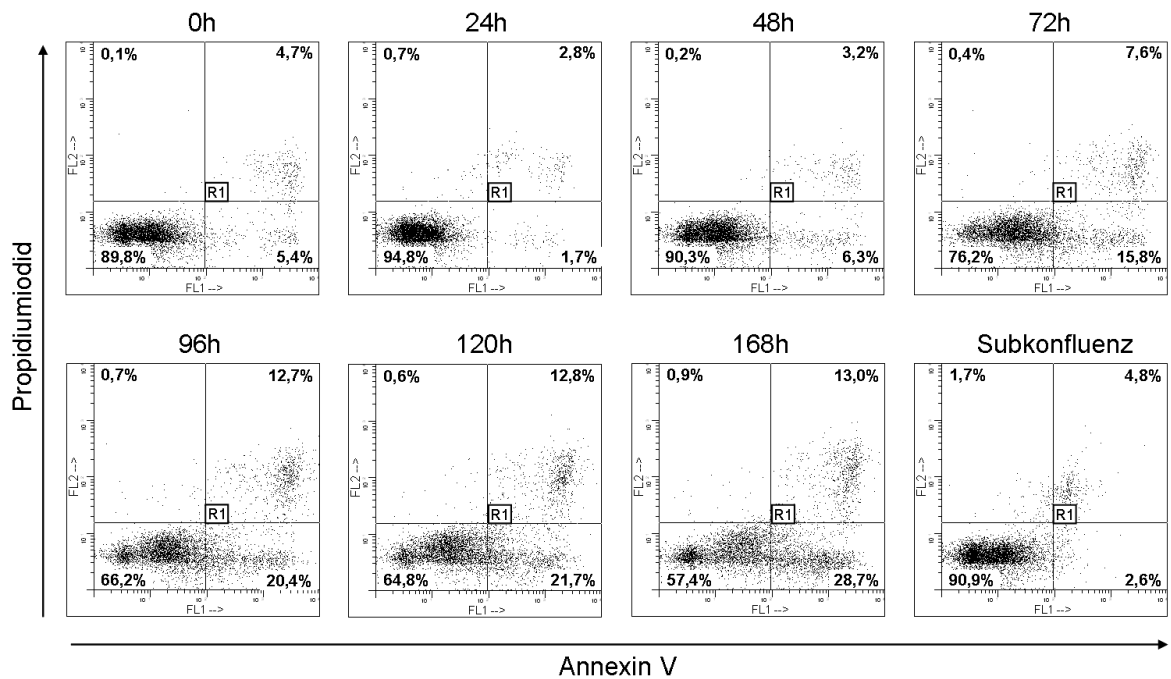


**Abbildung 8.7: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer KAll-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden einmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden einmal mit 150  $\mu$ M Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

