

Untersuchungen zum Mechanismus der Zytotoxizität von alkylierenden Agenzien in malignen Melanomzellen

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

**vorgelegt von
Steffen Naumann
Geb. in Frankfurt am Main**

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS MALIGNEN MELANOM	1
1.1.1 Stadieneinteilung und Prognose des malignen Melanoms	1
1.1.2 Therapie des malignen Melanoms	2
1.1.2.1 Operative Maßnahmen und Strahlentherapie	2
1.1.2.2 Chemotherapeutische Maßnahmen	2
1.1.3 Resistenzmerkmale des Melanoms	3
1.2 INDUKTION VON DNA-SCHÄDEN	4
1.2.1 Mutagen-induzierte DNA-Schäden	4
1.2.2 DNA-Schäden durch chemotherapeutisch verwendete, alkylierende Agenzien	5
1.2.2.1 Monofunktionelle methylierende Agenzien	5
1.2.2.2 Chlorethylierende und Interstrand Crosslink-vermittelnde Agenzien aus der Gruppe der Nitrosoharnstoff-Derivate	7
1.3 REPARATUR VON N-ALKYLIERUNGEN	8
1.3.1 DNA-Schadensreparatur durch ABH2 und ABH3	8
1.3.2 DNA-Schadensreparatur durch Basenexzisionsreparatur (BER)	8
1.4 REPARATUR UND PROZESSIERUNG DER O ⁶ POSITION DES GUANINS	9
1.4.1 Reparatur der O ⁶ Position des Guanins durch MGMT	9
1.4.2 Prozessierung von O ⁶ MeG	11
1.4.2.1 Manifestierung einer Punktmutation in Folge von O ⁶ MeG	11
1.4.2.2 Mismatch-Reparatur vermittelte Prozessierung von O ⁶ MeG	11
1.4.3 Prozessierung des O ⁶ CIEtG und ICL-Reparatur	12
1.4.4 DNA-Doppelstrangbruchreparatur	14
1.5 APOPTOSE	16
1.5.1 Rezeptor-vermittelte Apoptose am Beispiel des Fas-Rezeptors	18
1.5.2 Rezeptor-unabhängige, mitochondrial vermittelte Apoptose	20
1.5.3 Die Familie der Inhibitoren der Apoptose (IAPs)	23
1.5.4 Signaltransduktion zwischen DNA-Schaden und Apoptose	24
1.5.4.1 Rolle der DNA-schadensabhängigen Proteinkinasen ATM und ATR	24
1.5.4.2 Die Rolle des Tumorsuppressors p53 für die Apoptose	25
1.5.4.3 p53-unabhängige Apoptose via E2F-1 und p73	28
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	30
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 MATERIAL	31
2.2.1 Geräte und Verbrauchsmittel	31
2.1.2 Spezielle Chemikalien, Enzyme und Kits	32
2.1.3 Zytostatika	33
2.1.4 Software	33
2.1.5 Medien und Komponenten für Zellkultur	33
2.1.6 Antikörper	34
2.1.7 Puffer und Stammlösungen	35
2.1.8 Vektoren	36
2.1.9 Primer	36
2.1.10 siRNA	36
2.1.11 Zelllinien	37
2.2 METHODEN	37
2.2.1 Zellkultur	37
2.2.2 Arretierung von P493-6-Zellen in der G1-Phase	37
2.2.3 Erstellung einer Wachstumskurve	38
2.2.4 Bereitung von Zytostatika und Behandlung von Zellen	38
2.2.5 Behandlung von Zellen mit Strahlungsquellen	38
2.2.5.1 UV-C Strahlung	38
2.2.5.2 Ionisierende Strahlung	38
2.2.6 Methoden am Durchflusszytometer (FACS)	38
2.2.6.1 Bestimmung der SubG1-Fraktion (Zelltodmessung)	38
2.2.6.2 Bestimmung der Zellzyklusverteilung	39
2.2.6.3 Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz (Annexin V/ Propidiumjodid-Doppelfärbung)	39
2.2.6.4 Messung der Proliferation durch Membran-Färbung	39

Inhaltsverzeichnis

2.2.7 Isolierung von Gesamt-RNA	39
2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure	40
2.2.9 Synthese von Nukleinsäure in vitro	40
2.2.9.1 Synthese von cDNA	40
2.2.9.2 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	40
2.2.10 DNA-Gelelektrophorese	40
2.2.11 Transfektion von DNA in Säugerzellen	41
2.2.12 Transfektion von siRNA in Säugerzellen	41
2.2.13 Bestimmung der Proteinkonzentration	41
2.2.13.1 Proteinbestimmung nach Bradford	41
2.2.13.2 Proteinbestimmung nach Lowry	41
2.2.14 Western-Blot-Analyse	42
2.2.14.1 Ernten von Zellen zur Proteinextrahtherstellung	42
2.2.14.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten I	42
2.2.14.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten II zur Detektion von Phosphoproteinen	42
2.2.14.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten III	42
2.2.14.5 Herstellung von reinen Kernextrakten	42
2.2.14.6 Herstellung von fraktionierten Zellextrakten	43
2.2.14.7 Herstellung von reinen mitochondrialen und zytosolischen Extrakten	43
2.2.14.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.2.14.9 Western-Blot-Transfer	44
2.2.14.10 Detektion von Proteinen mittels Antikörper	44
2.2.15 Gelretardationsexperiment (EMSA)	44
2.2.15.1 Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden	44
2.2.15.2 Bereitung von Kernextrakten	45
2.2.15.3 EMSA-Reaktion	45
2.2.15.4 EMSA- Elektrophorese	45
2.2.16 Bestimmung der Caspaseaktivität	45
2.2.17 Bestimmung der Zellviabilität	46
2.2.18 Interstrand Crosslink-Komet-Test (ICL-Komet-Test)	46
2.2.18.1 Behandlung mit ICL-induzierenden Agenzien	46
2.2.18.2 Ionisierende Bestrahlung	46
2.2.18.3 Alkalische Einzelzellelektrophorese (Komet-Test)	46
2.2.19 Messung der O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase Aktivität (MGMT-Test)	47
2.2.20 Immunhistochemie	47
2.2.20.1 Bereitung der Deckgläser und Zellkultur	47
2.2.20.2 Markierung mit Antikörpern	47
2.2.20.3 Kernfärbung mit DAPI	48
2.2.20.4 Versiegelung der Proben und Dokumentation	48
3 ERGEBNISSE	49
3.1 GRUNDPARAMETER DER UNTERSUCHTEN ZELLINIEN	49
3.2 UNTERSUCHUNG DER ALKYLIERUNGSINDUZIERTEN ZYTOTOXIZITÄT IM UNTERSUCHTEN ZELLSYSTEM	50
3.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität nach Fotemustin- und Temozolomidbehandlung	50
3.2.2 Charakterisierung der alkylierungsinduzierten Zytotoxizität nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung	51
3.2.3 Untersuchungen der alkylierungsinduzierten Apoptose nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung	53
3.3 BEDEUTUNG DER ALKYLIERUNGEN AN DER POSITION O ⁶ DER BASE GUANIN FÜR DIE APOPTOSEINDUKTION DURCH FOTEMUSTIN UND TEMOZOLOMID	55
3.3.1 Bestimmung der MGMT-Enzymaktivität im untersuchten Zellsystem	56
3.3.2 Einfluss von MGMT auf die Apoptoseinduktion durch Fotemustin und Temozolomid	56
3.3.3 Reduktion der Zytotoxizität durch transiente Transfektion eines MGMT-Gen tragenden Vektors in einer MGMT negativen Zelllinie	58
3.4 ROLLE VON γ H2AX ALS SEKUNDÄRER SCHADENSMARKER NACH ALKYLANTIENEXPOSITION	59
3.4.1 Untersuchungen zur γ H2AX-Induktion nach Fotemustinexposition	59
3.4.2 Untersuchungen zur γ H2AX-Induktion nach Temozolomidexposition	60
3.5 STATUS DES TUMORSUPPRESSORPROTEINS P53 IM VERWENDETEN ZELLSYSTEM	62
3.5.1 p53 Stabilisierung und Translokation nach DNA-Schäden	62
3.5.2 Untersuchung der p53-Aktivierung in den Zelllinien D05 und D14	63
3.5.3 Untersuchung der p53-regulierten Transkription in den Zelllinien D05 und D14	64
3.5.4 Einfluss von p53 auf das Überleben nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung	65
3.6 UNTERSUCHUNG DER ZELLINIE MZ7	69
3.6.1 Zytotoxizität detektion in MZ7-Zellen nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung	69

Inhaltsverzeichnis

3.6.2 Schadensdetektion in MZ7-Zellen nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung.....	70
3.6.3 Basale Expression der Mismatch-Reparaturproteine MSH2 und MSH6.....	71
3.6.4 Bindungsnachweis des MutS α -Komplexes an GT-Fehlpaarungen.....	72
3.7 ZELLYKLUSVERTEILUNG, ZELLYKLUSBLOCK UND REPLIKATIONSABHÄNGIGKEIT NACH FOTEMUSTINEXPOSITION.....	73
3.7.1 Untersuchung des Zellwachstums nach Fotemustinexposition.....	73
3.7.2 Untersuchung der Zellzyklusverteilung nach Fotemustinbehandlung.....	74
3.7.3 Untersuchung der Zellkernmorphologie im G2/M-Arrest.....	75
3.7.4 Fotemustin erzeugt einen G2/M-Phaseblock im Behandlungszyklus.....	76
3.7.5 Untersuchung der Proliferationsabhängigkeit der Fotemustin-induzierten Apoptose in P493-6-Zellen.....	78
3.7.6 Untersuchung der Proliferationsabhängigkeit der Fotemustin-induzierten Caspaseaktivierung in Melanomzellen.....	79
3.8 BESTIMMUNG DER INTERSTRAND-CROSSLINKBILDUNG UND IHRER PROZESSIERUNG NACH FOTEMUSTINEXPOSITION IN UNTERSCHIEDLICH SENSITIVEN MELANOMZELLINIEN.....	81
3.9 VERTIEFENDE UNTERSUCHUNGEN DER FOTEMUSTIN-VERMITTELTEN H2AX PHOSPHORYLIERUNG.....	82
3.9.1 Vergleich der γ H2AX-Induktion und der Bildung von γ H2AX-Foci in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien.....	82
3.9.2 γ H2AX-Focibildung nach Fotemustinexposition in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien.....	85
3.10 STUDIEN ZUM APOPTOTISCHEN SIGNALWEG NACH FOTEMUSTINBEHANDLUNG.....	86
3.10.1 Inhibierung der Caspasenaktivität unterdrückt die Fotemustin-vermittelte Apoptose.....	86
3.10.2 Bestimmung der Aktivität von Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-3 nach Fotemustinbehandlung.....	88
3.10.3 Untersuchungen von Parametern der Rezeptor-vermittelten Apoptose.....	88
3.10.4 Untersuchungen von Parametern der mitochondrial vermittelten Apoptose.....	91
3.11 EINFLUSS VON MITGLIEDERN DER IAP (INHIBITOR OF APOPTOSIS) PROTEINFAMILIE AUF DIE SENSITIVITÄT VON MELANOMZELLINIEN NACH FOTEMUSTINBEHANDLUNG.....	92
3.11.1 Basale Expression von XIAP, Survivin und XAF1.....	92
3.11.2 Expression von XIAP, Survivin und XAF1 nach Fotemustinbehandlung.....	93
3.11.3 Einfluss von XIAP auf das Überleben nach Fotemustinbehandlung.....	94
3.12 UNTERSUCHUNG VON DNA-SCHADENSABHÄNGIGEN SIGNALWEGEN.....	96
3.12.1 Aktivierung der ATM-Kinase nach Fotemustinexposition.....	96
3.12.2 Aktivierung der Checkpoint Kinase 1 nach Fotemustinexposition.....	97
3.12.3 Aktivierung der Checkpoint Kinase 2 nach Fotemustinexposition.....	98
3.12.4 Untersuchung verschiedener Phosphorylierungsstellen des p53-Proteins.....	99
3.13 DER RB/E2F-1/p73-VERMITTELTE APOPTOSEWEG.....	100
3.13.1 Untersuchungen der E2F-1 Expression und Regulation nach Fotemustinexposition.....	101
3.13.2 Untersuchungen der Expression von E2F-1-regulierten, proapoptischen Genen nach Fotemustinexposition.....	102
3.13.3 Untersuchung von proapoptischen Genen der Bcl-2 Familie.....	104
3.13.4 Einfluss von E2F-1 auf das Überleben nach Fotemustinbehandlung.....	105
4 DISKUSSION.....	108
4.1 MECHANISMEN DER ALKYLANTIEN-VERMITTELTEN ZYTOTOXIZITÄT IN MALIGNEN MELANOMZELLEN.....	108
4.1.1 Alkylantien bedingter Zelltod wird in Melanomzellen durch Apoptose vermittelt.....	109
4.1.2 Die Alkylierung der Position O ⁶ des Guanins ist die wichtigste toxische Läsion, welche von Fotemustin und Temozolomid ausgeht, und MGMT ein entscheidender Resistenzmarker.....	111
4.1.3 γ H2AX-Induktion korreliert in Melanomzellen mit der Sensitivität nach Temozolomid-, aber nicht nach Fotemustingabe.....	112
4.1.4 Alkylantien-induzierte Apoptose wird in Melanomzellen p53 unabhängig vermittelt.....	114
4.1.5 Resistenz gegenüber Temozolomid in der Zelllinie MZ7 beruht auf einem Defekt der Mismatch-Reparatur.....	118
4.2 UNTERSUCHUNGEN DER FOTEMUSTIN-VERMITTELTEN APOPTOSE IN MELANOMZELLINIEN.....	119
4.2.1 Fotemustin arretiert Melanomzellen im Behandlungszyklus in G2/M, benötigt aber das Durchlaufen der S-Phase, um Apoptose zu vermitteln.....	120
4.2.2 Fotemustin-induzierte ICL-Bildung und ihre initiale Prozessierung erfolgen in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien vergleichbar effektiv.....	122
4.2.3 Quantität und Reparaturreffektivität der von ICLs ausgehenden DSBs spiegeln die Sensitivität in Melanomzellen gegenüber Fotemustin wider.....	124

Inhaltsverzeichnis

4.2.4 Fotemustin-induzierte Apoptose wird in Melanomzellen über die Mitochondrien vermittelt	126
4.2.5 Die Sensitivität in Melanomzellen gegenüber Fotemustin wird nicht durch Mitglieder der IAP-Familie beeinflusst	128
4.2.6 DNA-schadensabhängige Signaltransduktion ist in der sensitiven Melanomzelllinie D14 stärker ausgeprägt	130
4.2.7 Für p53-mutierte Melanomzellen könnte die Vermittlung von Apoptose über den Rb/E2F-1-Weg eine Alternative darstellen	132
4.3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	135
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	137
6 LITERATUR	139
7 ANHANG	155
7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	155
7.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	159
7.3 TABELLENVERZEICHNIS.....	160
7.4 VERÖFFENTLICHUNGEN.....	161
7.5 KONGRESSTEILNAHMEN MIT POSTERPRÄSENTATION	162
7.6 LEBENSLAUF	163

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der vom melanozytären Zellsystem ausgeht und für ca. 90% der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich ist. Charakteristisch für diesen Tumor ist die frühe Tendenz zur Metastasierung im Verhältnis zur Tumormasse. Das maligne Melanom nimmt in der weißhäutigen Bevölkerungsgruppe weltweit rasant zu (Armstrong and Kricger 1994; Garbe and Blum 2001). Im Gegensatz dazu sind Bevölkerungsgruppen mit stärkerer Pigmentierung kaum betroffen. Zurzeit beträgt die Quote in Mitteleuropa 10-12 Fälle, in den USA 10-25 Fälle und in Australien 50-60 Fälle pro 100000 Einwohner und Jahr. Für die Entstehung eines malignen Melanoms spielt die UV-Belastung als exogene Einflussgröße eine zentrale Rolle (Wiecker et al. 2003); 5-10% der Melanome können auf polygene Erbfaktoren in erblich belasteten Familien zurückgeführt werden (Greene et al. 1985).

1.1.1 Stadieneinteilung und Prognose des malignen Melanoms

Die aktuelle Stadieneinteilung des malignen Melanoms basiert auf einem Vier-Phasenmodell nach Balch (Balch et al. 2001) (Tab.1-1). Während Melanome des Stadiums I und II nur aus dem Primärtumor bestehen, ist Stadium III durch das Auftreten regionaler Lymphknotenmetastasen und Stadium IV durch das Auftreten von Fernmetastasen definiert. Die 10 Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Primärtumoren liegt bei 75-80%, bei Patienten mit Satelliten- und in-transit-Metastasen bei 30-50% und bei Patienten mit regionalen Lymphknotenmetastasen bei 20-40%. Bei diagnostizierten Fernmetastasen liegt die mediane Überlebenszeit ohne Behandlung nur noch bei 6-9 Monaten.

Einleitung

Tabelle 1-1: Stadieneinteilung des malignen Melanoms (Balch et al. 2001)

Stadium	Primärtumor Dicke (mm)	Geschwür- ausbildung	Regionale Lymphknotenmetastasen	Fernmetastasen
0	In situ Tumore	Nein	Nein	Nein
I A	≤ 1,0	Nein	Nein	Nein
I B	≤ 1,0 oder	Ja	Nein	Nein
	1,01 – 2,0	Nein		
II A	1,01- 2,0 oder	Ja	Nein	Nein
	2,01 – 4,0	Nein		
II B	2,01 – 4,0 oder	Ja	Nein	Nein
	> 4,0	Nein		
II C	> 4,0	Ja	Nein	Nein
III A	Jede Tumordicke	Nein	Nein	Nein
III B	Jede Tumordicke	Ja	Mikrometastasen	Nein
	Jede Tumordicke	Nein	≤ 3 Markrometastasen	
	Jede Tumordicke	Ja/Nein	Satelliten- u./o. in-transit Metastasen	
III C	Jede Tumordicke	Ja	≤ 3 Markrometastasen	Nein
	Jede Tumordicke	Ja/Nein	≤ 4 Markrometastasen o. Satelliten- u./o. in-transit Metastasen	
IV				Ja

1.1.2 Therapie des malignen Melanoms

1.1.2.1 Operative Maßnahmen und Strahlentherapie

Eine operative Entfernung von Tumoren ist, soweit durchführbar, die primäre Therapie des malignen Melanoms in allen Stadien. Ionisierende Strahlung kommt vor allem als begleitende Maßnahme nach operativen Eingriffen und bei Behandlung von Metastasen zum Einsatz.

1.1.2.2 Chemotherapeutische Maßnahmen

Eine Chemotherapie wird hauptsächlich im Stadium IV, Melanom mit Fernmetastasierung, angewendet. Die Behandlung erfolgt hierbei überwiegend unter palliativen Gesichtspunkten. Dauerhafte Remissionen sind durch chemotherapeutische Maßnahmen in diesem Stadium nur selten.

Für eine systemische Monotherapie sind die drei Alkylantien Dacarbazin (DTIC), Temozolomid (TMZ) und Fotemustin (FM) die Mittel erster Wahl. Die am längsten verwendete und damit am besten untersuchte Substanz ist das monofunktionelle und methylierende Imidazotetrazin-Derivat Dacarbazin. Eine Reduktion der Tumormasse um 50% nach einer Dacarbazin-Monotherapie wurde in 5,3-28,6% der Patienten beobachtet, in 8% wurde eine komplette Remission für meist 3-6 Monaten erreicht (Chiarion Sileni et al. 2001). Alternativ zu Dacarbazin wird das ebenfalls zu den monofunktionellen und methylierenden Imidazotetrazin-Derivaten zählende Temozolomid eingesetzt. Temozolomid besitzt neben einer vergleichbaren Wirksamkeit wie Dacarbazin (Middleton

Einleitung

et al. 2000; Frick et al. 2002) zwei entscheidende Vorteile. Im Gegensatz zu allen anderen Monochemotherapeutika wird es oral verabreicht. Wichtiger noch ist die Fähigkeit, die Blut-Hirnschranke zu passieren (Liquorgängigkeit), welche auch die Behandlung der häufig auftretenden Hirnmetastasen ermöglicht (Ostermann et al. 2004). Eine weitere Alternative stellt das Alkylanz Fotemustin dar. Fotemustin gehört zu der Gruppe der chlorethylierenden Nitrosoharnstoff-Derivate („*N*-chloroethyl-*N*-nitrosourea“, kurz CENU) und verfügt über vergleichbare Remissionsraten wie Dacarbazin (Khayat et al. 1992). Auch Fotemustin ist liquorgängig und bei Hirnmetastasen wirksam (Khayat et al. 1992; Mornex et al. 2003). Zur Behandlung von Metastasen (meist Lebermetastasen), welche aus Tumoren der Gefäßhaut des Auges (Uveamelanomen) hervorgehen, ist ausschließlich Fotemustin das Mittel erster Wahl (Leyvraz et al. 1997; Egerer et al. 2001). Für eine Monotherapie kommt auch das Vincaalkaloid Vindesin, für Chemoimmuntherapie kommen die Zytokine Interferon- α (IFN- α) und Interleukin-2 (IL-2) zum Einsatz.

Eine Polytherapie besteht aus einer Kombination verschiedener Zytostatika untereinander oder mit Zytokinen. Sie bewirken höhere Remissionsraten, allerdings ohne bisher eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erreicht zu haben. Zum Einsatz kommen vor allem Kombinationen von Temozolomid mit IFN- α und Vindesin mit IFN- α . Andere Kombinationen werden mit den CENU-Derivaten Carmustin und Lomustin sowie mit Cisplatin durchgeführt.

1.1.3 Resistenzmerkmale des Melanoms

Das maligne Melanom zählt zu den resistentesten Tumorarten gegenüber klassischen chemotherapeutischen Agenzien. Eine Erklärung dafür liefert der Zelltyp, aus dem sich Melanome entwickeln, den Melanozyten. Melanozyten agieren als Fotoprotektoren der Haut. Während andere primäre Zellen auf Strahlung mit Zelltod oder Reparatur reagieren, produzieren Melanozyten und ihre Stammzellen auf denselben Stimulus hin Melanin, um Nachbarzellen zu schützen (Matsumura and Ananthaswamy 2002). Diese „Programmierung zum Überleben“ wird über interne und externe Signale vermittelt. So schütten Fibroblasten und Keratinozyten die Wachstumsfaktoren FGF und NGF aus, die Melanozyten vor Zelltod schützen (Zhai et al. 1996; Ruitter et al. 2002). Unter anderem wird so das antiapoptotische Protein Bcl-2 in Melanozyten heraufreguliert. Dies deutet darauf hin, dass aus Melanozyten entstandene Tumore von vornherein über Resistenzstrategien verfügen. Im Laufe der Onkogenese eines Melanoms bilden sich weitere Resistenzmerkmale aus, die eine Therapie erschweren. Der Einfluss von Arzneimitteltransportern, der Glutathiontransferase (GST), der Regulation von

Einleitung

Topoisomerasen und DNA-Reparatur auf die Resistenz von Melanomen wird widersprüchlich diskutiert (Grossman and Altieri 2001; Soengas and Lowe 2003). Therapeutisch relevant ist vor allem die Fähigkeit von Tumoren, nach geeigneten Stimulationen Apoptose zu unterlaufen. Das maligne Melanom ist ein Tumortyp, der im Zuge der malignen Transformation diese Fähigkeit offenbar eingebüßt hat. So zeigen Naevus-Melanozyten, verglichen mit normalen Melanozyten, eine erhöhte Apoptoseresistenz (Alanko et al. 1999). Bei manifestierten Melanomen wird eine verstärkte Resistenz gegenüber Apoptose mit dem ansteigenden Metastasepotential des Tumors assoziiert (Glinsky et al. 1997). In Melanomen konnte die Heraufregulierung von antiapoptotischen Faktoren sowie die Herunterregulierung von proapoptotischen Faktoren in vielen Fällen beobachtet werden (Soengas and Lowe 2003). Diese wird als Hauptursache der Resistenz gegenüber konventionellen chemotherapeutischen Agenzien betrachtet (Grossman and Altieri 2001). Eine interessante Beobachtung ist in diesem Zusammenhang auch die geringe Rate an mutierten p53 in diesem Tumortyp, die mit maximal 20% angegeben wird (Zerp et al. 1999) (siehe 1.5.4.2).

1.2 Induktion von DNA-Schäden

DNA-Schäden entstehen pro Zelle und Tag in großen Mengen. Nicht repariert, können sich diese Schäden u.a. als Mutationen in der DNA manifestieren. Es werden spontane und induzierte Mutationen unterschieden. Zu den spontanen Mutationen gehört der Zerfall des Cytosins zu Uracil, durch oxidative Desaminierung. Auch der häufig vorkommende fehlerhafte Einbau einer Base bei der DNA-Neusynthese wird als spontane Mutation bezeichnet. Als induziert werden alle Mutationen bezeichnet, die durch externe Stimuli, den Mutagenen, ausgelöst werden. Man unterscheidet Deletionen, Insertionen, Rasterschubmutationen und Punktmutationen.

1.2.1 Mutagen-induzierte DNA-Schäden

Die DNA eines Organismus ist einer Vielzahl schädigender Einflüsse ausgesetzt. Diese Einflüsse können zu Mutationen in sensiblen Bereichen des Genoms führen und damit Gendefekte generieren. Diese stellen die Hauptursache für Stoffwechselerkrankungen und Krebs dar. Man kann allgemein zwischen physikalischen Mutagenen (wie UV-Strahlung und ionisierender Strahlung) und chemischen Mutagenen unterscheiden. Bei chemischen Mutagenen handelt es sich entweder um interkalierende Agenzien, um Basenanalogue, die in die DNA eingebaut werden oder um alkylierende Substanzen, welche Alkylgruppen an

Einleitung

die Basen anhängen. Wichtige chemische Mutagene sind polyzyklische Kohlenwasserstoffe (wie Benzo(a)pyren) und alkylierende Agenzien (wie Nitrosamine). Die Exposition eines Organismus mit Mutagenen erfolgt in den meisten Fällen über Umwelteinflüsse (Bartsch and Montesano 1984), die Aufnahme mit der Nahrung (Jagerstad and Skog 2005) und über Tabakrauch (DeMarini 2004). Auf zellulärer Ebene stehen einem Organismus für den Erhalt der genetischen Stabilität eine Vielzahl von Reparatursystemen zu Verfügung, welche unterschiedliche Formen von genetischen Defekten erkennen und reparieren können (Christmann et al. 2003).

1.2.2 DNA-Schäden durch chemotherapeutisch verwendete, alkylierende Agenzien

Trotz ihres mutagenen Potenzials haben alkylierende Agenzien Anwendung in der Krebstherapie gefunden. Die zwei wichtigsten Stoffgruppen sind monofunktionell methylierende Agenzien und die Gruppe der CENU-Derivate. Sie vermitteln vor allem N-Alkylierungen an allen vier Basen. Die Alkylierung der O⁶ Position des Guanins und das von ihr ausgehende zytotoxische Potential nimmt für diese Agenzien eine herausragende Stellung ein. Der zytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen verdanken diese Stoffgruppen ihren Einsatz als Chemotherapeutika für eine Reihe onkologischer Krankheitsbilder wie dem malignen Melanom, Hodgkinsche Krankheit, Nicht-Hodgkinsche Lymphome, Neuroblastome, Weichteilkrebs (Sarkome), Pankreaskrebs, neuroendokrinen Tumoren, Astrozytome, Glioblastome sowie für Metastasen im Gehirn.

1.2.2.1 Monofunktionelle methylierende Agenzien

Temozolomid ist ein Vertreter der Gruppe der monofunktionellen methylierenden Agenzien, die als Chemotherapeutika zum Einsatz kommen. Temozolomid bildet durch spontane Hydrolyse bei physikalischem pH den aktiven Metabolit 5-(3-methyltriazin-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC), welcher mit der DNA reagiert (Newlands et al. 1997). Zwei weitere Vertreter, Procarbazin (PCZ) und Dacarbacin (DTIC), benötigen metabolische Aktivierung, um ihre reaktiven Metabolite zu bilden (Goria-Gatti et al. 1992; Reid et al. 1999), während der vierte Vertreter Streptozotocin (STZ) ohne metabolische Aktivierung die DNA methyliert (Bolzan and Bianchi 2002). N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidin (MNNG) ist ein weitere Vertreter der methylierenden Agenzien. MNNG kommt nicht als Chemotherapeutikum zum Einsatz, ist aber als Musteralkylanz in der Forschung weit verbreitet. Die Methylierung der DNA erfolgt über eine nukleophile Substitution nach dem S_N1-Mechanismus. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist beim

Einleitung

S_N1-Mechanismus nur von der Konzentration eines Reaktionspartners abhängig. Dies ist im Fall der DNA-Methylierung die Konzentration des reaktiven Metabolits, des Alkylanz und nicht die des Nukleophils (das Sauerstoff- oder Stickstoffatom der Base). In Tabelle 1-2 sind die 12 möglichen Angriffspunkte der Alkylantien in der DNA mit ihren Anteilen in Prozent und ihrer Entfernung durch entsprechende Reparaturmechanismen aufgelistet. N3-Methyladenin (N3MeA) und N3-Methylguanin (N3MeG) sind nicht sehr stabile Addukte und spalten sich durch spontane Hydrolyse von den Basen ab. Die Läsionen N1-Methyladenin (N1MeA), N3-Methylcytosin (N3MeC), N3-Methylthymidin (N3MeT) und N1-Methylguanin (N1MeG) werden durch die Reparaturproteine ABH2 und ABH3 entfernt, während N7-Methylguanin (N7MeG), N3-Methyladenin (N3MeA) und N3-Methylguanin (N3MeG) durch die Basenexzisionsreparatur (BER) repariert werden. Die Läsionen O⁶-Methylguanin (O⁶MeG) und O⁴-Methylthymidin (O⁴MeT) sind Substrate der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Findet die Reparatur durch MGMT nicht statt, wird O⁶MeG durch die Mismatch-Reparatur (MMR) erkannt, prozessiert und führt zu Mutationen und Zelltod (siehe 1.4.2). Dieser Prozess ist proliferationsabhängig (Roos et al. 2004). O⁶MeG ist die potenteste zytotoxische Läsion, welche durch methylierende Agenzien in der DNA induziert wird.

Tabelle 1-2: Übersicht der durch alkylierende Agenzien angegriffenen Positionen in der DNA

Positionen	Anteil (%)	Reparaturmechanismen
N1-Adenin		ABH (siehe 1.3.1)
N3-Adenin		spontane Hydrolyse, BER (siehe 1.3.2)
N7-Adenin	8-18%	
O ² -Cytosin		
N3-Cytosin		ABH
N1-Guanin		ABH
N3-Guanin		spontane Hydrolyse
O⁶-Guanin	2-8%	MGMT (siehe 1.4.1)
N7-Guanin	80-95%	BER
N3-Thymidin		ABH
O ⁴ -Thymidin	< 0,4%	MGMT
Phosphotriester		

1.2.2.2 Chlorethylierende und Interstrand Crosslink-vermittelnde Agenzien aus der Gruppe der Nitrosoharnstoff-Derivate

Fotemustin (FM), Carmustin (BCNU), Lomustin (CCNU) und Nimustin (ACNU) gehören zu einer zweiten Gruppe von alkylierenden Chemotherapeutika, die CENU-Derivate. Die Agenzien übertragen durch eine S_N1 -Reaktion Chlorethylreste, aber auch andere Alkylierungen wie Hydroxyethylreste, auf verschiedene Positionen der DNA (Tabelle 1-2). Alle CENU-Derivate erfahren durch spontane Hydrolyse bei physiologischem pH die Spaltung in das reaktive Intermediär 2-Chlorethyl Diazohydroxid, welches die Läsionen vermittelt. Für Fotemustin ist, als einziges CENU, die Hydrolyse in zwei reaktive Intermediäre beschrieben (Hayes et al. 1997). Neben 2-Chlorethyl Diazohydroxid, wird ein zweites, stabileres Intermediär gebildet, welches zu 70% N7-Guanin alkyliert. Es trägt allerdings nur zu geringen Teilen an der Entstehung des toxischen O^6 -Chlorethylguanins (O^6 ClEtG) bei. Vergleichbar zu methylierenden Agenzien ist die N7 Position des Guanins mit bis zu 95% der Gesamtalkylierungen die dominante Alkylierungsstelle dieser Stoffgruppe (Inga et al. 1999). Diese Läsionen werden über die BER repariert. Der Hauptmechanismus für die Zytotoxizität der CENU-Derivate wird aber auch hier über die O^6 Position des Guanins vermittelt. Die Läsion O^6 ClEtG, welche 2-5% der Gesamtalkylierungen ausmacht (Inga et al. 1999), kann ebenso wie O^6 MeG durch MGMT repariert werden (Gonzaga et al. 1992). Schlägt dies fehl, erfolgt nach Übertragung eines Chlorethylrestes auf die O^6 Position des Guanins eine intramolekulare Umlagerung von O^6 ClEtG über das intermediär gebildete N1- O^6 -Ethanoguanin zu einem N1-Guanin-N3-Cytosin Interstrand Crosslink (ICL) (Tong et al. 1982; Ludlum 1990). Das N1- O^6 -Ethanoguanin Intermediär ist sehr stabil. Die Umlagerung zum ICL erfolgt in Mammalia-Zellen 8-12 h nach Vermittlung der O^6 ClEtG-Läsion (Brent et al. 1987). Die kovalente Verknüpfung zwischen den beiden komplementären Stränge der DNA ist eine hoch toxische Läsion, da sie elementare Abläufe wie DNA-Neusynthese und Transkription blockiert. ICLs werden, soweit bekannt, über Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (DSB-Reparatur) prozessiert (siehe 1.4.3 und 1.4.4).

1.3 Reparatur von N-Alkylierungen

1.3.1 DNA-Schadensreparatur durch ABH2 und ABH3

Humanes ABH2 und ABH3 sind die funktionellen Homologe des AlkB-Proteins aus *Escherichia coli* (Duncan et al. 2002; Koivisto et al. 2004). Alkylierungen an den Positionen N1-Adenin, N3-Cytosin, N3-Thymin und N1-Guanin werden durch diese Proteine repariert (Duncan et al. 2002; Delaney and Essigmann 2004). Sie gehören zu der Fe(II)- α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen Superfamilie. Die Prozessierung des Schadens erfolgt über Hydroxylierung. Die Methylgruppe wird dadurch destabilisiert und entfernt (Sedgwick 2004).