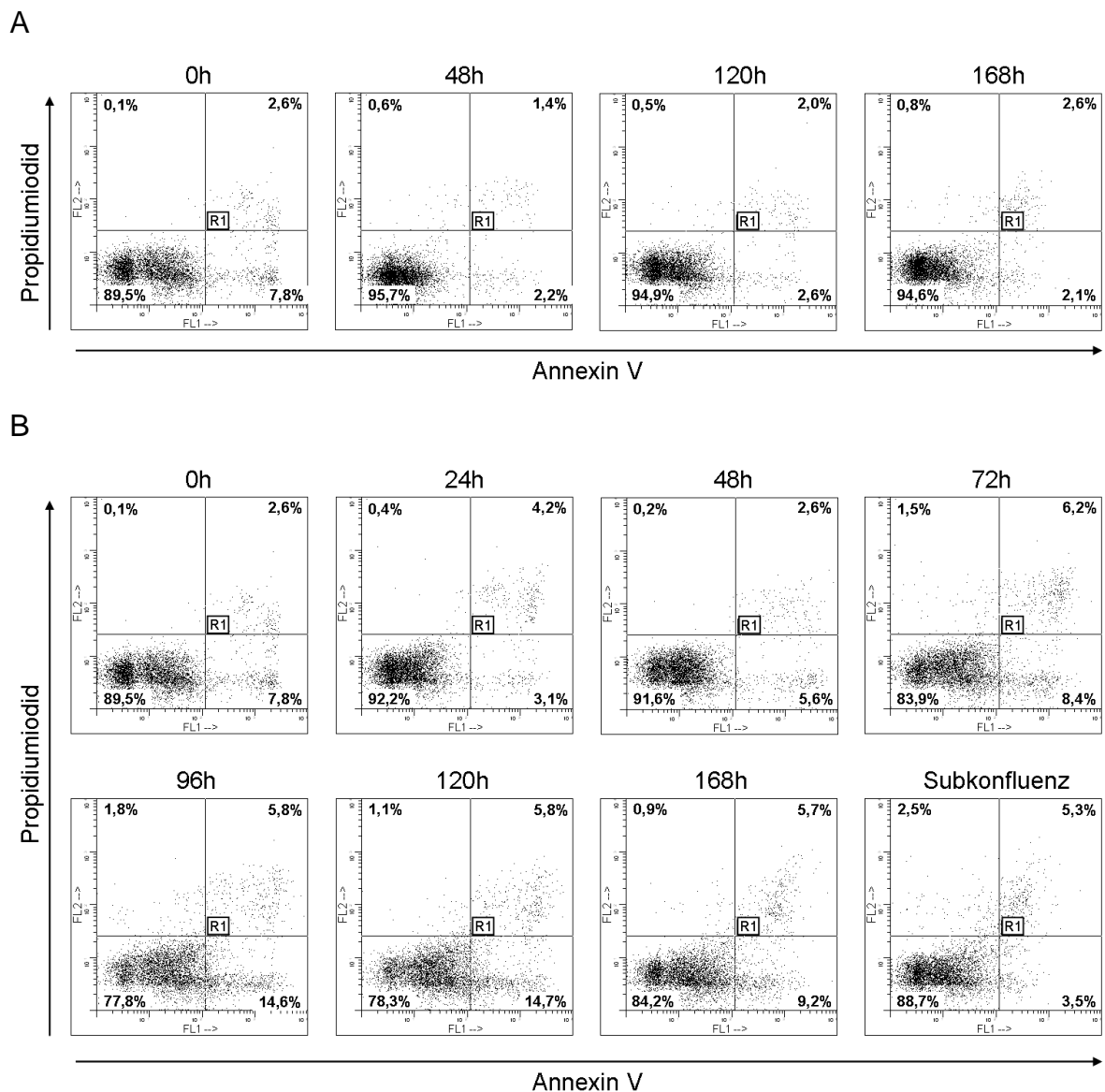
A



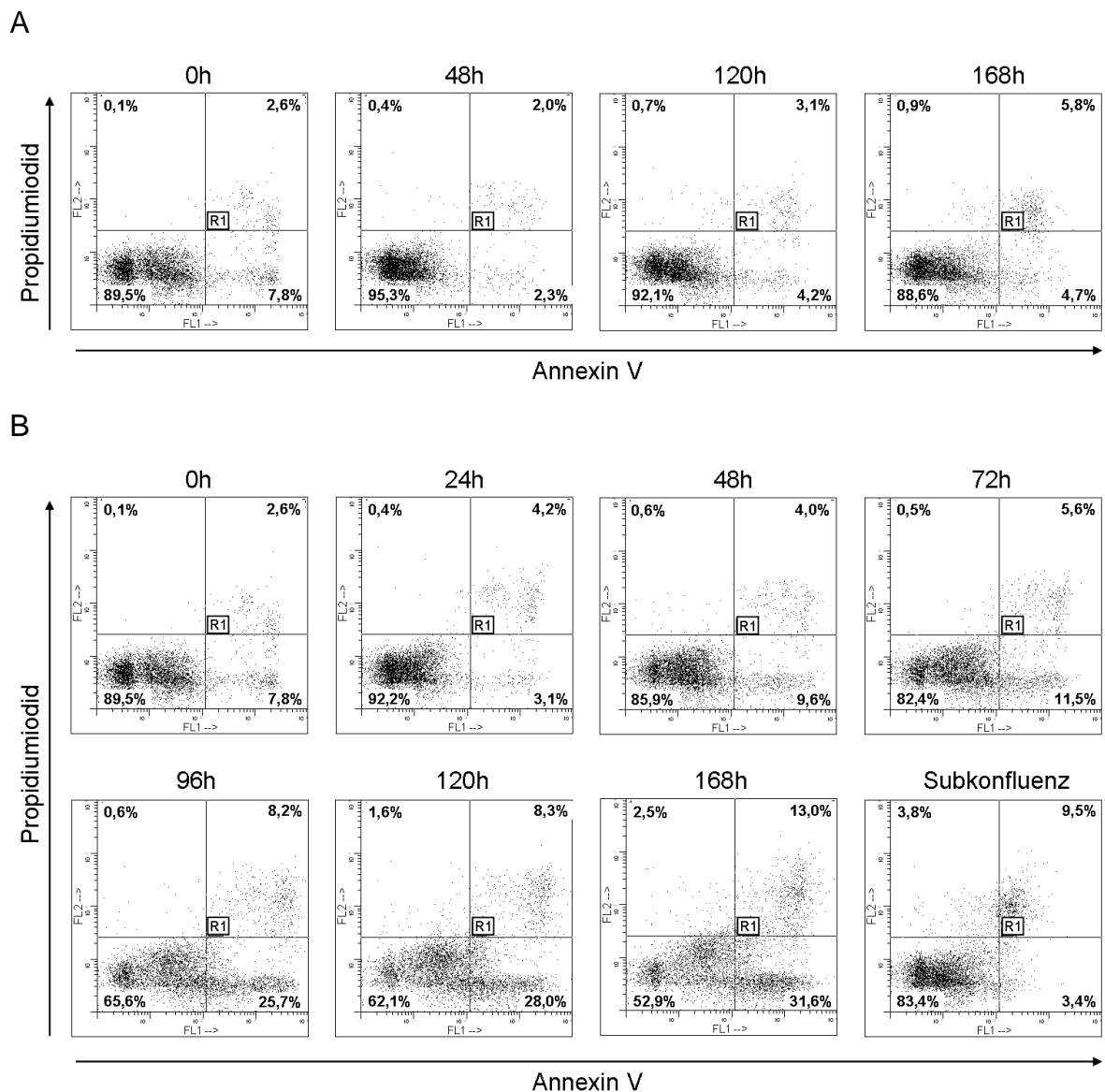
B



**Abbildung 8.8: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer KAll-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden fünfmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden fünfmal mit 150 µM Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.



**Abbildung 8.9: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer LIBR-Zellen nach einmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden einmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden einmal mit 150  $\mu$ M Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.



**Abbildung 8.10: Nachweis vitaler-, apoptotischer- beziehungsweise nekrotischer LIBR-Zellen nach fünfmaliger Temozolomid-Behandlung.** (A) Kontroll-Zellen wurden fünfmal mit DMSO behandelt. (B) Zellen wurden fünfmal mit 150 µM Temozolomid behandelt. Alle Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Annexin V-EGFP Fusionsprotein gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.



### 8.3 Daten zur mRNA-Expression von *ABCB1* nach Temozolomid-Behandlung von Melanom-Zelllinien (zu Kapitel 3.3.8)

Tabelle 8.7: Genexpression von *ABCB1* auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in den Melanom-Zelllinien MeIA, MeIB und MeIC.