1.3.2 DNA-Schadensreparatur durch Basenexzisionsreparatur (BER)

Die durch Alkylantien vermittelten Stickstoff-Alkylierungen der Basen wirken erst bei einem hohen Alkylierungsniveau zytotoxisch. Eine Reparatur der Läsionen N7-Alkylguanin, N3-Alkyladenin und N3-Alkylguanin erfolgt über die Basenexzisionsreparatur. Im Gegensatz zu anderen Reparatursystemen ist keine humane Krankheit bekannt, welche auf Defekte der BER zurückzuführen ist. Dies unterstreicht die Bedeutung dieses Reparaturweges. Die zytotoxischste Läsion der methylierenden Alkylantien (in proliferierenden Zellen) und der CENU-Derivate (durch ICL-Bildung) erfolgt an der O⁶ Position des Guanins. Die Reparatur durch MGMT ist der wichtigste Schutz gegenüber der Toxizität dieser Substanzen. Die BER scheint allerdings eine wichtige Rolle beim Schutz nicht proliferierender Zellen nach methylierender Schädigung zu spielen, wie es für humane Monozyten und neuronalen Zellen nachgewiesen wurde (Kisby et al. 2004; Briegert and Kaina 2007). Der initiiierende Schritt durch die BER ist Erkennung und Exzision der modifizierten Base durch eine DNA-Glycosylase. Die Läsionen N7-Alkylguanin, N3-Alkyladenin und N3-Alkylguanin werden spezifisch durch die N-Methylpurin-DNA-Glycosylase (MPG) und Alkylpurin-DNA N-Glycosylase (APNG) prozessiert (Lindahl 1976; Chakravarti et al. 1991). Eine AP-Endonuklease (APE) schneidet anschließend das Phosphodiester-Rückgrat, woraus ein 5'-Deoxyribose-5-Phosphat (5'dRP) und ein 3'-OH resultiert (Wilson and Barsky 2001). Das Auffüllen des fehlenden Nukleotids wird über DNA-Polymerase β (Pol β) vermittelt (Sobol et al. 1996; Podlutzky et al. 2001). Ob die Ligation des DNA-Stranges anschließend über den Weg der so genannten „short patch“ Reparatur oder der „long patch“ Reparatur verläuft, liegt an verschiedenen Modifikationen an den offenen DNA-Rückgratenden. Bei der „short patch“

Einleitung

Reparatur katalysiert Pol β die Trennung des 5'dRP von der DNA. Die Ligation erfolgt durch einen Komplex aus Ligase III und XRCC1. Bei gewissen Modifikationen, wie oxidierten oder reduzierten AP-Enden, kann Pol β 5'dRP nicht eliminieren und fällt von der DNA ab. Es kommt zur „long patch“ Reparatur, wobei es zur DNA-Neusynthese durch die Polymerase ϵ (Pol ϵ) oder die Polymerase δ (Pol δ) mit PCNA und RF-C über bis zu 10 Nukleotiden kommt. Ein Komplex aus PCNA mit Fen1 ist für die Entfernung des 5'dRP verantwortlich, die Ligation erfolgt über den PCNA/Ligase I-Komplex (Christmann et al. 2003).

1.4 Reparatur und Prozessierung der O⁶ Position des Guanins

In Bezug auf Alkylierungen stellt die O⁶ Position des Guanins eine äußerst sensible Stelle der DNA dar. Trotz des geringen Schadensniveaus von unter 8% der Gesamtalkylierungen, ist die Alkylierung von O⁶-Guanin die Läsion mit dem größten zytotoxischen Potenzial. Wird dieser prämutagene und prätoxische Schaden nicht repariert, vermittelt er Zelltod, Mutationen und Krebs. Die besondere Bedeutung von O⁶-Guanin für die Stabilität des Genoms und dem Überleben der Zelle wird u.a. durch die evolutionäre Entwicklung des Reparaturproteins MGMT unterstrichen, die spezifisch Alkylierungen an dieser Position entfernt.

1.4.1 Reparatur der O⁶ Position des Guanins durch MGMT

MGMT ist ein hochkonserviertes Enzym, bestehend aus 208 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 22 kDa (Tano et al. 1990), welches eine hohe Homologie zu dem Ada-Protein von *Escherichia coli* aufweist. Neben der Reparatur des O⁶-Guanins ist MGMT ebenfalls fähig, Alkylierungen an der O⁴ Position des Thymidins zu entfernen (Kaina et al. 2007). Über die mutagene und toxische Wirkung dieser Läsion ist bis heute nicht viel bekannt. In einer Ein-Schritt-Reaktion wird eine Alkylgruppe vom O⁶-Guanin auf den Cysteinrest 145 im aktiven Zentrum des MGMT-Proteins übertragen (Pegg et al. 1993; Pegg et al. 1995; Daniels and Tainer 2000). Hierbei wird das Enzym inaktiviert, weshalb es auch als Suizidenzym bezeichnet wird. Anschließend erfolgt der Abbau nach Ubiquitinierung im Proteasom (Srivenugopal et al. 1996; Xu-Welliver and Pegg 2002). Entscheidend für eine vollständige Reparatur ist somit das Verhältnis von Alkylierungen an den Positionen O⁶-Guanin bzw. O⁴-Thyminid und der Anzahl an MGMT-Molekülen in einer Zelle. Reicht die Menge an MGMT-Molekülen nicht aus, alle Schäden an der

Einleitung

O⁶ Position zu entfernen, werden die Läsionen prozessiert oder reagieren weiter und entfalten ihr mutagenes und toxisches Potenzial. Methylierungen an der O⁶ Position des Guanins, wie sie durch monofunktionelle Alkylierer wie Temozolomid induziert werden, werden am effektivsten auf das MGMT-Protein übertragen. Die Effizienz der Übertragung von länger-kettigen Alkylierungen auf das MGMT-Protein (wie die von CENU-Derivaten vermittelten Chlorethylreste) nimmt mit ihrer Länge ab. MGMT ist auch in der Lage, das nach Chlorethylierung intermediär entstehende N1-O⁶-Ethanoguanin an der O⁶ Position zu prozessieren. Da es sich beim N1-O⁶-Ethanoguanin um eine Ringstruktur handelt, kommt es in diesem Fall zu einer kovalenten Bindung zwischen Protein und Guanin an der Position N1 (Gonzaga et al. 1992). Ob diese DNA-Protein-Vernetzung einen biologischen Effekt hat, ist nicht bekannt. MGMT wird gewebespezifisch exprimiert. Während der MGMT-Status in Leber und Darm hoch ist, wurde das Protein z.B. im Gehirn in deutlich geringeren Mengen nachgewiesen. Die MGMT-Expression in Tumoren ist deutlich variabler als in gesunden Geweben. In Melanomen konnte eine beträchtliche Variation von bis zum 38-fachen des *mgmt* mRNA-Niveaus beobachtet werden (Evrard et al. 2003). Im Durchschnitt wurde in Brust-, Lungen- und Eierstocktumoren eine höhere MGMT-Expression gemessen als in Gliomen, malignen Melanomen, Pankreas- und Hodenkarzinomen (Chen et al. 1992; Preuss et al. 1996; Margison et al. 2003). Ein Vergleich der MGMT-Aktivität zwischen Tumoren und ihren korrespondierenden gesunden Geweben zeigte eine Tendenz zur Inaktivierung von MGMT im Verlauf der Tumorgenese (Preuss et al. 1995). MGMT Knockout-Mäuse sind lebensfähig, zeigten aber eine höhere Frequenz an spontanen Tumoren und waren sensitiv gegenüber alkylierenden Agenzien (Tsuzuki et al. 1996). Die Überexpression von MGMT im Mausmodell reduzierte die Tumorfrequenz in Leber, Thymus und Haut (Dumenco et al. 1993; Nakatsuru et al. 1993; Becker et al. 1996; Zhou et al. 2001). MGMT-defiziente Zelllinien können Alkylierungen an der O⁶ Position des Guanins nicht mehr reparieren und werden dadurch sensitiv gegenüber alkylierenden Agenzien. Diesen Phänotyp bezeichnet man als Mex⁻, im Gegensatz zu Mex⁺, den profizienten Phänotyp (Day et al. 1980; Yarosh et al. 1983). Durch Transfektion von MGMT-cDNA konnte die Expressionsabhängigkeit von MGMT für methylierende und chlorethylierende Agenzien demonstriert werden (Kaina et al. 1991). Eine Abhängigkeit zwischen MGMT-Status und Resistenz wurde auch spezifisch für Fotemustin oder Temozolomid nachgewiesen (Christmann et al. 2001; Hermisson et al. 2006; Roos et al. 2007).

1.4.2 Prozessierung von O⁶MeG

Wird O⁶MeG nicht durch MGMT repariert, verbleibt die Methylgruppe an der Base. Der Schaden ist prätoxisch und prämutagen, vermittelt aber an sich weder Zelltod noch Mutationen. Erst DNA-Replikation und die Prozessierung des Schadens durch das Mismatch-Reparatursystem entfalten das zytotoxische und mutagene Potenzial und führen zu verschiedenen schädlichen Endpunkten wie: Punktmutationen, chromosomalen Aberrationen, Schwesterchromatidaustauschen, Tumorentstehung und -progression, sowie Zelltod (Kaina et al. 2007). Proliferation, nicht zuletzt weil die MMR in der S-Phase stattfindet, ist für diese Prozesse essentiell (Roos et al. 2004).

1.4.2.1 Manifestierung einer Punktmutation in Folge von O⁶MeG

Ohne Reparaturprozesse entsteht nach Durchlaufen zweier DNA-Replikationen aus einer O⁶MeG Läsion eine Punktmutation. Infolge der veränderten Ladungsverhältnisse nach Übertragung einer Methylgruppe an die O⁶ Position kann ein O⁶MeG nur noch zwei statt drei Wasserstoffbrückenbindungen zu seiner komplementären Base ausbilden. Während der ersten DNA-Synthese wird dem O⁶MeG dadurch ein Thymin anstatt einem Cytosin zugeordnet (Toorchen and Topal 1983; Warren et al. 2006). Dies erfolgt unter physiologischen Bedingungen bei einem Drittel der Läsionen (Abbott and Saffhill 1979). Die entstandene O⁶MeG-T Fehlpaarung läuft in die nächste S-Phase, wo sich durch den Einbau von Adenin gegenüber des Thymins eine Punktmutation auf einen der beiden Stränge manifestiert, während dem O⁶MeG wieder ein Thymin zugeordnet wird (Eadie et al. 1984). Ein korrespondierendes Phänotyp wurde als „Toleranz-Phänotyp“ beschrieben (Goldmacher et al. 1986). Zellen dieses Phänotyps besitzen weder MGMT noch ein intaktes MMR-System und tolerieren die Läsion, ohne sie zu prozessieren. O⁶MeG ist für diese Zellen nicht toxisch, aber mutagen.

1.4.2.2 Mismatch-Reparatur vermittelte Prozessierung von O⁶MeG

Die Mismatch-Reparatur dient während der DNA-Replikation als Kontroll- und Reparatursystem gegen Basenfehlpaarungen. Zur Erkennung fehlgepaarter Basen dient der MutS α -Komplex, bestehend aus den Proteinen MSH2 und MSH6 (Palombo et al. 1995; Duckett et al. 1996). Neben den spontan entstehenden Basenfehlpaarungen G-T, G-G, A-C und C-C (Fang and Modrich 1993) erkennt und prozessiert die MMR auch eine Vielzahl chemisch induzierter DNA-Läsionen, u.a. Cisplatin- und UV-induzierter Intrastrand Crosslinks (Yamada et al. 1997; Wang et al. 1999) sowie 8-OxoGuanin (Colussi et al. 2002). O⁶MeG wird ebenfalls von der MMR erkannt, unabhängig ob als komplementäre Base Thymin oder Cytosin zugeordnet wurde (Duckett et al. 1996). O⁶MeG-C wird

Einleitung

allerdings weitaus schwächer vom Mut α -Komplex gebunden als O⁶MeG-T, dessen Affinität zum Mut α -Komplex vergleichbar hoch mit G-T Fehlpaarungen ist (Yoshioka et al. 2006). MMR prozessiert Basen spezifisch auf dem neu synthetisierten Tochterstrang. Woran der Unterschied zwischen dem parentalen Strang und dem Tochterstrang durch Mut α festgestellt wird, ist bis heute nicht völlig aufgeklärt. Es konkurrieren zwei Modelle: Das Translokationsmodell manifestiert die ATP-abhängige Bewegung des Mut α -Komplexes entlang der DNA, um von einer erkannten Fehlpaarung zu einer Stelle die für Strangspezifität zu gelangen, wo eine Interaktion mit dem Mut α -Komplex vermittelt wird (Blackwell et al. 1998a; Blackwell et al. 1998b; Blackwell et al. 2001). Einzelstrangbrüche auf dem neu synthetisierten Strang werden als strangspezifisches Erkennungsmerkmal diskutiert. Beim „molecular switch“-Modell wirkt die Hydrolyse von ATP als Schalter. Der Mut α -ADP-Komplex ist für die Erkennung der Fehlpaarung verantwortlich („active state“), während der Mut α -ATP-Komplex durch eine Konformationsänderung die Dissoziation von der DNA bewirkt. Die anschließende ATP-Hydrolyse vermittelt die Interaktion mit Mut α („inactive state“) (Gradia et al. 1997; Fishel 1998). Die Assoziation von Mut α mit dem Mut α -Heterodimer, bestehend aus den Proteinen MLH1 und PMS2, vermittelt die Exzision der DNA durch die Exonuklease I (Genschel et al. 2002). Die Neusynthese der entfernten Sequenz erfolgt anschließend durch Pol δ (Longley et al. 1997). Die durch MMR erkannten O⁶MeG-T Fehlpaarungen erfahren eine vergebliche Prozessierung (Karran and Bignami 1994), da beim Reparaturprozess einem O⁶MeG erneut ein Thymidin zugeordnet wird. Dieser Vorgang erzeugt sekundäre Läsionen, die zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) während der DNA-Replikation führen. Das Ausmaß der entstehenden DSBs wird über die Anzahl der O⁶-Methylierungen, der MGMT-Expression und das verfügbare Niveau an Mismatch-Proteinen bestimmt. Das aktuelle Modell schlägt die Akkumulierung von diesen DSBs während der S-Phase als die entscheidenden zytotoxischen Läsionen vor, die für die O⁶MeG vermittelte Zytotoxizität in Form von Apoptose und Genotoxizität Verantwortung trägt (Kaina et al. 1997; Ochs and Kaina 2000).

1.4.3 Prozessierung des O⁶CIETG und ICL-Reparatur

Ein ICL ist eine hoch toxische, kovalente Verknüpfung beider komplementärer DNA-Stränge. Sie blockieren grundlegende zelluläre Prozesse, vor allem die DNA-Replikation und Transkription. ICLs werden von verschiedenen Agenzien erzeugt und führen zu agenzien-spezifischen Quervernetzungen zwischen unterschiedlichen Basen der beiden

Einleitung

DNA-Stränge. Die bedeutendsten, für chemotherapeutische Zwecke verwendeten Stoffgruppen sind: Platinkomplexe wie Cisplatin, Mitomycin C und die Gruppe der CENU-Derivate. Wird ein CENU vermitteltes O⁶CIeTG nicht durch MGMT repariert, kommt es zur Bildung eines ICL. Die effektive Reparatur dieser Läsionen ist unverzichtbar für die Vitalität einer Zelle. Ein einziger nicht reparierter ICL kann reparaturdefiziente Bakterien- und Hefezellen töten (Magana-Schwencke et al. 1982), und ca. 40 ICLs, auf das gesamte Genom verteilt, töten reparaturdefiziente Säugerzellen (Lawley and Phillips 1996; Akkari et al. 2000). Die Reparatur von ICLs ist komplex und die aktuellen Modelle darüber basieren auf vielen theoretischen Annahmen. Bekannt ist, dass sich in der S-Phase DSB an den Stellen bilden, wo ICLs den Kollaps von DNA-Replikationsgabeln bedingen (Akkari et al. 2000; De Silva et al. 2000; Bessho 2003). Die DSBs stehen im Verdacht, für die Apoptoseinduktion Verantwortung zu tragen, ganz ähnlich wie die Sekundärläsionen, die nach O⁶MeG-Prozessierung entstehen (Roos and Kaina 2006). Weit weniger ist über die Auswirkung des über ICL verursachten Transkriptionsblocks bekannt. Komponenten der NER und der DSB-Reparatur konnten für die Reparaturprozesse von ICLs identifiziert werden. Eine herausragende Rolle spielen die beiden NER-Proteine XPF und ERCC1. Mutationen in beiden Genen *xpf* oder *ercc1* sensitivieren Säugerzellen gegenüber ICL-induzierenden Agenzien (Hoy et al. 1985; Busch et al. 1997). Der XPF-ERCC1 Heterodimer fungiert als Endonuklease u.a. nach Blockierung einer DNA-Replikationsgabel und schneidet einen der beiden DNA-Stränge an beiden Seiten der Läsion (Kuraoka et al. 2000). Diese Aufgabe wird allerdings auch der Endonuklease Mus81 zugeschrieben (Boddy et al. 2001; Niedernhofer et al. 2004). Hierdurch entsteht ein Intermediär, welches einen einzelsträngigen Abschnitt enthält. Auf dem gegenüberliegenden Strangabschnitt befindet sich die durch die Endonukleasenaktivität prozessierte und durch den ICL kovalent gebundene Sequenz. Anschließend kann es auf zwei möglichen Wegen zur Reparatur kommen. Durch homologe Rekombination (HR) wird eine fehlerfreie Reparatur eines ICL vermittelt (Niedernhofer et al. 2004; Li and Heyer 2008). Dabei formiert sich ein Komplex aus Proteinen, welche eine homologe Sequenz als Matrize benutzt (siehe 1.4.4). Dieser Weg benötigt zwingend eine homologe Sequenz und kann deshalb nur ab der S-Phase und bis zur mitotischen Teilung stattfinden. Für einen zweiten Weg, der fehleranfälliger ist und keine homologe Sequenz benötigt, kann über Transläsionssynthese die Lücke im DNA-Strang aufgefüllt werden (Berardini et al. 1999). Die Polymerase η (Pol η) und Rev1 (die katalytische Untereinheit der Polymerase ζ (Pol ζ)) sind dabei beteiligt (Zheng et al. 2003; Sarkar et al. 2006; Shen et al. 2006). In einem zweiten

Einleitung

Einschnitt wird nun die Läsion aus dem anderen Strang geschnitten und wiederum aufgefüllt.

1.4.4 DNA-Doppelstrangbruchreparatur

DSBs sind hoch toxische Läsionen. Nicht repariert, führen sie zu Zellzyklusarrest und Apoptose. Die vollständige Durchtrennung des DNA-Doppelstrangs begünstigt die Entstehung von Translokationen, Inversionen oder den Verlust genomischen Materials. Die Akkumulation von DSBs durch Prozessierung von Läsionen wie O⁶MeG gilt als der ausschlaggebende Stimulus, der die Zellen in den Tod treibt. Eukaryotische Zellen besitzen zwei Reparatursysteme, um DSBs zu beseitigen: die Reparatur durch homologe Rekombination (HR) und das nicht homologe Verknüpfen der DNA-Enden („nonhomologous end-joining“, kurz NHEJ). In Abbildung 1-1 ist der prinzipielle Mechanismus der beiden Reparatursysteme dargestellt.