Probe	MeIA			MeIB			MeIC		
	Mittelwert <i>ABCB1</i>	Mittelwert $\beta$ -Aktin	<i>ABCB1</i> / $\beta$ -Aktin	Mittelwert <i>ABCB1</i>	Mittelwert $\beta$ -Aktin	<i>ABCB1</i> / $\beta$ -Aktin	Mittelwert <i>ABCB1</i>	Mittelwert $\beta$ -Aktin	<i>ABCB1</i> / $\beta$ -Aktin
30' K	7,14E-04	3,25E+00	2,20E-04	2,88E-03	1,94E+01	1,48E-04	4,05E-05	2,55E+01	1,59E-06
30' DMSO	7,88E-04	4,35E+00	1,81E-04	4,03E-03	2,56E+01	1,57E-04	2,87E-05	3,78E+01	7,59E-07
30' TMZ	6,75E-04	2,62E+00	2,58E-04	3,79E-03	2,06E+01	1,84E-04	5,08E-05	2,53E+01	2,00E-06
1h K	7,97E-04	3,91E+00	2,04E-04	4,03E-03	2,49E+01	1,62E-04	4,64E-05	2,41E+01	1,92E-06
1h DMSO	1,02E-03	1,11E+00	9,21E-04	2,68E-03	2,59E+01	1,03E-04	6,23E-05	2,49E+01	2,50E-06
1h TMZ	8,49E-04	3,23E+00	2,63E-04	4,48E-03	2,72E+01	1,65E-04	4,50E-05	3,14E+01	1,43E-06
2h K	9,17E-04	4,87E+00	1,88E-04	3,39E-03	2,73E+01	1,25E-04	4,70E-05	3,18E+01	1,48E-06
2h DMSO	8,95E-04	4,06E+00	2,20E-04	3,80E-03	3,02E+01	1,26E-04	2,43E-05	3,27E+01	7,43E-07
2h TMZ	9,57E-04	3,81E+00	2,51E-04	4,43E-03	3,48E+01	1,27E-04	6,70E-05	4,06E+01	1,65E-06
4h K	8,36E-04	6,46E+00	1,29E-04	4,45E-03	3,91E+01	1,14E-04	6,68E-05	4,46E+01	1,50E-06
4h DMSO	9,31E-04	6,40E+00	1,45E-04	4,72E-03	4,00E+01	1,18E-04	4,84E-05	5,18E+01	9,34E-07
4h TMZ	8,07E-04	5,17E+00	1,56E-04	2,46E-03	3,03E+01	8,11E-05	4,04E-05	6,51E+01	6,21E-07
6h K	1,14E-03	8,48E+00	1,34E-04	4,52E-03	4,30E+01	1,05E-04	4,79E-05	5,67E+01	8,44E-07
6h DMSO	1,41E-03	8,10E+00	1,74E-04	5,64E-03	3,97E+01	1,42E-04	5,99E-05	6,25E+01	9,58E-07
6h TMZ	1,12E-03	8,83E+00	1,27E-04	5,17E-03	4,23E+01	1,22E-04	4,98E-05	5,70E+01	8,74E-07
10h K	9,98E-04	6,18E+00	1,61E-04	6,29E-03	4,96E+01	1,27E-04	3,67E-05	4,93E+01	7,44E-07
10h DMSO	1,13E-03	4,51E+00	2,50E-04	5,70E-03	4,43E+01	1,29E-04	5,53E-05	5,34E+01	1,03E-06
10h TMZ	1,02E-03	5,20E+00	1,96E-04	5,50E-03	3,50E+01	1,57E-04	3,50E-05	5,69E+01	6,16E-07
24h K	1,12E-03	6,51E+00	1,73E-04	8,52E-03	3,43E+01	2,48E-04	6,13E-05	4,76E+01	1,29E-06
24h DMSO	1,93E-03	6,65E+00	2,90E-04	7,15E-03	3,35E+01	2,14E-04	5,54E-05	3,65E+01	1,52E-06
24h TMZ	1,67E-03	4,08E+00	4,09E-04	1,00E-02	2,56E+01	3,92E-04	4,06E-05	3,40E+01	1,19E-06

K=unbehandelte Kontrollen, DMSO=Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, TMZ=Temozolomid-behandelte Zellen. Die Werte wurden mittels quantitativer *real time* PCR ermittelt und geben die relative mRNA-Expression wieder.

**Tabelle 8.8: Genexpression von *ABCB1* auf mRNA-Ebene nach Temozolomid-Behandlung in den Melanom-Zelllinien KAI1 und LIBR.**