Die HR kann ausschließlich dann stattfinden, wenn eine homologe Sequenz der Schadensregion in der Zelle vorliegt, also zwischen S-Phase und Mitose. Sie gilt als der Reparaturweg mit der geringeren Fehleranfälligkeit. DSBs die aus blockierten DNA-Replikationsgabeln resultieren, scheinen hauptsächlich oder sogar exklusiv über die HR prozessiert zu werden (Shrivastav et al. 2008). Bei der HR wird eine homologe, unbeschädigte Sequenz als Vorlage verwendet, um einen gebrochenen DNA-Strang wieder zu rekonstruieren. Dazu müssen die beide beteiligten DNA-Abschnitte in physikalischen Kontakt treten. Der initiierende Schritt ist die Prozessierung des DSB durch einen Komplex aus Mre11, Rad50 und Nbs1 (MRN-Komplex). Der MRN-Komplex vermittelt Exo- und Endonukleaseaktivität in 5'- zu 3'-Richtung und erzeugt so einzelsträngige 3'-Überhänge. Durch den MRN-Komplex wird auch Signaltransduktion über ATM initiiert (siehe 1.5.4.1). Das Binden von Rad52-Proteinen an diesen prozessierten Enden schützt vor dessen Abbau und ist vermutlich der entscheidende Schritt zur weiteren Reparatur via HR (Rattray and Symington 1994; Van Dyck et al. 1999). Interaktion von Rad52 mit Rad51-Proteinen (Shen et al. 1996) und RPA (Park et al. 1996) initiiert anschließend den DNA-Strangaustausch (New et al. 1998). Unter Rad51-Proteinen werden die fünf Paralogen Rad51B, C und D, sowie XRCC2 und XRCC3 zusammengefasst (Kawabata et al. 2005). Rad51-Proteine binden einzel- und doppelsträngige DNA und vermitteln DNA-abhängig (Benson et al. 1994) die Interaktion zwischen dem 3'-Ende der geschädigten DNA mit dem unbeschädigten Homolog in Form eines D-Loops (Baumann and West 1997). Nach dem Rad-Protein vermittelten DNA-Strangaustausch verläuft das Auffüllen

Einleitung

und die Ligation nach dem klassischen Modell nach Holliday (Holliday 1964; Constantinou et al. 2001).

Das NHEJ benötigt keine homologen Sequenzen, da die NHEJ-Reparatur aus direkter Ligation der getrennten Enden besteht. NHEJ kann so in allen Zellzyklusphasen DSB-Reparatur leisten und ist in der G1/G0-Phase der einzige Weg, um DSBs zu reparieren. Die Nichtberücksichtigung einer intakten, homologen Sequenz macht diesen Reparaturweg fehleranfälliger als die HR. Der erste Schritt der Reparatur ist die Bindung eines Heterodimers aus Ku70 und Ku80 an beiden offenen Enden der DNA (Cary et al. 1998; Walker et al. 2001). Durch Rekrutierung von DNA-PK an die Ku70/80-Komplexe kommt es zu dessen Autophosphorylierung und zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (Ding et al. 2003). Daraufhin wird u.a. XRCC4 von DNA-PK phosphoryliert (Critchlow et al. 1997) und mit Ligase IV zu den DNA-Enden und dem daran assoziierten Proteinkomplex rekrutiert (Leber et al. 1998; Hsu et al. 2002; Mari et al. 2006). Viele durch Mutagene vermittelte DSBs müssen, bevor eine Ligation der Enden erfolgen kann, prozessiert werden. Dies wird hauptsächlich durch den MRN-Komplex vermittelt (Maser et al. 1997; Nelms et al. 1998).

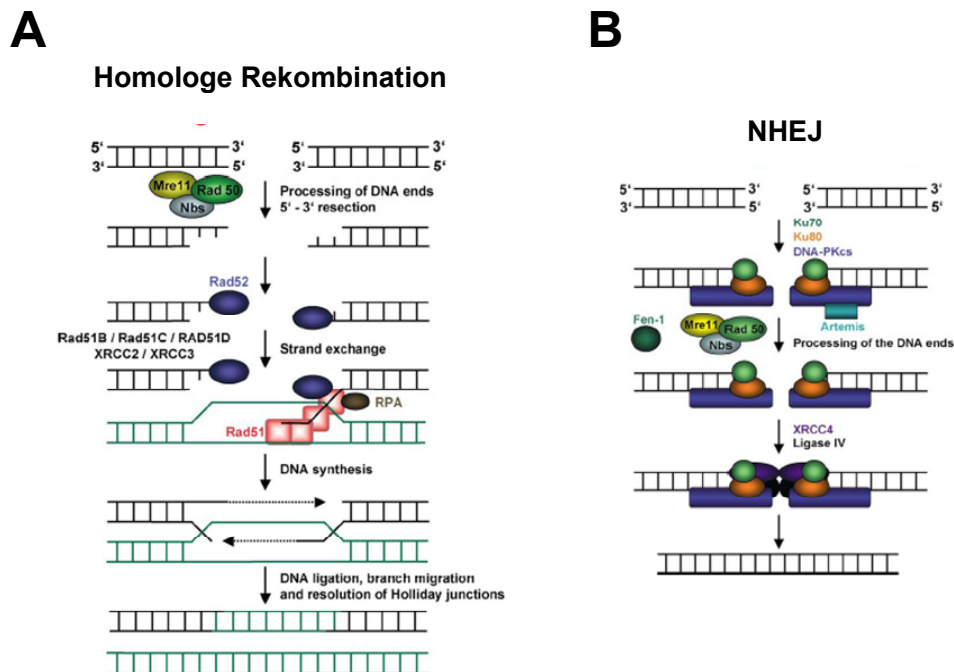


Abb. 1-1 Mechanismen der DSB-Reparatur: homologe Rekombination (A) und „nonhomologous end-joining“ (NHEJ) (B) aus (Christmann et al. 2003)

1.5 Apoptose

Die zwei bedeutendsten Arten eines zellulären Todes sind Apoptose und Nekrose. Nekrose tritt u.a. beim Absterben von Zellen nach einer Gewebeverletzung auf. Nekrotische Zellen unterlaufen im Vergleich zu apoptotischen einen chaotischeren Prozess mit verschiedenartigen morphologischen Ausprägungen. Eine Nekrose verläuft insgesamt schneller als die Apoptose und ist durch einen schnellen Funktionsverlust der Organellen gekennzeichnet. Der Zusammenbruch des Membranpotentials führt zum Schwellen nekrotischer Zellen und zum Platzen ihrer Zellmembran. Die Freisetzung der intrazellulären Bestandteile mündet oft in Entzündungsreaktionen des umgebenden Gewebes. Ein weiteres Merkmal ist das relativ späte Auftreten von DNA-Abbau.

Als Apoptose (griech. *apoptosis*, Blätterfall) wird ein intrazellulär reguliertes Suizidprogramm bezeichnet, mit dem eine Zelle kontrolliert absterben kann. Dieser Vorgang wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet, da zelluläre Prozesse, wie Signaltransduktion, Transkription, Proteinsynthese und Enzymaktivität, zu definierten Endpunkten und einem charakteristischen Phänotyp führen. Durch den apoptotischen Vorgang werden überflüssige und defekte Zellen gezielt entfernt, ohne dass eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Apoptose kommt in vier grundlegenden Prozessen höherer Organismen zum Tragen: (i) in der Embryonalentwicklung, z.B. bei der Geweberückbildung zwischen den sich entwickelnden Fingern oder bei der Organisation von Neuronen, (ii) bei der Homöostase, welches das Fließgleichgewicht zwischen Wachstum (durch Zellteilung) und Eliminierung alter Zellen (durch Apoptose) zur Aufrechterhaltung des Zellvolumen von Organen und Geweben beschreibt, (iii) während der Immunantwort, um z.B. virusinfizierte oder autoreaktive Zellen zu eliminieren und (iv) nach zytotoxischer Schädigung von Zellen zur Bewahrung der genomischen Integrität und der Abwehr von Onkogenese durch Schutz des Organismus vor entarteten Zellen. Während einzellige Organismen auf DNA-Läsionen nur mit Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten und DNA-Reparaturmechanismen reagieren können, steht vielzelligen Organismen mit der Apoptose eine weitere Option zur Verfügung: das gezielte Eliminieren geschädigter Zellen. Unvollständige Apoptose bzw. ihr gestörter Ablauf scheinen in der Pathogenese von Erkrankungen, wie Autoimmunerkrankungen, Krebs und AIDS Bedeutung zu haben (Thompson 1995). Die klassischen morphologischen Stationen einer apoptotischen Zelle sind (i) Abrundung, (ii) Kondensierung der nukleären DNA, (iii) DNA-Fragmentierung und Bildung von Chromatinkörpern, (iv) Zerfall der Zelle in Vesikel (apoptotische Körperchen), (v) phagozytotische Aufnahme der Vesikel von Zellen des

Einleitung

Organismus. Die meisten morphologischen Kriterien, die anfangs zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose verwendet wurden, betreffen den Zellkern (Kerr et al. 1972). Degradierung der chromosomalen DNA in oligonukleosome Fragmente wurde in bestrahlten lymphoiden Gewebe beobachtet (Skalka et al. 1976), welches vier Jahre später mit Aktivierung von Endonukleasen in Verbindung gebracht wurde (Wyllie 1980) und seitdem als biochemischer Marker der Apoptose dient (siehe 2.2.6.1: Bestimmung der SubG1-Fraktion). Das heutige Wissen über die Apoptose beschreibt einen komplexen und kaskadenartigen Prozess, der in drei aufeinander folgenden Ablaufphasen unterteilt werden kann. Man unterscheidet (i) eine Initiationsphase, (ii) eine Effektorphase und (iii) eine Degradationsphase (Allen et al. 1998). Die Initiationsphase beschreibt die Stimuli, die das apoptotische Programm auslösen. Es werden interne Stimuli (körpereigene Signale) und externe Stimuli (z.B. DNA schädigende Substanzen, Hitzeschock oder oxidativer Stress) unterschieden. In der Initiationsphase kommen Prozesse, wie Signaltransduktion, Proteinsynthese oder Translokation von Proteinen zum Tragen. Verschiedene Stimuli führen zur Aktivierung verschiedener apoptotischer Wege, aktivieren aber ein gemeinsames, nachgeschaltetes Suizidprogramm (Chinnaiyan and Dixit 1996; Vaux and Strasser 1996). Die Effektorphase ist durch die Aktivierung von Cystein-Aspartat Proteasen, den so genannte Caspasen charakterisiert (Alnemri et al. 1996; Srinivasula et al. 1996). Substrate dieser Enzyme werden an einer spezifischen Sequenz nach einem Aspartat gespalten (Martin and Green 1995). In ungeschädigten Zellen liegt diese Enzymfamilie in ihrer inaktiven Form vor, als so genannte Procaspasen. In apoptotischen Zellen werden eine Reihe von Caspasen durch Auto-Proteolyse oder durch heterologe Caspasen aktiviert. Im Gegensatz zu posttranskriptionellen Modifikationen zur Regulierung der Enzymaktivität (z.B. durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung) ist die Proteolyse der Caspasen irreversibel. Es werden Initiatorcaspasen (Caspase-8 und -9) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, und -7) unterschieden (Nicholson et al. 1995; Chang and Yang 2000). Die Initiatorcaspasen sind Teil der Signaltransduktionskette und aktivieren in erster Linie die Effektorcaspasen. Effektorcaspasen besitzen ein sehr breites Substratspektrum (Chang and Yang 2000). Ihre Substrate, u.a. bestehend aus antiapoptotischen Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, Proteinen des Zytoskeletts und der Signaltransduktion, werden in den meisten Fällen durch Proteolyse inaktiviert. Eines der bekanntesten Substrate ist das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) (Lazebnik et al. 1994). In der Degradationsphase werden die Zellbestandteile abgebaut. Die in der späten Apoptose zu beobachtende und durch

Einleitung

DNasen-vermittelte, internucleosomale Fragmentierung der chromosomalen DNA, wird über die Gruppe der Desoxyribonukleasen (CAD, caspase-activated DNase) katalysiert. Auch dieser Prozess wird über Caspasen vermittelt, die den Inhibitor von CAD, das DFF-Protein inaktivieren (Liu et al. 1997; Enari et al. 1998). Zu ergründen, auf welchem Weg Zellen die Initiationsphase und die Effektorphase durchlaufen, ist kompliziert. Eine Vielzahl von Proteinen kann in den apoptotischen Prozess eingreifen und als pro- oder antiapoptotischer Faktor wirken. Die Verschiebung von antagonistisch wirkenden Proteingruppen in einzelnen Segmenten der Zelle spielt dabei eine Rolle. Proteinneusynthese kann ebenfalls dabei beteiligt sein. Grob vereinfacht können Zellen auf zwei Hauptrouten Apoptose einleiten, die hier näher erläutert werden sollen: den Rezeptor-vermittelten und den Rezeptor-unabhängigen, mitochondrial vermittelten Apoptoseweg (Srinivasula et al. 1996; Zamzami et al. 1996). Daneben existieren eine Vielzahl an Daten, die alternative oder additive Wege aufzeigen, u.a. über das Endoplasmatische Retikulum (Breckenridge et al. 2003; Rao et al. 2004) oder der Caspase unabhängigen Apoptose, z.B. über AIF oder Endonuklease G (Cregan et al. 2004; Broker et al. 2005). Wahrscheinlich kommt es nach der Initiation in der Zelle zu Überlappungen einzelner Wege, die schlussendlich in den gemeinsamen Endpunkten münden.

1.5.1 Rezeptor-vermittelte Apoptose am Beispiel des Fas-Rezeptors

Für die Familie der membranständigen Todesrezeptoren, zu welcher der Fas- oder CD95-Rezeptor (Fas-R) und die TNF-Rezeptoren gehören, wurde die Vermittlung von Apoptose beschrieben. Der schematische Verlauf des Rezeptor-vermittelten Apoptosewegs ist in Abbildung 1-2 dargestellt. Der Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg beginnt mit der Bindung spezifischer Liganden auf der extrazellulären Seite der Zellmembran. Die Liganden gehören zu den Cytokinen (wie der FasL oder CD95L, TNF α und β und TRAIL) und werden durch Exozytose in den extrazellulären Raum abgegeben oder auf der Zelloberfläche bestimmter Zelltypen präsentiert. Für den Fas-Rezeptor sowie für den Fas-Liganden konnte transkriptionelle Heraufregulierung nach genotoxischem Stress nachgewiesen werden. Beschrieben sind die p53-abhängige Heraufregulierung des Fas-Rezeptors (Muller et al. 1998) und die AP-1 vermittelte Regulation des Fas-Liganden (Faris et al. 1998). Durch Bindung des Liganden an Rezeptormonomere kommt es zur Oligomerisierung eines homotrimerischen Fas-Rezeptormoleküls und ihrer anschließenden Aktivierung durch Autophosphorylierung der zytosolischen Domäne.

Einleitung

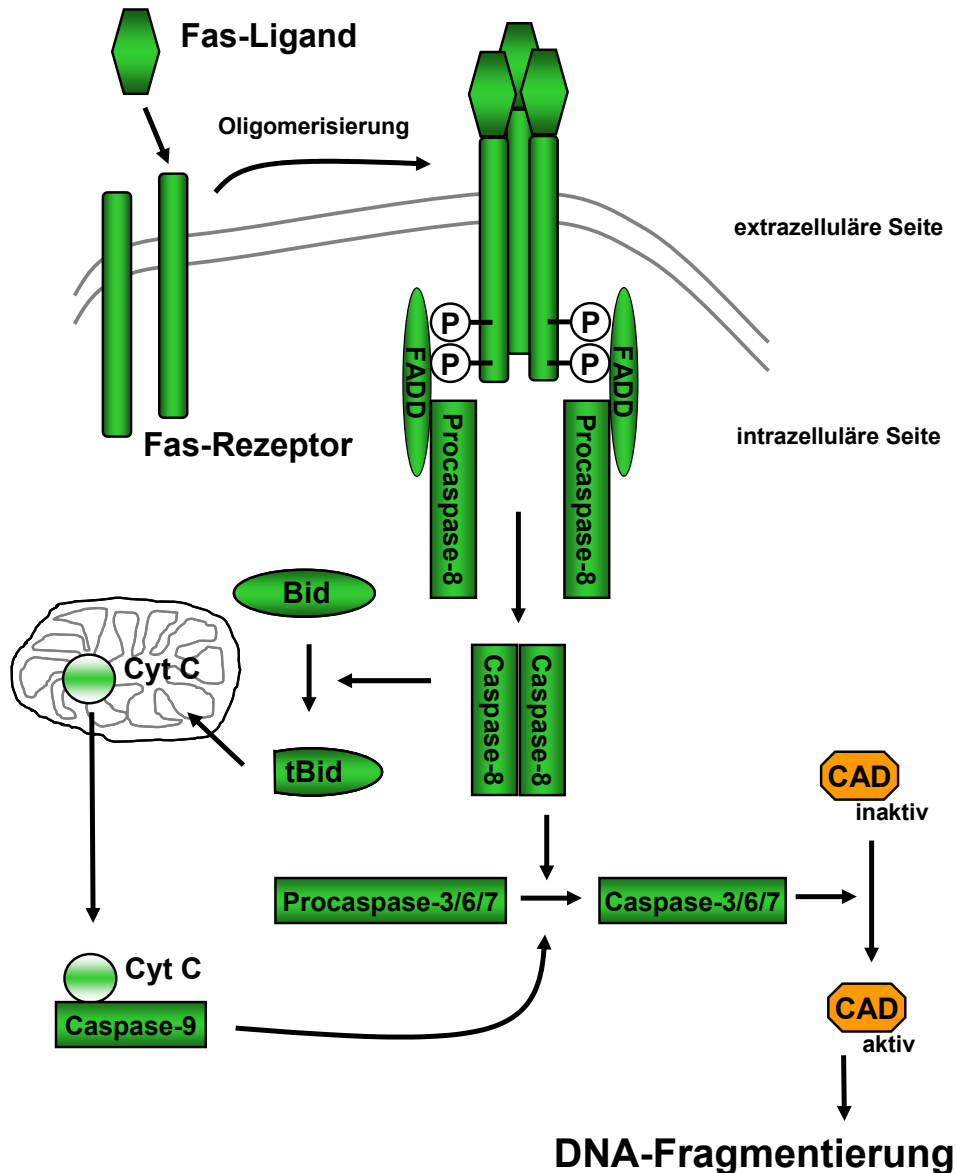


Abb. 1-2 Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Apoptose

Dies vermittelt die Interaktion mit dem Adapterprotein FADD („Fas-associated death domain“) (Boldin et al. 1995; Chinnaiyan et al. 1995). FADD besitzt eine so genannte Todeseffektor-Domäne (death effector domain), welche zu den homophilen Caspaserekrutierungs-Domänen („caspase recruitment domain“; kurz CARD) gehört und spezifisch die Prodomäne der Caspase-8 rekrutiert (Boldin et al. 1996; Muzio et al. 1996). Der Komplex aus FADD und Caspase-8 wird als DISC („death-inducing signaling complex“) bezeichnet (Medema et al. 1997) und führt durch Dimerisierung und autoproteolytischer Spaltung der Caspase-8 zu ihrer Aktivierung (Muzio et al. 1998). Die proteolytische Aktivität der Caspase-8 führt direkt zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 und leitet so die Degradationsphase der Apoptose ein (Muzio et al. 1997). Für Caspase-8 wurde zusätzlich ein Einfluss auf den mitochondrial vermittelten Apoptoseweg

Einleitung

beschrieben. Die Spaltung von Bid durch Caspase-8 bedingt hierbei die Aktivierung von Caspase-9 und den Effektorcaspasen.