Probe	KAI1			LIBR		
	Mittelwert <i>ABCB1</i>	Mittelwert $\beta$ -Aktin	<i>ABCB1</i> / $\beta$ -Aktin	Mittelwert <i>ABCB1</i>	Mittelwert $\beta$ -Aktin	<i>ABCB1</i> / $\beta$ -Aktin
30' K	3,616E-02	6,84E+00	5,29E-03	6,95E-02	7,47E+00	9,31E-03
30' DMSO	4,452E-02	1,10E+01	4,07E-03	7,89E-02	8,28E+00	9,52E-03
30' TMZ	3,824E-02	8,01E+00	4,77E-03	1,04E-01	1,03E+01	1,01E-02
1h K	3,283E-02	5,85E+00	5,61E-03	7,95E-02	8,48E+00	9,38E-03
1h DMSO	2,609E-02	5,91E+00	4,41E-03	8,70E-02	1,04E+01	8,35E-03
1h TMZ	5,529E-02	8,85E+00	6,25E-03	6,79E-02	8,12E+00	8,37E-03
2h K	4,138E-02	1,07E+01	3,87E-03	9,04E-02	1,18E+01	7,64E-03
2h DMSO	7,088E-02	1,71E+01	4,15E-03	9,35E-02	1,16E+01	8,05E-03
2h TMZ	3,884E-02	9,64E+00	4,03E-03	9,92E-02	1,39E+01	7,16E-03
4h K	9,200E-02	1,69E+01	5,44E-03	9,62E-02	1,28E+01	7,51E-03
4h DMSO	4,163E-02	1,20E+01	3,48E-03	1,09E-01	1,54E+01	7,02E-03
4h TMZ	4,254E-02	1,76E+01	2,42E-03	9,41E-02	1,44E+01	6,53E-03
6h K	3,206E-02	1,55E+01	2,07E-03	1,15E-01	1,43E+01	8,02E-03
6h DMSO	4,183E-02	1,49E+01	2,81E-03	1,14E-01	1,46E+01	7,77E-03
6h TMZ	4,716E-02	1,54E+01	3,06E-03	9,16E-02	1,38E+01	6,63E-03
10h K	4,233E-02	1,34E+01	3,17E-03	1,15E-01	1,42E+01	8,08E-03
10h DMSO	5,172E-02	1,46E+01	3,53E-03	1,24E-01	1,45E+01	8,57E-03
10h TMZ	4,818E-02	1,67E+01	2,88E-03	1,73E-01	1,53E+01	1,13E-02
24h K	1,274E-01	1,86E+01	6,85E-03	1,20E-01	1,17E+01	1,02E-02
24h DMSO	9,064E-02	1,59E+01	5,71E-03	1,30E-01	1,13E+01	1,15E-02
24h TMZ	9,459E-02	1,40E+01	6,76E-03	1,51E-01	1,11E+01	1,36E-02

K=unbehandelte Kontrollen, DMSO=Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, TMZ=Temozolomid-behandelte Zellen. Die Werte wurden mittels quantitativer *real time* PCR ermittelt und geben die relative mRNA-Expression wieder.

## 9 Lebenslauf

Lars Böckmann  
Eisenbahnstraße 15  
37073 Göttingen

### Promotion

Seit Januar 2007

#### Stipendiat des DFG Graduiertenkolleg 1034

„Die Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie: Von den Grundlagen zur individualisierten Therapie“

Sprecher: Prof. Dr. Jürgen Brockmöller

Promotion zum Thema:

„Untersuchungen zur Wirksamkeit von Dacarbazin und Temozolomid bei der Behandlung des kutanen Melanoms in Assoziation mit DNA-Reparatur“  
in der Abt. Dermatologie, Venerologie und Allergologie,  
Universitätsmedizin Göttingen

Anleiter: Prof. Steffen Emmert

Betreuer: PD Dr. Wilfried Kramer  
Prof. Dr. Jürgen Brockmöller

### Studium

10.2001-10.2006

#### Studium an der Georg-August-Universität Göttingen im Diplomstudiengang Biologie

Hauptfach: Biochemie

1. Nebenfach: Mikrobiologie

2. Nebenfach: Chemie

Diplomarbeit zum Thema:

„H1-Histon-Subtypen-Zusammensetzung und die spezifische Freisetzung der H1-Histon-Subtypen während der Apoptose“

in der Abt. Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Betreuer: Prof. Dr. Detlef Doenecke

Prof. Dr. Rüdiger Hardeland

09.2004-07.2005

Auslandsstudium an der *Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"* in Rom, Italien

### Zivildienst

10.2000-08.2001

Tabea-Krankenhaus, Hamburg

### Schulbildung

08.1987-07.2000

Freie Waldorfschule Itzehoe, Abschluss: Abitur

## 10 Veröffentlichungen

### 10.1 Publikationen

Boeckmann L, Schirmer M, Rosenberger A, Struever D, Thoms KM, Gutzmer R, Has C, Kunz M, Kuschal C, Laspe P, Schoen MP, Brockmoeller J, Emmert S. Effect of DNA repair host factors on temozolomide or dacarbazine melanoma treatment in Caucasians. *Pharmacogenet Genomics*. Epub 2009 Sep 15.