1.5.2 Rezeptor-unabhängige, mitochondrial vermittelte Apoptose

Die Initiation der Rezeptor-unabhängigen Apoptose ist weit weniger gut charakterisiert als die der Rezeptor-vermittelte Apoptose. Eine schematische Darstellung des mitochondrial-vermittelten Apoptoseweges ist in Abbildung 1-3 abgebildet. Im Mittelpunkt dieses Apoptoseweges steht das Mitochondrium, welches für die Zelle neben der Energieproduktion auch eine entscheidende Rolle für die zelluläre Integrität spielt. Pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie (Tabelle 1-3) konkurrieren hierbei miteinander um den Einfluss auf die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran („mitochondrial outer membrane permeabilisation“, kurz MOMP). Der Tumorrepressor p53 kann ebenfalls direkt auf Mitglieder der Bcl-2 Familie einwirken (siehe 1.5.4.2). Der Verlust der Integrität der mitochondrialen Membran stellt den initiierenden Schritt und den „Point of no return“ der mitochondrial vermittelten Apoptose dar (Chipuk et al. 2006). Die beiden Bcl-2 Familienmitglieder Bax und Bak spielen als Effektorproteine eine besondere Rolle, da sie durch Oligomerisierung Kanäle in der äußeren Membran bilden und die MOMP direkt beeinflussen (Hacker and Weber 2007; Kepp et al. 2007). Durch Erhöhung der MOMP wird u.a. Cytochrom C in das Zytosol entlassen. Dieses Protein, welches in intakten Zellen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran lokalisiert ist und dort an der oxidativen Phosphorylierung mitwirkt, agiert im Zytosol als Aktivator von Caspase-9. Im so genannten Apoptosom, einem Komplex aus Apaf-1, Procaspase-9 und Cytochrom C, wird Caspase-9 aktiviert (Acehan et al. 2002; Pop et al. 2006). Aktive Caspase-9 vermittelt zum einen die Spaltung und Inaktivierung von PARP-1 (Duan et al. 1996) und antiapoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2 Familie (Chen et al. 2007) und zum anderen die Aktivierung von Effektorcaspasen, welches in die Degradationsphase der Apoptose mündet (Li et al. 1997). Für Caspase-3 wurde eine positive Rückkopplung mit Caspase-9 beschrieben, die zur Erhöhung des aktiven Caspaseniveaus führt. Aus dem Mitochondrium werden ebenfalls die proapoptotischen Faktoren Smac/DIABLO und AIF entlassen. Smac/DIABLO inhibiert die Familie der „Inhibitoren der Apoptose“ (siehe 1.5.3). AIF und die Endonuklease G führen im Zellkern zur Fragmentierung der DNA in einer Caspase-unabhängigen Weise (Cregan et al. 2004).

Einleitung

Tabelle 1-3: Mitglieder der Bcl-2 Familie

Name	Nähere Charakterisierung	Aufgabe beim apoptotischen Prozess	Übergeordnete regulatorische Prozesse
Bim	BH3-only	Initiator	
Puma	BH3-only	Initiator	Transkription durch p53 und p73
Bad	BH3-only	Initiator	Dephosphorylierung
Noxa	BH3-only	Initiator	Transkription durch p53 und p73
Bmf	BH3-only	Initiator	
Bid	BH3-only	Initiator	Aktivierung durch Caspase-8
Bik / Nbk	BH3-only	Initiator	
Hrk	BH3-only	Initiator	
Bax	Multidomänenprotein	Effektor	Transkription durch p53 und p73
Bak	Multidomänenprotein	Effektor	
Bcl-2	Bcl-2 like	Inhibitor	
Bcl-X _L	Bcl-2 like	Inhibitor	
Bcl-w	Bcl-2 like	Inhibitor	
Mcl-1	Bcl-2 like	Inhibitor	

Die Regulierung der Bcl-2 Familienmitglieder untereinander ist bis heute nicht völlig aufgeklärt. Der Verlust eines der beiden kanalbildenden Proteine Bax oder Bak hat keinen großen Einfluss auf die apoptotische Antwort. Dies tritt nur bei dem Verlust beider Proteine gleichzeitig auf (Wei et al. 2001). Bax und Bak können sich gegenseitig ersetzen, werden aber nicht auf die gleiche Weise reguliert. Auch in nicht apoptotischen Zellen ist Bak in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Hacker and Weber 2007). Die antiapoptotischen Proteine Bcl-X_L und Mcl-1 (nicht aber Bcl-2) binden Bak (Willis et al. 2005) und halten es inaktiv. Proapoptotische Gegenspieler von Bcl-X_L und Mcl-1 sind Bim, Puma, Noxa und Bad (Chen et al. 2005; Hacker and Weber 2007), welche die Bak Aktivierung positiv regulieren. Bax hingegen ist in nicht apoptotischen Zellen hauptsächlich im Zytosol lokalisiert. Um proapoptotisch wirken zu können, muss Bax erst zu den Mitochondrien translozieren (Hsu et al. 1997; Wolter et al. 1997). Die Rekrutierung aus dem Zytosol erfolgt durch Konformationsänderung von Bax, ausgelöst durch verschiedene Stimuli. Phosphorylierung von Bad, u.a. durch die Kinase Akt, hält das proapoptotische Bad inaktiv im Zytosol und verhindert Bax-Aktivierung (Yamaguchi and Wang 2001). Die proapoptotische Dephosphorylierung erfährt Bad u.a. durch die Protein-Phosphatase 2 α (PP2A) (Chiang et al. 2001; Chiang et al. 2003). Unphosphoryliertes Bad bindet Bcl-X_L und Bcl-2 und inhibiert diese (Yang et al. 1995; Zha et al. 1996), wodurch Bax translozieren kann. Ein zweiter Weg, Bax zu aktivieren, erfolgt durch Bid. Die Spaltung von Bid in die verkürzte Form tBid (truncated Bid), durch Caspase-8, aktiviert Bax (Chou et al. 1999). Hierbei handelt es sich um eine Verknüpfung des Rezeptor-vermittelten mit dem mitochondrial vermittelten Apoptoseweges. Auch Bcl-2 interagiert mit Bax (Oltvai et al. 1993) und hemmt dadurch die Kanalbildung (Nomura et al. 1999;

Einleitung

Murphy et al. 2000). Bad, Puma, Bim und Bik interagieren mit Bcl-2 (Gillissen et al. 2003; Chen et al. 2005) und fördern dadurch die Kanalbildung von Bax.

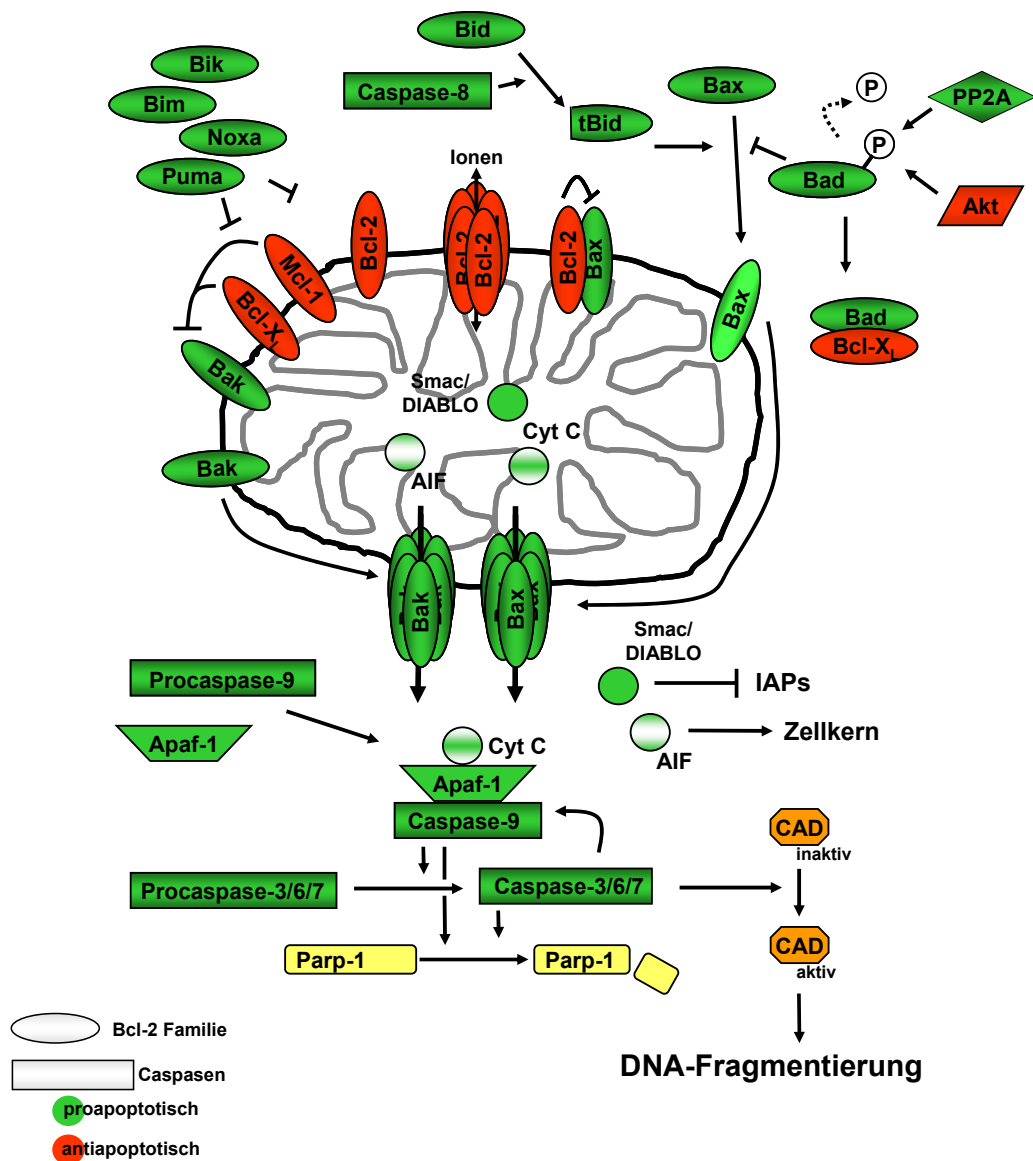


Abb. 1-3 Mechanismus der Rezeptor-unabhängigen, mitochondrial vermittelten Apoptose

Bcl-2 wurde als erstes antiapoptotisches Protein beschrieben und ist damit das am besten untersuchte Protein dieser Familie. Es ist ein potenter Inhibitor der Apoptose. Bcl-2 ist in der äußeren mitochondrialen Membran, dem endoplasmatischen Retikulum und der Kernmembran integriert (Krajewski et al. 1993). Für Bcl-2 und Bcl-X_L konnte *in vitro* die Bildung von Ionenkanälen beobachtet werden (Minn et al. 1997; Schendel et al. 1997). Ihre Bedeutung für Prozesse *in vivo* ist bis heute allerdings nicht geklärt. Ebenfalls kann Bcl-2, als Folge von genotoxischem Stress, durch die Assoziation mit Bcl-2-homologen Proteinen, durch Spaltung und durch proteosomale Degradation nach Ubiquitinierung

Einleitung

inaktiviert und degradiert werden (Cheng et al. 1997; Dimmeler et al. 1999; Tomicic and Kaina 2001). In Abwesenheit von Bcl-2-like Proteine der Bcl-2 Familie gewinnen die proapoptotischen Faktoren die Überhand und es kommt zur Erhöhung des MOMP und dadurch zur Auslösung der Apoptose.

Ein weiters, für den mitochondrial vermittelten Apoptoseweg bedeutendes Mitglied der Caspasefamilie ist die Caspase-2. Caspase-2 konnte als notwendiger Faktor für die Apoptoseinduktion durch verschiedene DNA-Schäden charakterisiert werden (Lassus et al. 2002) und wird u.a. deshalb als ein möglicher Kandidat für die Vermittlung zwischen primären DNA-Schäden und der nachgeschalteten apoptotischen Signaltransduktion diskutiert (Roos and Kaina 2006). Die Verknüpfung von Caspase-2 mit dem mitochondrial vermittelten Apoptosewegs erfolgt über die Aktivierung proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie Bid (Guo et al. 2002; Lassus et al. 2002; Robertson et al. 2002). Cytochrom C Freisetzung wird von Caspase-2 aber auch direkt vermittelt und dies unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität (Robertson et al. 2004).

1.5.3 Die Familie der Inhibitoren der Apoptose (IAPs)

Ein Schutzmechanismus der Zelle zu einem späten Punkt der apoptotischen Kaskade wird durch die Familie der Inhibitoren der Apoptose („Inhibitor of apoptosis proteins“; kurz IAPs) vermittelt. Die IAP-Proteinfamilie besitzt antiapoptotische Eigenschaften, die über den Einfluss auf Initiator- und Effektorcaspasen vermittelt werden (Deveraux et al. 1997; Deveraux et al. 1998; Deveraux and Reed 1999; Sah et al. 2006). Die Hemmung der Caspasenaktivität wird über die direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum dieser Proteingruppe vermittelt, wie es für das IAP-Protein „X-linked IAP“ (XIAP) beschrieben ist, sowie durch andere, indirekte Signale wie Ubiquitinierung (Eckelman et al. 2006). Survivin, ein IAP, welches *in vivo* nicht direkt mit Caspasen zu interagieren vermag (Banks et al. 2000), entfaltet seine antiapoptotische Wirkung als Kofaktor von XIAP oder HBXIP (Marusawa et al. 2003; Dohi et al. 2004). Der grundlegende Mechanismus von Survivin und XIAP ist in Abbildung 1-4 dargestellt. Der proapoptotische Faktor Smac/DIABLO wird wie Cytochrom C über die aus Bax und Bak gebildeten Kanäle ins Zytosol abgegeben. Dort interagiert Smac/DIABLO mit XIAP oder Survivin und inhibiert sie (Chai et al. 2000; Du et al. 2000). Ein anderer Antagonist ist der XIAP-associated factor 1 (XAF1), der seine proapoptotische Wirkung durch direkte Interaktion selektiv auf XIAP ausübt (Liston et al. 2001). Für die zwei prominenten IAP Mitglieder Survivin und XIAP wurde ein ansteigendes Expressionsmuster während der Onkogenese vom Nävus bis zum metastasierenden malignen Melanom beobachtet (Ding et al. 2006; Emanuel et al.

Einleitung

2008). XAF-1 ist im Gegensatz dazu in Melanomen wie auch in anderen Krebszelllinien herunterreguliert (Fong et al. 2000; Ng et al. 2004). Mit einer Herunterregulierung von Survivin oder XIAP mittels siRNA konnten resistente Melanomzelllinien gegenüber Apo2L/TRAIL vermittelte Apoptose sensibilisiert werden (Chawla-Sarkar et al. 2004).