Boeckmann L, Thoms KM, Gutzmer R, Has C, Kunz M, Kuschal C, Laspe P, Struever D, Emmert S. Modulation of the efficacy of temozolomide and dacarbazine melanoma treatment by DNA-repair factors in vivo and in vitro. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009 Jan;47(1):33-5.

Knudsen S, Schardt A, Buhl T, Boeckmann L, Schön MP, Neumann C, Haenssle HA. Enhanced T cell activation by immature dendritic cells loaded with HSP70-expressing heat-killed melanoma cells. *Exp Dermatol*. 2009 Epub 2009 Sep 15.

Kuschal C, Thoms KM, Mori T, Kobayashi N, Boeckmann L, Laspe P, Emmert S. Cyclosporin A, but not everolimus, inhibits DNA repair in human fibroblasts and lymphoblasts. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009 Jan;47(1):38-40.

Schoof N, von Bonin F, König IR, Mössner R, Krüger U, Reich K, Berking C, Volkenandt M, Ziegler A, Böckmann L, Kuschal C, Thoms KM, Kube D, Emmert S. Distal and proximal interleukin (IL)-10 promoter polymorphisms associated with risk of cutaneous melanoma development: a case-control study. *Genes Immun*. 2009 Sep;10(6):586-90. Epub 2009 May 21.

Emmert S, Ueda T, Zumsteg U, Weber P, Khan SG, Oh KS, Boyle J, Laspe P, Zachmann K, Boeckmann L, Kuschal C, Bircher A, Kraemer KH. Strict sun protection results in minimal skin changes in a patient with xeroderma pigmentosum and a novel c.2009delG mutation in XPD (ERCC2). *Exp Dermatol*. 2009 Jan;18(1):64-8. Epub 2008 Jul 7.

Thoms KM, Kuschal C, Oetjen E, Mori T, Kobayashi N, Laspe P, Boeckmann L, Schön MP, Emmert S (2009) Cyclosporin A, but not everolimus, inhibits DNA repair mediated by calcineurin: Implications for tumorigenesis under immunosuppression. *Eingereicht*.

Kuschal C, Thoms KM, Boeckmann L, Laspe P, Apel A, Schön MP, Emmert S (2009) Cyclosporin A inhibits nukleotide excision repair via downregulation of the xeroderma pigmentosum group A and G proteins which is mediated by calcineurin. *Manuskript*.

## **10.2 Kongressbeiträge**

### **Vortrag**

Boeckmann L, Schirmer M, Rosenberger A, Struevern D, Thoms KM, Gutzmer R, Has C, Kunz M, Kuschal C, Laspe P, Schoen MP, Brockmoeller J, Emmert S. Effect of DNA repair host factors on temozolomide or dacarbazine melanoma treatment in Caucasians. 2<sup>nd</sup> German-French DNA Repair Meeting 09/2009, Konstanz

### **Posterpräsentation**

Böckmann L, Leibelung D, Gutzmer R, Laspe P, Kuschal C, Emmert S. Modulation of the efficacy of temozolomide melanoma treatment by DNA repair factors in vivo and in vitro. 2<sup>nd</sup> international conference on MGMT & alkylating drug resistance. 6/2007, Mainz

### **Posterpräsentation**

Böckmann L, Thoms KM, Gutzmer R, Has C, Kunz M, Nickel AC, Kuschal C, Laspe P, Struever D, Thomale J, Emmert S. Modulation of the efficacy of temozolomide or dacarbazine melanoma treatment by DNA repair factors in vivo and in vitro. CESAR Jahrestagung 6/2008, Göttingen

### **Posterpräsentation**

L. Boeckmann, K.-M. Thoms, R. Gutzmer, C. Has, M. Kunz, A.-C. Nickel, C. Kuschal, P. Laspe, D. Struever, J. Thomale, S. Emmert. Modulation of the efficacy

---

of temozolomide or dacarbazine melanoma treatment by DNA-repair factors *in vivo* and *in vitro*. DNA Repair 2008 Biennial Meeting of DGDR 9/2008, Berlin