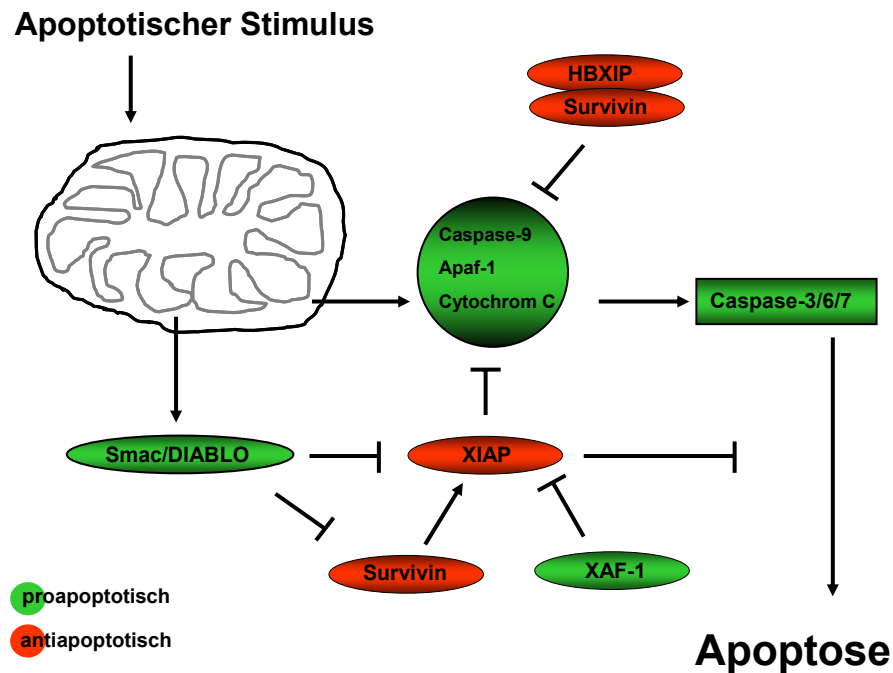


Abb. 1-4 Repressiver Einfluss der IAPs Survivin und XIAP

1.5.4 Signaltransduktion zwischen DNA-Schaden und Apoptose

Relativ ungeklärt ist bis heute die Vermittlung zwischen DNA-Schaden und Apoptoseinduktion. Während die Entstehung und Prozessierung verschiedenster Läsionen an der DNA und der daraufhin ausgelöste Apoptoseablauf in gesicherten Modellen beschrieben sind, bietet die Signaltransduktionskaskade zwischen DNA-Schaden und Apoptose einen breiten Raum für Spekulationen. Zelltypspezifität, kombiniert mit der Art der Schäden, spielt für die Signaltransduktion eine herausragende Rolle. Da gezeigt werden konnte, dass die Prozessierung der Schäden, verursacht durch CENU-Derivate und methylierenden Agenzien, DSBs generiert, soll im Folgenden die Apoptoseinduktion nach dem Auftreten von DNA-Strangbrüchen betrachtet werden.

1.5.4.1 Rolle der DNA-schadensabhängigen Proteinkinasen ATM und ATR

Die beiden Proteine „ataxia-telangiectasia mutated“ (ATM) und „ATM- und Rad3-related“ (ATR) gehören zur Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K). ATM und ATR sind zusammen mit der DNA-Proteinkinase (DNA-PK) die ersten Signalproteine, die

Einleitung

durch DNA-Schäden aktiviert werden. ATM spielt eine entscheidende Rolle für die Signaltransduktion von Reparatur, Zellzyklusarrest und Apoptose. Aktivierung von ATM korreliert mit DSB-Bildung durch ionisierende Strahlung (Banin et al. 1998; Canman et al. 1998; Ismail et al. 2005). Der MRN-Komplex, bestehend aus den Proteinen Mre11, Rad50 und Nbs1, bindet an einem DSB und ist als Aktivator von ATM beschrieben worden (Carson et al. 2003; Uziel et al. 2003). Die eigentliche Aktivierung von ATM verläuft über Autophosphorylierung am Serin 1981, wodurch es zur Auflösung der inaktiven Di- oder Multimere zu aktiven Monomeren kommt (Bakkenist and Kastan 2003). ATM phosphoryliert und aktiviert eine Vielzahl nachgeschalteter Signalproteine. DNA-Läsionen wie ICLs führen u.a. zur Blockierung von DNA-Replikationsgabeln in der S-Phase, wodurch DNA-Einzelstrangbrüche und DSBs entstehen können. ATR-Aktivierung ist vor allem nach Entstehung von blockierten DNA-Replikationsgabeln beschrieben worden (Dart et al. 2004). Vermutlich ist ATR auch an der Detektierung von DSBs beteiligt (Roos and Kaina 2006), welche ATM-abhängig vermittelt wird (Tomimatsu et al. 2007). ATR gehört zu einem Proteinkomplex, der eine blockierte Replikationsgabel stabilisiert, und ist verantwortlich für die Aktivierung nachgeschalteter Signalproteine.

ATM und ATR teilen sich eine große Anzahl von Substraten, u.a. die an Zellzyklusarrest und Apoptose beteiligten Proteine p53 (Tibbetts et al. 1999; Saito et al. 2002), Mdm2 (Maya et al. 2001; Shinozaki et al. 2003), Checkpoint Kinase 1 (Chk1) (Zhao and Piwnica-Worms 2001; Gatei et al. 2003), Checkpoint Kinase 2 (Chk2) (Matsuoka et al. 1998; Pabla et al. 2008), E2F-1 (Lin et al. 2001), c-Abl (Baskaran et al. 1997) und BRCA1 (Foray et al. 2003), aber auch γ H2AX (Burma et al. 2001; Ward and Chen 2001). Die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 (γ H2AX genannt) dient als Marker für DNA-Schäden und spielt im Besonderen für die Untersuchung von DSBs eine große Rolle (Ismail and Hendzel 2008). Die vorerst angenommene Substratspezifität zwischen ATM und Chk2, bzw. ATR und Chk1 existiert nicht. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die ATM- und ATR-Signalwege überlappen und beide Vertreter der Checkpointkinasen zu aktivieren vermögen (Kurz and Lees-Miller 2004).

1.5.4.2 Die Rolle des Tumorsuppressors p53 für die Apoptose

Nach Schädigung der DNA spielt das Tumorsuppressorprotein p53 eine der wichtigsten Rollen in der Zellantwort. p53 wurde deshalb der Titel „Wächter des Genoms“ verliehen. Es fungiert in erster Linie als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von Genen, die an Prozessen der Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind

Einleitung

(Lavin and Gueven 2006). Das Modell der p53-vermittelten Apoptose ist in Abbildung 1-5 A dargestellt. Bis heute wurden über 150 Gene charakterisiert, welche positiv oder negativ durch p53 reguliert werden (Zhao et al. 2000). Die Regulierung der transkriptionellen Aktivität von p53 erfolgt post-translational durch Phosphorylierung, Sumolierung, Acetylierung und durch *cis/trans*-Konformationsänderung (Appella and Anderson 2001; Wulf et al. 2002). Die Menge an post-translationalen Regulierungsmöglichkeiten bietet eine Feineinstellung der p53-Aktivität und erklärt, wie über ein einzelnes Protein eine solche Bandbreite an Funktionen gesteuert werden kann. Während der Onkogenese nimmt die Deregulierung bzw. Inaktivierung von p53 einen entscheidenden Platz ein. p53 ist nach heutigem Wissen das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren. p53-abhängige Apoptose nach DNA-Schäden spielt für die Verhinderung der Onkogenese sowie für die chemotherapeutische Behandlung von Tumoren eine große Rolle. Dies wurde für alkylierende Agenzien in verschiedenen Zellsystemen beschrieben (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007). Ohne zellulären Stress wird p53 kontinuierlich exprimiert und im gleichen Maße proteosomal abgebaut. Die Interaktion mit dem Regulator Mdm2 ist dabei für Abbau und Transport zwischen Zytosol und Kern verantwortlich. Nach genotoxischem Stress wird der p53-Abbau inhibiert, so dass es zur Anreicherung des Proteins kommt. DNA-schadensspezifische Phosphorylierungen, u.a. am Serin 15 durch ATM/ATR (Banin et al. 1998) oder am Serin 20 durch Chk2 (Chehab et al. 2000), führen zur Stabilisierung des Proteins und Aktivierung p53-vermittelter Transkription (Sionov and Haupt 1999). p53 reguliert die Expression von Reparaturproteinen, u.a. von MGMT (Harris et al. 1996; Grombacher et al. 1998). Das wichtigste p53-vermittelte Transkriptionsprodukt zur Arretierung des Zellzyklus ist der Cdk-Inhibitor p21 (el-Deiry et al. 1993). p21-Heraufregulierung nach zellulärem Stress führt zu G1/S-, S- und G2/M-Arrest (Ogryzko et al. 1997; Niculescu et al. 1998). DNA-schadensabhängige Apoptose wird durch p53 über viele Faktoren reguliert. Bax, Puma, Noxa (Wu and Deng 2002), Apaf-1 (Robles et al. 2001) sowie der Fas-Rezeptor (Muller et al. 1998) werden p53-abhängig exprimiert. Die Expression von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 oder Survivin wird dagegen durch Bindung von p53 am entsprechenden Promoter inhibiert (Wu et al. 2001; Hoffman et al. 2002).

p53 vermittelt Apoptose aber nicht nur transkriptionsabhängig, sondern auch transkriptionsunabhängig. Durch direkte Protein-Proteininteraktion beeinflusst p53 nach seiner Stabilisierung Mitglieder der Bcl-2 Familie im Zytosol und an der Mitochondrienmembran. So interagiert p53 mit Bcl-2 und Bcl-X_L und blockiert ihre

Einleitung

antiapoptotischen Funktionen (Mihara et al. 2003). p53 interagiert ebenfalls direkt Bak und Bax, welches zu ihrer Oligomerisierung und daraufhin zur Cytochrom C Freigabe führt (Chipuk et al. 2004; Leu et al. 2004).

Die Rolle von p53 in malignen Melnomen ist nicht völlig geklärt. Im Vergleich zu anderen Tumoren ist mutiertes p53 in Melnomen selten anzutreffen. Während die Hälfte aller menschlichen Tumore, und bis zu 60% aller Basalzellenkarzinome und Plattenepithelkarzinome Mutationen im *p53*-Gen aufweisen (Zerp et al. 1999; Vousden and Lu 2002), ist in Melanomen eine Mutationsrate von maximal 20% (Zerp et al. 1999) oder darunter (Florenes et al. 1994; Lubbe et al. 1994; Papp et al. 1996) beschrieben worden. Interessanterweise wurde für maligne Melanome gezeigt, dass die Mutationsfrequenz des *p53*-Gens in metastasierenden Tumoren niedriger ist als in Primärtumoren (Zerp et al. 1999). Die Autoren schließen daraus, dass Mutationen im *p53*-Gen nicht bedeutend für die Entwicklung eines Primärmelanoms zu einem metastasierenden ist. Trotz des hohen Anteils von p53-Wildtyp in Melanomen reagieren diese Tumore extrem chemoresistent. Dieser scheinbare Widerspruch ist nicht leicht zu erklären. Ein Modell schreibt dem Tumorsuppressor p14ARF, einem übergeschalteten Regulator von p53, die entscheidende Rolle in der Melanomentwicklung zu (Chin et al. 1997). Die Melanom-Onkogenese verlief dabei, ohne dass Mutationen im *p53*-Gen auftraten (Chin et al. 1997). Eine weitere Besonderheit in Melanomen ist das verringerte Expressionsniveau des proapoptotischen Faktors Apaf-1 (Soengas et al. 2006). Inaktivierung des durch p53 regulierten Apaf-1 in Melanomen kann eine Erklärung für den Phänotyp des chemoresistenten p53-Wildtyps darstellen (Soengas et al. 2001).

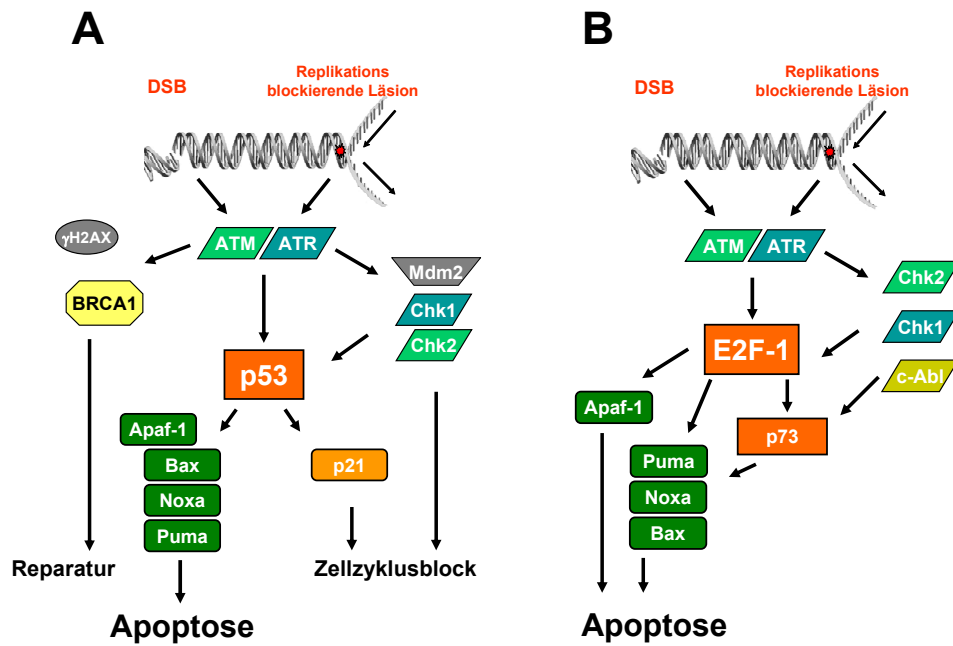


Abb. 1-5 p53-abhängige (A) und p53-unabhängige (B) Vermittlung von Apoptose nach DSBs

1.5.4.3 p53-unabhängige Apoptose via E2F-1 und p73

Untersuchungen der Signaltransduktion nach DNA-Schäden haben gezeigt, dass p53-vermittelte Apoptose in Tumorzelllinien eines der effektivsten Systeme ist, um Zelltod zu vermitteln (Roos and Kaina 2006; Roos et al. 2007). Trotzdem verlieren p53 mutierte Tumorzelllinien nicht vollständig ihre Fähigkeit, in die Apoptose zu gehen (Roos et al. 2007) oder sie können diese sogar effektiver ausführen als Zellen mit p53-Wildtyp (Batista et al. 2007). Die Bedeutung der p53-unabhängigen Apoptose ist für die chemotherapeutische Behandlung von Tumoren, in denen p53 in mutierter Form vorliegt, von großer Wichtigkeit. Das Modell der p53-unabhängig vermittelten Apoptose ist in Abbildung 1-5 B dargestellt. Ein zentrales Protein für diese Art von Apoptose ist der Transkriptionsfaktor E2F-1. E2F-1 ist ein transkriptioneller Regulator des G1/S-Phasenübergangs und wird über die Interaktion mit dem Retinoblastoma Protein (Rb-Protein) inhibiert. In gesunden Zellen wird in der späten G1-Phase die Transkription von S-Phaseproteinen über E2F-1 veranlasst. Nach DNA-Schaden wird E2F-1 durch ATM/ATR, Chk1 und Chk2 stabilisiert (Lin et al. 2001; Stevens et al. 2003; Urist et al. 2004). E2F-1 ist zum einen an der direkten Regulation der proapoptotischen Gene *puma*, *noxa*, *bim* und *apaf-1* beteiligt (Moroni et al. 2001; Hershko and Ginsberg 2004) und reguliert zum anderen den Transkriptionsfaktor p73 (Irwin et al. 2000). p73 ist ein p53-Homolog (Murray-Zmijewski et al. 2006). Es ist in der Lage, eine Vielzahl p53-regulierter, proapoptotischer Gene zu transkribieren und dadurch Apoptose einzuleiten (Ramadan et al.

Einleitung

2005). Zu beachten ist, dass Mutationen im *p73*-Gen deutlich seltener vorkommen als Mutationen in *p53* (Ozaki and Nakagawara 2005). Die Überlappung der Funktionen beider Proteine macht *p73* zu einem wichtigen Faktor für die Regulation von Apoptose in *p53* mutierten Tumoren. Nach DNA-Schaden wird *p73* von Chk1 und c-Abl phosphoryliert (Gonzalez et al. 2003; Tsai and Yuan 2003). Zusätzlich spielt die *cis/trans*-Konformationsänderung nach Phosphorylierung, katalysiert durch die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen Pin1, eine wichtige regulative Rolle (Mantovani et al. 2004). *p73*-vermittelte Expression der proapoptischen Proteine Bax, Noxa und Puma (Melino et al. 2004; Flinterman et al. 2005; Soond et al. 2007) verursacht so Apoptose über den E2F-1/*p73*-Weg (Zaika et al. 2001).

Zu beachten ist die Vielzahl von alternativen Splicevarianten des *p73*-Gens am C- und N-Terminus und die Existenz von zwei alternativen Promotoren am N-Terminus (Abb. 1-6 A) (Stiewe et al. 2002; Murray-Zmijewski et al. 2006). Dabei sind die beiden N-terminalen Varianten TAp73 und Δ Np73 für die Regulierung der Apoptose die entscheidenden. Das vollständige Protein mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAp73) ist transkriptionell aktiv und wirkt proapoptisch. TAp73 wird über einen E2F-1 regulierten Promotor gesteuert. Ein alternativer Promoter im Intron 3, der nicht über E2F-1, sondern über *p53* und TAp73 reguliert wird (Grob et al. 2001; Kartasheva et al. 2002), vermittelt die Transkription einer N-terminale verkürzten Form ohne Transaktivierungsdomäne (Δ Np73). Δ Np73 wirkt durch Bindung und Blockierung von Promotoren sowie durch Protein-Proteininteraktion mit TAp73 und *p53* dominant negativ und antiapoptisch (Grob et al. 2001; Zaika et al. 2002) (Abb. 1-6 B).

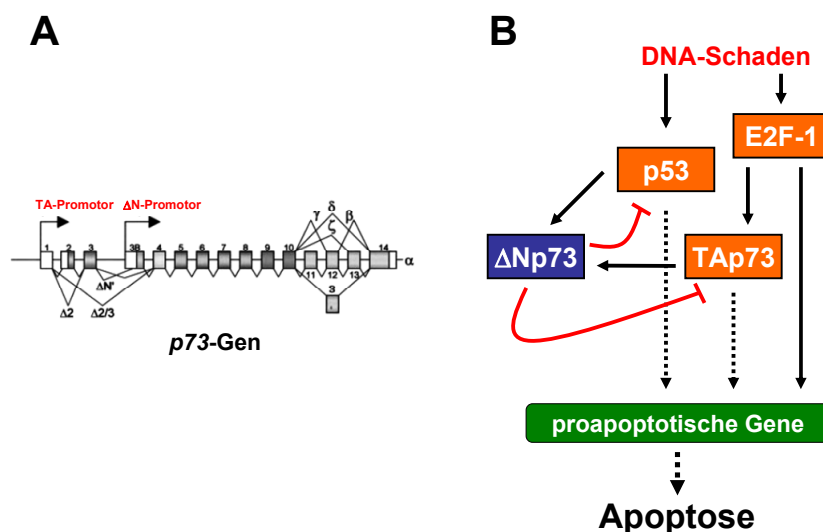


Abb. 1-6 Splicevarianten des *p73*-Gens aus (Stiewe et al. 2002) (A) und repressiver Einfluss von Δ Np73 auf *p53* und TAp73 (B)

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Beim malignen Melanom handelt es sich um einen Tumor, welcher resistent auf klassische chemotherapeutische Agenzien reagiert. Das methylierende Temozolomid und das CENU-Derivat Fotemustin finden als Mittel erster Wahl in der Therapie des malignen Melanoms Anwendung. Beide Agenzien wirken über die Schädigung der DNA antineoplastisch und zytotoxisch.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, zelluläre Parameter zu bestimmen, welche Relevanz für die Alkylantien-vermittelte Zytotoxizität und Resistenz in Melanomzellen besitzen. Besonderes Augenmerk soll hierbei auf die komplexe und bisher weniger gut charakterisierte Wirkung des ICL-induzierenden Fotemustins gelegt werden. Das zu untersuchende Zellsystem besteht einerseits aus den etablierten Melanomzelllinien SK29 und MeWo sowie aus den neu isolierten und bisher kaum charakterisierten Zelllinien D03, D05, D14 und MZ7.

Im Verlauf dieser Arbeit standen folgende Schwerpunkte im Vordergrund:

- Charakterisierung der Alkylantien-vermittelten Zytotoxizität in Melanomzellen und Untersuchung der Exekutionskaskade
- Einfluss von Signalwegen, u.a. unter Beteiligung des Tumorsuppressorgens p53, auf die Alkylantien-induzierte Zytotoxizität in Melanomzellen
- Verifizierung des O⁶-Alkylguanins als die Zytotoxizität-induzierende Läsion dieser Agenzien in Melanomzellen
- Bedeutung der Alkylantien-induzierten, sekundären Läsionen auf die vermittelte Zytotoxizität
- Bedeutung von Proliferation und DNA-Replikation auf die Alkylantien-induzierte Zytotoxizität in Melanomzellen

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.2.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Blot-Kammer, Trans Blot Cell	Bio-Rad, München
Blot-Kammer, Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank, Hera cell	Heraeus, München
Brutschrank (B5060 EK/CO ₂)	Heraeus, München
[¹³⁷ Cs]-Quelle Gammacell 2000	Molsgaard Medical, Dänemark
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Pharmingen, Heidelberg
ECL-Filme	Amersham, Braunschweig
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Fluorezenzeinrichtung BX-FLA	Olympus, Hamburg
Geldokumentation, InGenius	Syngene, Cambridge UK
Geltrockner	Bio-Rad, München
HPLC	Bio-Rad, München
Hybridisierungssofen	Appligen, Heidelberg
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Microplatten Reader Sunrise RC	Tecan, Crailsheim
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, Jena
Mikroskop BX 50	Olympus, Hamburg
Mikroskop Wilovert A	Hund, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrozellulosemembran (Protan)	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran (Hybond N+)	Amersham, Braunschweig
PCR-Cycler TGradient	Biometra, Göttingen
Rotationsverdampfer (speed vac)	Christ, Osterode
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Kodak, USA
Schüttelinkubator B.	Braun Biotech. Int., Melsungen
Spannungsquelle 200/2.0	Bio-Rad, München
Spannungsquelle Power Pac 200/300	Bio-Rad, München
Spektralphotometer Titertek Multiscan Plus	Labsystems, Finnland
Sterilbank, CLASSII A/B3, NUAIR	Zapf, Sarstedt
Sterilbank, Hera safe	Heraeus, München
Szintillationsmeßgerät	Kontron, Gosheim
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühler (-80°C)	Forma, Frankfurt
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	Bachhofer, Reutlingen
TurboblotterTM Downward Transfer Systems	Schleicher & Schuell, Dassel
Ultraschallstab 250	Branson, Danbury, USA
UV-C-Quelle NSE 11-270	Phillips, Hamburg
Vakuumpumpe	Brandt, Wertheim
Vortex Genie	Bender & Hobein, Zürich

Material und Methoden

Wasserbad	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Whatman 3 MM Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen
Zentrifuge Megafuge 1.0, Rotor 3360	Heraeus, München
Zentrifuge, Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Centrifuge 5415D, Rotor F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Discovery M120Se, Rotor S100AT6	Sorvall, Schwerte

2.1.2 Spezielle Chemikalien, Enzyme und Kits

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Anisomycin	Sigma-Aldrich, München
Annexin V-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Caspaseinhibitor (Boc-D-FMK)	Calbiochem, Darmstadt
Caspase Activity Assay, Colorimetric	R&D Systems, Wiesbaden
cDNA-Synthesekit (First Strand Synthesis Kit)	Sigma-Aldrich, München
cDNA-Synthesekit	ABgene, Hamburg
Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
Comassie Blue G-250	Bio-Rad, München
Colcemid Gibco	Life Technologies, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
DNA-Marker pBR322 DNA/AluI	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL- und ECL-Plus-Kit	Pharmacia/Amersham, Braunschweig
Effectene Transfection Kit	Qiagen, Hilden
Folin-Reagenz	Sigma-Aldrich, München
Giemsa	Merck, Darmstadt
HiPerFect Tranfection Reagent	Qiagen, Hilden
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Low Melting Point Agarose	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Magermilchpulver	Reformhaus, Mainz
Membranfärbekit	Sigma-Aldrich, München
Mycoplasma Detection Kit	Boehringer, Mannheim
Nonidet P40	Fluka, Neu Ulm
NucleoSpin RNA II	Marcherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA / Protein	Marcherey-Nagel, Düren
O ⁶ -Benzylguanin (O ⁶ BG)	Sigma-Aldrich, München
PBS	Biochrom, Berlin
Ponceau`s	Sigma-Aldrich, München
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München
Proteaseinhibitor-Cocktail Complete™	Roche, Mannheim
Proteinprobenpuffer LotiLoad 1	Roth, Karlsruhe
peqGold Proteinmarker II, 10-200 kDa	PEQLAB, Erlangen
Prestained Proteinmarker, 19-118 kDa	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Radioaktiv markiertes [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP	NEN Dupont, Zaventem, Belgien
Radioaktiv markiertes [^3H]-Uridin	NEN Dupont, Zaventem, Belgien
RNase A	Sigma-Aldrich, München
Szintillationslösung	Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Taq DNA Pol, Master Mix Red	Ampliqon, Hamburg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween20	Roth, Karlsruhe

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Buchs; CH), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), und Sigma-Aldrich (München) in der Qualitätsstufe p.a. bezogen.

2.1.3 Zytostatika

Fotemustin (Muphoran®)

Diethyl (1-{{(2-chloroethyl)(nitroso)carbamoyl}amino}ethyl)phosphonate

Servier, München

Temozolomid (Temodar®)

4-methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-triene-9-carboxamide

Schering-Plough, München

2.1.4 Software

Cell A	Olympus, Hamburg
CellQuest Pro	BD Pharmingen, Heidelberg
GeneSnap	Syngene, Cambridge, UK
GeneTools	Syngene, Cambridge, UK
Kinetic Imaging Kometa 4.0.2.	BFI-Optilas, Puchheim
WinMDI	http://facs.scripps.edu/software.html

2.1.5 Medien und Komponenten für Zellkultur

RPMI 1640 plus L- Gutamin	PAA, Pasching, Österreich
DMEM	PAA, Pasching, Österreich
Fötale Kälberserum (FCS)	biowest, Nuaille, Frankreich
Penicillin / Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
L-Gutamin	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Österreich

Material und Methoden

2.1.6 Antikörper

anti-Apaf-1	mAb	(1:750)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-ATM	pAb	(1:1000)	Bethyl Lab., Hamburg
anti-p-ATM(Ser1981)	mAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Bax	pAb	(1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Bcl-2	mAb	(1:1000)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Caspase-3	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-7	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-8		(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-9	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Chk1	pAb	(1:500)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p-Chk1(Ser317)	pAb	(1:1000)	Bethyl Lab., Hamburg
anti-p-Chk1(Ser345)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Chk2	pAb	(1:2000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p-Chk2(Thr68)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Cytochrom C	pAb	(1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-E2F-1	pAb	(1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Erk2	pAb	(1:6000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Fas-R	mAb	(1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Fas-R (agonistisch)			
anti-Fas-R (antagonistisch)			MBL, Watertown, USA
anti-γH2AX [p-H2AX(Ser139)]	mAb	(1:1000)	Upstate, NY/USA
anti-MGMT	pAb	(1:1000)	Institut für Toxikologie, Mainz
anti-MSH2	mAb	(1:1000)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-MSH6	mAb	(1:500)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Noxa	mAb	(1:1000)	Calbiochem, Darmstadt
anti-p21	pAb	(1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p53	pAb	(1:2000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p53	pAb	(1:200)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p-p53(Ser6)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p-p53(Ser9)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p-p53(Ser15)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p-p53(Ser20)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p-p53(Ser37)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p-p53(Ser46)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p-p53(Ser392)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-PARP-1	pAb	(1:750)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-PCNA	mAb	(1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Puma	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Rb	pAb	(1:750)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-pp-Rb(Ser807/811)	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-RPA(p32)	mAb	(1:4000)	NeoMarkers, Asbach
anti-Survivin	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Tim44	mAb	(1:2000)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-XAF-1	pAb	(1:1000)	ProSci, Lörrach
anti-XIAP	pAb	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
IgG Kaninchen (HRP konjugiert)		(1:4000)	Amersham, Braunschweig
IgG Maus (HRP konjugiert)		(1:4000)	Amersham, Braunschweig
AlexaFluor 488 Ziege-anti-Maus		(1:500)	Invitrogen, Karlsruhe
AlexaFluor 546 Ziege-anti-Maus		(1:500)	Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

2.1.7 Puffer und Stammlösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden in *A. bidest.* angesetzt.

Bradford	8,5% Phosphorsäure, 4,75% Ethanol, 1% Commasie blue G250 (anschließend filtern)	
Lowry I	2% Na ₂ CO ₃ , 0,1 M NaOH	
Lowry II	0,02% Na-K-Tartrat	
Lowry III	0,01% CuSO ₄	
PBS (pH 7.4)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 0,7 mM CaCl ₂ , 0,6 mM MgCl ₂	
Ponceau´s-Lösung	0,1% Ponceau 5% CH ₂ COOH	
Protein-Transfer-Puffer	50 mM Tris 384 mM Glycin 20% Methanol	
SDS-Trenngel (5%) [7,5] {10%} (12%) [15%]	(7,2) [6,5] {5,7} (5,1) [4,3] ml 3 ml 120 µl (1,5) [2,3] {3,0} (3,6) [4,5] ml 60 µl 6 µl	<i>A. bidest</i> Tris-HCl (pH 8,8) SDS (10%) Acrylamid (40%) APS (10%) TEMED
SDS-Sammelgel (4%)	4,4 ml 0,76 ml 60 µl 0,76 ml 60 µl 6 µl	<i>A. bidest</i> Tris-HCl (pH 6,8) SDS Acrylamid (40%) APS (10%) TEMED
SDS-Laufpuffer (5x)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin	
TBE-Puffer (pH 8.2) (5x)	450 mM Tris 450 mM Borsäure 6,25 mM EDTA	
TBS-Puffer (pH 7,6) (10x)	24,2 g Tris-HCl 80 g NaCl ad 1 l <i>A. bidest</i>	
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA	

Material und Methoden

2.1.8 Vektoren

pSV2MGMT: Aus dem Plasmidvektor *pSV2neo* (Southern and Berg 1982) wurde das Neomycinresistenzgen zugunsten des humanen MGMT-Gens ausgetauscht (Kaina et al. 1991).

2.1.9 Primer

Primer für qRT-PCR-Experimente:

Gen	Sequenz	Zyklus-Zahl	Annealing-Temperatur (°C)
<i>apaf-1</i>	5'-CAC GTT CAA AGG TGG CTG AT-3' (up) 5'-TGG TCA ACT GCA AGG ACC AT-3' (low)	27	61
<i>bax</i>	5'-GGA CGG GTC CGG GGA GCA GCC C-3' (up) 5'-GCC TTG AGC ACC AGT TTG CTG GC-3' (low)	28	58
$\Delta Np73$	5'-CAA ACG GCC CGC ATG TTC CC-3' (up) 5'-TGG TCC ATG GTG CTG CTC AGC-3' (low)	34	69
<i>gapdh</i>	5'-CCC CTC TGG AAA GCT GTG GCG TGA T-3' (up) 5'-GGT GGA AGA GTG GGA GTT GCT GTT GA-3' (low)	21	56
<i>nox4</i>	5'-GCC TGG GAA GAA GGC GCG CAA G-3' (up) 5'-CAG GTT CCT GAG CAG AAG AG-3' (low)	28	58
<i>puma</i>	5'-TGT AGA GGA GAC AGG AAT CCA CGG-3' (up) 5'-AGG CAC CTA ATT GGG CTC CAT CTC-3' (low)	31	55
<i>TAp73</i>	5'-GGC TGC GAC GGC TGC AGA GC-3' (up) 5'-GCT CAG CAG ATT GAA CTG GGC CAT G-3' (low)	31	67

Primer für EMSA-Experimente:

Bezeichnung	Sequenz
G-oligo	5'-TCTAGATGATCGTCGACGTCGAGCTCGGG-3'
C-oligo	5'-GGGAGATCTACTAGCAGCTGCAGCTCGAG-3'
T-oligo	5'-GGGAGATCTACTAGTAGCTGCAGCTCGAG-3'

2.1.10 siRNA

Die verwendete siRNA wurde über Qiagen (Hilden) bezogen.

Gen	Zielsequenz
E2F-1	5'-ACG CTA TGA GAC CTC ACT GAA-3'
p53	5'-AAG GAA ATT TGC GTG TGG AGT-3'
XIAP	5'-AAG TGC TTT CAC TGT GGA GGA-3'
Kontrolle (unspezifisch)	5'-AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT-3'

2.1.11 Zelllinien

AKN1	humane Zelllinie eines Leberkarzinom
D03 ^{1,2}	humane Zelllinie eines metastasierenden malignen Melanoms
D05 ^{1,2}	humane Zelllinie eines metastasierenden malignen Melanoms
D14 ^{1,2}	humane Zelllinie eines metastasierenden malignen Melanoms
HeLa S3	humane Zelllinie eines Gebärmutterkarzinoms
Jurkat	humane T-Zelllinie einer akuten lymphoblastischen Leukämie
MeWo	humane Zelllinie eines malignen Melanoms
MeWoF40	parentale Zelllinie MeWo, siehe (Christmann et al. 2001)
MZ7 ²	humane Zelllinie eines metastasierenden malignen Melanoms
SK29 ²	humane Zelllinie eines metastasierenden malignen Melanoms
P493-6 ³	gentechnisch manipulierte human B-Lymphozyten Zelllinie, siehe (Kempkes et al. 1995; Pajic et al. 2000)

¹ Zellen wurden von Prof. C.W. Schmidt (Institute of Medical Research, Australien) zu Verfügung gestellt.

² Zellen wurden von Prof. T. Wölfel (Institut für Hämatologie/Onkologie; Mainz) zu Verfügung gestellt.

³ Zellen wurden von Prof. D. Eick (GSF, München) zu Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturschalen oder -flaschen bei 37°C und 7% CO₂-Gehalt in wassergesättigter Atmosphäre. Die Kultivierung aller Melanomzelllinien und der Jurkatzellen erfolgt in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und jeweils 100 U/ml Penicillin und Streptomycin. Die Zelllinie P493-6 wurde im selben Medium mit zusätzlich 2 mM L-Glutamin kultiviert. HeLa-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde zunächst das auf den Zellen befindliche Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Mit Trypsin (0,25%) wurden die Zellen mehrere Minuten inkubiert und durch Klopfen der Schale an den Handballen abgelöst. Die Zellen wurden in frischem, 37°C warmen Medium aufgenommen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend verdünnt ausgesät. Zum Einfrieren wurden exponentiell wachsende Zellen einer Plastik Kulturschale (10 cm) geerntet, in Medium aufgenommen und bei 1000 Upm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das verbleibende Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach einer Verweildauer von 5 min bei 4°C wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Kultivieren gelagerter Zellen wurden die Kryoröhrchen bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und anschließend mit Kulturmedium gewaschen, um das verbleibende DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturschale (10 cm) überführt.

Alle etablierten Zelllinien wurden mit Hilfe des Mykoplasma-Detektions-Kits (Boehringer, Mannheim) regelmäßig auf Mykoplasmenkontamination untersucht.

2.2.2 Arretierung von P493-6-Zellen in der G1-Phase

Die Suspensionszellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und einem 50 ml Reaktionsgefäß auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurden 0,1 µg/ml Tetracyclin zugegeben, bevor die Zellen in Zellkulturschalen verteilt wurden. Nach 48 h

Material und Methoden

Inkubation konnte der entsprechende Versuch durchgeführt werden. Über die Versuchsdauer wurde mit Tetrazylin dauerbehandelt. Um den Block aufzuheben, wurden die Zellen mit 1000 Upm pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie in frischem Medium erneut ausgesät wurden.