### **Posterpräsentation**

L. Boeckmann, M. Schirmer, A. Rosenberger, K.-M. Thoms, R. Gutzmer, C. Has, M. Kunz, C. Kuschal, P. Laspe, D. Struever, M.P. Schoen, J. Brockmoeller, S. Emmert. Effect of DNA repair host factors on temozolomide or dacarbazine melanoma treatment in Caucasians. ADF 03/2009, Heidelberg

## **10.3 Wissenschaftliche Gutachtertätigkeit**

08/2009      Cancer Epidemiology

09/2009      Melanoma Research

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Steffen Emmert möchte ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung danken. Besonders bedanken möchte ich mich für die viele Zeit, die er sich zum Beispiel für die Unterstützung beim Schreiben von Publikationen und bei der Vorbereitung von Vorträgen und Postern genommen hat. Diskussionen wurden immer offen geführt und Positives stets hervorgehoben und anerkannt. Betonen möchte ich, die Unterstützung über die Betreuung der Arbeit hinaus. Er motivierte und unterstützte mich stets als Mentor zum Beispiel auch dabei, durch Schreiben von Gutachten Zusatzqualifikationen zu erwerben. Auf Kongressen stellte er Kontakte zu anderen Wissenschaftlern her und öffnete mir so die Tür zur wissenschaftlichen Welt der DNA-Reparatur.

Herrn PD Dr. Wilfried Kramer danke ich herzlich für die bereitwillige Übernahme des Referats und Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmöller für die Übernahme des Korreferats.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Petra Laspe, Antje Apel und Karolin Zachmann für ihre hilfsbereite Unterstützung und die gute Einführung in die verschiedenen Arbeitstechniken im Labor. Dankbar möchte ich ihre Arbeit und Organisation anerkennen, die stets einen reibungslosen Ablauf des täglichen Laborbetriebs garantiert hat. Ein Dankeschön auch für die nette Gesellschaft im gemeinsamen Labor.

Ein außerordentliches Dankeschön gebührt Dr. Christiane Kuschal, die über die gesamte Zeit der Promotion auch an „einsamen“ Nachmittagen die Stellung im Labor gehalten hat und damit jederzeit Ansprechpartnerin war. Außerdem danke ich ihr für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Annika Schäfer, Maria Nassiri, Elena Schmitke und Dr. Kai-Martin Thoms die neben den bereits genannten ebenfalls ein sehr gutes Arbeitsklima geschaffen haben, angenehme Gesprächspartner waren und auch auf „Fortbildungen“ für viele heitere Momente verantwortlich waren.

Dem DFG Graduiertenkolleg 1034 möchte ich für die finanzielle Unterstützung sowie das gute und interessante Ausbildungsprogramm danken. In diesem Zusammenhang möchte ich die gute Organisation rund ums Graduiertenkolleg durch Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmöller und Herrn Sven Müller dankenswert erwähnen. Aber auch allen anderen Stipendiaten und beteiligten Professoren möchte ich herzlich für die konstruktiven und hilfreichen Gespräche in freundlicher Atmosphäre danken.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Schön“ bedanken. Sie war nicht nur wissenschaftlich eine Bereicherung, sondern hat auch die gemeinsamen Mahlzeiten in der Mensa zu einer erfrischenden Abwechslung im Tagesablauf werden lassen.

Dr. Markus Schirmer und Albert Rosenberger danke ich herzlich für die Hilfe und die gelungenen Erklärungen bei der statistischen Auswertung der Daten.

Weiterer Dank gilt den Kooperationspartnern. Besonders zu erwähnen sind hierbei PD Dr. Jürgen Thomale für die Einführung in die Immuncytochemie und die Bereitstellung des Antikörpers gegen O<sup>6</sup>-Methylguanin-Addukte und Dr. Kai-Martin Thoms, Prof. Dr. Ralf Gutzmer, Prof. Dr. Manfred Kunz und Dr. Cristina Has für die Kollektion der Blutproben.

Ein ganz liebes Dankeschön auch an meine Frau Annika für das Auswerten von Mikroskop-Bildern, das Korrekturlesen und für die große Unterstützung außerhalb des Labors.

Ihnen und Euch allen gilt mein herzlicher Dank! Ebenso sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.