2.2.3 Erstellung einer Wachstumskurve

Es wurden 1×10^5 Zellen in 6 cm Schalen ausgesät. Die Feststellung der Zellzahl erfolgt alle 24 h über einem Zeitraum von 4 Tagen. Durch Behandlung mit Trypsin wurden die Zellen gelöst und mit Medium auf ein definiertes Volumen zwischen 1 und 2 ml eingestellt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.4 Bereitung von Zytostatika und Behandlung von Zellen

Die Behandlung mit Fotemustin oder Temozolomid erfolgte durch die Zugabe einer entsprechenden Stammlösung in das Medium der Zellkulturschale. Die kurze Halbwertszeit der beiden Stoffe in wässriger Lösung ($t_{1/2}$ ca. 30 min), machte die Behandlung als Dauerbehandlung möglich. Eine Co-Behandlung mit O⁶-Benzylguanin (O⁶BG), erfolgte immer 1 h vor der Zytostatikagabe mit einer Endkonzentration von 10 μ M. Fotemustin wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgewogen und bei -20°C gelagert. Die Bereitung der Stammlösung (1 μ g/ μ l) wurde mit 1/3 EtOH und 2/3 *A.bidest* vorgenommen und stets frisch zubereitet. Die Temozolomidstammlösung (35 mM) wurde mit DMSO bereitet, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Behandlung von Zellen mit Strahlungsquellen

2.2.5.1 UV-C Strahlung

Für die Behandlung mit UV-C Strahlung wurden Zellen in Zellkulturschalen ausgesät. Den subkonfluenten Zellen wurde das Medium gründlich abgenommen und gesammelt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Dosis von 2 J/m²/sec. Im Anschluss wurde das gesammelte Medium wieder auf die Zellen gegeben.

2.2.5.2 Ionisierende Strahlung

Die Behandlung mit ionisierender Strahlung erfolgte für adhärenente Zellen in Kulturschalen (6 cm) oder für abgelöste Zellen in 15 ml Reaktionsgefäßen. Die letztere Strategie eignete sich vor allem für die Behandlung der Zellen bei 4°C. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Dosis von 3,75 Gy/min.

2.2.6 Methoden am Durchflusszytometer (FACS)

Alle Messungen am Durchflusszytometer wurden an einem FACSCalibur (BD Pharmingen, Heidelberg) durchgeführt. Für jede Messung wurden 1×10^4 Zellen analysiert. Wenn nicht anderes angegeben, stellen graphisch dargestellte Ergebnisse, die durch FACS-basierte Methoden gewonnen wurden, den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar.

2.2.6.1 Bestimmung der SubG1-Fraktion (Zelltodmessung)

Die Bestimmung des Zelltods mittels SubG1-Fraktion basiert auf der Messung des DNA-Gehalts von Zellen. Die Methode eignet sich ebenfalls, um die Zellzyklusverteilung zu ermitteln. Prozesse des Zelltods sind u.a. DNA-Fragmentierung und DNA-Abbau. Der DNA-Gehalt sterbender bzw. apoptotischer Zellen liegt somit unter dem DNA-Gehalt von Zellen in der G1-Phase. Die Bestimmung der Zellpopulation mit dem DNA-Gehalt < G1

Material und Methoden

wird dem Anteil toter Zellen gleichgesetzt (Nicoletti et al. 1991; Fraker et al. 1995). Es wurden 1×10^5 Zellen pro Zellkulturschale (6 cm) ausgesät und am nächsten Tag behandelt. Zum Ernten der Zellen wurde der Überstand mit den nicht adhärenen Zellen gesammelt, die adhärenen Zellen wurden mit Trypsin gelöst und beide Teile vereinigt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 Upm, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 150 µl PBS resuspendiert und in 2 ml eiskaltem 70%-igen Ethanol für 1 h (oder max. 4 Wochen) bei -20°C fixiert. Nach erneuter Zentrifugation (1500 Upm, 5 min, 4°C) wurde das Zellsediment in 333 µl PBS mit RNase A (Endkonz. 0.03 µg/ml) für 1 h inkubiert und vor der Messung mit 164 µl Propidiumjodidlösung (50 µg/ml) auf eine Endkonzentration von 16,5 µg/ml eingestellt. Die quantitative Analyse erfolgte mittels der CellQuest Pro Software und der WinMDI Software.

2.2.6.2 Bestimmung der Zellzyklusverteilung

Siehe 2.2.6.1: Bestimmung der SubG1-Fraktion (Zelltodmessung).

2.2.6.3 Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz (Annexin V/ Propidiumjodid-Doppelfärbung)

Diese Methode basiert auf der Bindung von Annexin-V-FITC an Phosphatidylserin-Resten, die während der frühen Apoptose von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite umgelagert werden (Vermees et al. 1995). Zum Ernten der Zellen wurde der Überstand mit den nicht adhärenen Zellen gesammelt, die adhärenen Zellen wurden mit Trypsin gelöst und beide Teile vereinigt. Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen, und nach einem Zentrifugationsschritt (1000 Upm, 5 min, 4°C) auf Eis gestellt und in 50 µl Bindungspuffer (10 mM HEPES [pH 7,4], 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 0,1% BSA) aufgenommen. Es wurden 2,5 µl Annexin V-FITC (BD Pharmingen, Heidelberg) zugegeben und die Zellen 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 430 µl Bindungspuffer und 10 µl PI zugegeben. Nach spätestens einer Stunde wurden die Proben am Durchflusszytometer gemessen und mittels der CellQuest Pro Software und der WinMDI Software quantifiziert.

2.2.6.4 Messung der Proliferation durch Membran-Färbung

Das Prinzip basiert auf dem Ausdünnen des in der Membran eingelagerten Farbstoffes PKH26 (Mini26-Kit, Sigma-Aldrich, München). Proliferation spiegelt das Vererben des Farbstoffs einer Mutterzelle auf die Tochterzellen im Verhältnis 1:1 wider. Um die Zellen möglichst in der gleichen Zellzyklusphase zu behandeln, wurden konfluente Zellen benutzt und nach Angaben des Herstellers (Endkonzentration: 2×10^6 M, Farbstoffinkubation: 4 min) angefärbt. Die Behandlung mit Zytostatika erfolgte am nächsten Morgen. Zum Ernten der Zellen wurde der Überstand mit den nicht adhärenen Zellen gesammelt, die adhärenen Zellen wurden mit Trypsin gelöst und beide Teile vereinigt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 Upm, 5 min, 4°C) wurden die pelletierten Zellen in 150 µl PBS resuspendiert und in 2 ml PBS mit 2%-igem Formaldehydanteil fixiert und für maximal sieben Tage bei 4°C gelagert. Nach erneuter Zentrifugation (1500 Upm, 5 min, 4°C) wurde das Zellsediment in 0,5 ml PBS resuspendiert. Die quantitative Analyse erfolgte mittels der CellQuest Pro Software und der WinMDI Software.

2.2.7 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA II-Kits oder des NucleoSpin RNA/Protein-Kits, beide von Marchery & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte in wässriger Lösung. Es wurde die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 230 nm bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg/ml DNA, 40 µg/ml RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotide. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ beschreibt die Verunreinigung der Probe mit Protein. Reine DNA hat den Wert 1,8, reine RNA 2,0. Nicht gelöste Nukleinsäuren werden aus dem Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₃₀ bestimmt. Der Messwert sollte 0,005 nicht übersteigen.

2.2.9 Synthese von Nukleinsäure in vitro

2.2.9.1 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA wurde mittels des „First Strand Synthesis-Kit“ von ABgene (Hamburg) oder Sigma-Aldrich (München) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Es wurden 0,6 µg Gesamt-RNA in die Reaktion eingesetzt.

2.2.9.2 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986) besteht in einer mehrfachen Replikation eines DNA-Fragments, welche durch eine Denaturierung der neu entstandenen Doppelstränge beliebig oft wiederholt werden kann. Für eine PCR werden Primer verwendet, die auf den verschiedenen Strängen der DNA binden und mit ihren 3'-Enden aufeinander zuweisen. Die Primer werden durch die thermostabile Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verlängert, wodurch die dazwischen liegenden Sequenzen aufgefüllt werden. Die neu synthetisierten Stränge dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize (Template), an welche die Primer hybridisieren können. Dadurch wächst die Anzahl an DNA-Fragmenten exponentiell an. In qRT-PCR Ansätzen wird cDNA eingesetzt, die aus Gesamt-RNA synthetisiert wurde. Mit dieser Methode wird untersucht, in welcher Größenordnung ein bestimmtes Gen (repräsentiert durch ein Fragment dieses Gens) auf mRNA-Ebene im Vergleich zu Referenzproben transkribiert wurde. Die Reaktionen wurden mit 0,5-4 µl der synthetisierten cDNA in einem Endvolumen von 25 µl mit Master Mix Red (Ampliqon, Hamburg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

1 Mal	2 min bei 94°C;
x ¹ Mal	Synthesezyklus (60 sec bei 94°C-Denaturierung, 60 sec bei x ² °C-Annealing, 120 sec bei 72°C-Verlängerung);
1 Mal	10 min bei 72°C.

x¹: siehe 2.1.9: Zyklenzahl; x²: siehe 2.1.9: Annealing-Temperatur

2.2.10 DNA-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzutrennen und zu analysieren, wurden Agarosegele verwendet. Die negativ geladene DNA wandert hierbei mit einer Geschwindigkeit durch die Agarose-Matrix, die proportional zum negativen Logarithmus der Länge des DNA-Fragments ist. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf 1,0%-igen Agarosegelen. Die Agarosegele wurden mit 1x TBE-Puffer angesetzt, wobei dieser Puffer auch als Laufpuffer verwendet wurde. pRT-PCR-Proben benötigten keinen zusätzlichen DNA-Stop-Puffer und wurden direkt in die Taschen gegeben und bei 100 V elektrophoretisch getrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Marker pBR322 DNA/AluI (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Färbung der elektrophoretisch

aufgetrennten DNA erfolgte durch Ethidiumbromid (5 µg/ml), welches vor dem Gießen des Gels in die flüssige Agarose gegeben wurde. Dokumentiert und ausgewertet wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem InGenius und der Software GeneSnap und GeneTools (Syngene, Cambridge UK).

2.2.11 Transfektion von DNA in Säugerzellen

Für die Transfektion des *pSV2MGMT*-Vektors wurde das Transfektionsreagenz Effectene (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde eine subkonfluente Zellkulturschale (10 cm) nach Angaben des Herstellers mit 2 µg Plasmid-DNA transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und in Zellkulturschalen (6 cm) für den Versuch neu ausgesät. 24 h darauf erfolgte die Behandlung mit den Zytostatika.

2.2.12 Transfektion von siRNA in Säugerzellen

Die Transfektion von siRNA wurde mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Zellen wurden nach Anforderung des Versuchs ausgesät und am nächsten Tag nach Angaben des Herstellers (Traditional Protocol) mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen transfiziert. Die Behandlung mit Zytostatika erfolgte 24 h später.

2.2.13 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.13.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Bindung von Comassie Blue G250 an die Aminogruppen der Proteine (Bradford 1976). Hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs in phosphosaure Lösung von 465 nm nach 595 nm. Für die Proteinbestimmung der Versuchsproben wurden je 1 µl der Proteinextrakte mit 200 µl Bradfordlösung auf einer 96-well Mikrotiterplatte versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Dunkelheit wurde die Messung der Absorption in einem Mikroplatten-Reader bei 600 nm vorgenommen. Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde anhand einer Eichkurve bestimmt. Die Eichkurve (0,5-5 µg Protein) wurde mittels BSA (Stammlösung 1 µg/µl) erstellt.

2.2.13.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry et al. 1951) beruht auf einer chemischen Reaktion, wobei die reaktiven Gruppen der Proteine unter alkalischen Bedingungen Cu^{2+} - zu Cu^+ -Ionen reduzieren. Die Cu^+ -Ionen wiederum reagieren mit Na-K-Tartrat zu einem blau gefärbten Komplex, dessen Absorption bei 600 nm per Photometer bestimmt werden kann. Zur Proteinbestimmung der Versuchsproben wurden je 10 µl Proteinlösung mit 140 µl Lowry I-Lösung gemischt. Zu allen Proben wurde nun 250 µl Lowry IV-Lösung (98% Lowry I, 1% Lowry II, 1% Lowry III, frisch zubereitet) und danach 30 µl 50%-iges Folin-Reagenz gegeben. Nach 30 min Inkubation in Dunkelheit und bei RT wurden je 100 µl in Doppelwerten in eine Mikrotiterplatte pipettiert und einem Mikroplatten-Reader bei 600 nm vermessen. Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde anhand einer Eichkurve bestimmt. Die Eichkurve (0,5-5 µg Protein) wurde mittels BSA (Stammlösung 1 µg/µl) erstellt.

2.2.14 Western-Blot-Analyse

2.2.14.1 Ernten von Zellen zur Proteinextrakterstellung

Die Zellen wurden mit Trypsin gelöst und je nach Fragestellung mit den Zellen des Überstands vereinigt oder nicht. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 Upm, 5 min, 4°C) wurde das Zellsediment in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4000 Upm, 5 min, 4°C) konnte das Zellpellet in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80°C gelagert werden oder es wurde direkt weiterverarbeitet.

2.2.14.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten I

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.14.1 beschrieben geerntet. Je nach Zellmenge wurde das Pellet in 100-500 µl Fraktionierungspuffer C (20 mM Tris-HCl [pH 8,5], 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 0,5 mM PMSF, 10 mM DDT, 1 µM Na₃VO₄, Complete™) resuspendiert und die Membranen mittels Ultraschall (2x 10 Pulse, *Duty cycle*: 40%, *Output control*: 4) aufgebrochen. Das Proteinlysate wurde durch Zentrifugieren (14000 Upm, 15 min, 4°C) geklärt. Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford. Die Lysate wurden bei -80°C gelagert.

2.2.14.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten II zur Detektion von Phosphoproteinen

Adhärenenten Zellen wurden in der Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen. Auf die Zellen in der Schale (6 cm) wurde 200 µl 95°C heißer Proteinprobenpuffer (Roth, Karlsruhe) gegeben. Die Zellen wurden mittels Zellschaber gelöst und mit dem Puffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mittels Ultraschall (2x 10 Pulse, *Duty cycle*: 40%, *Output control*: 4) wurden DNA und Membranen zerstört. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 95°C konnten die Extrakte bei -20°C gelagert werden. Proteinangleichung erfolgte mittels Western-Blot-Analyse.

2.2.14.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten III

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.14.1 beschrieben, geerntet. Das Zellpellet wurde mit dem NucleoSpin RNA/Protein-Kit (Marcherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers zu Gesamtzellextrakten verarbeitet. Proteinangleichung erfolgte mittels Western-Blot-Analyse.

2.2.14.5 Herstellung von reinen Kernextrakten

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.14.1 beschrieben, geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer 1 (10 mM Tris-HCl [pH 7,4], 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, 10 mM DDT, 1 µM Na₃VO₄, Complete™) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es wurde 50 µl 10%-iges NP-40 zugesetzt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (3200 Upm, 5 min, 4°C) wurde das Pellet (Kerne) in einem weiteren Milliliter Lysepuffer 1 gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde je nach Größe in 150 - 300 µl Lysepuffer 2 (20 mM Hepes-KOH [pH 7,4], 0,6 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 10 mM DDT, 1 µM Na₃VO₄, Complete™) resuspendiert und mittels Ultraschall (2 mal 10 Pulse, *Duty cycle*: 40%, *Output control*: 4) aufgebrochen. Nach dem Klären der Lysate (14000 Upm, 15 min, 4°C) wurde die Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry durchgeführt. Die Lysate wurden bei -80°C gelagert.

2.2.14.6 Herstellung von fraktionierten Zellextrakten

Mit dieser Methode können zytosolische Extrakte, Kern- und Membranextrakten aus einer Probe aufbereitet werden. Es handelt sich hierbei nur um eine Anreicherung der Fraktionen und nicht um reine Extrakte. Die Zellen wurden, wie unter 2.2.14.1 beschrieben, geerntet, je nach Größe des Pellets in 100-500 µl Fraktionierungspuffer A (10 mM Hepes-KOH [pH 7,4], 0,1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM Saccharose, 0,5 mM PMSF, 10 mM DDT, 1 µM Na₃VO₄, Complete™) resuspendiert und in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend wurde der Puffer in einem 37°C warmen Heizblock getaut und 5 sec gevortext. Durch dreimaliges Wiederholen des Vorgangs von Einfrieren und Tauen wurde die Zellmembran zerstört ohne die Kernmembran zu beeinträchtigen. Durch Zentrifugieren (700 g, 10 min, 4°C) wurden die Zellkerne und Membranfragmente pelletiert (Pellet I). Der Überstand (Zytosol) wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (14000 Upm, 15 min, 4°C) geklärt. Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford. Das Pellet I wurde je nach Größe mit 100-250 µl Fraktionierungspuffer C (20 mM Tris-HCl [pH 8,5], 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 0,5 mM PMSF, 10 mM DDT, 1 µM Na₃VO₄, Complete™) resuspendiert und mittels Ultraschall (2 mal 10 Pulse, *Duty cycle*: 40%, *Output control*: 4) aufgebrochen. Durch Zentrifugation (14000 Upm, 15 min, 4°C) wurden die Kernproteine (Überstand) von der Membranfraktion (Pellet II) getrennt. Proteinbestimmung der Kernextrakte erfolgte nach der Methode von Bradford. Das Pellet II wurde je nach Größe mit 50-100 µl Fraktionierungspuffer B (Fraktionierungspuffer C mit 1% Triton X-100) durch gründliches Resuspendieren gelöst. Proteinbestimmung der Membranfraktion erfolgte nach der Methode von Lowry. Alle Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

2.2.14.7 Herstellung von reinen mitochondrialen und zytosolischen Extrakten

Fünf Zellkulturschalen (10 cm) mussten für jede Probe vorbereitet werden. Die Zellen wurden, wie unter 2.2.14.1 beschrieben, geerntet und zusätzlich noch einmal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 600 µl Lysepuffer M (20 mM Hepes-KCl [pH 7,5], 20 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM Saccharose, 0,5 mM PMSF, 10 mM DDT, 1 µM Na₃VO₄, Complete™) resuspendiert und 5 bis 10 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 Upm, 15 min, 4°C) wurde der Überstand (zytosolische Fraktion) in einer Ultrazentrifuge bei 100000 g für 1 h bei 4°C ein zweites Mal geklärt. Die Proteinbestimmung des zytosolischen Extrakts erfolgte nach der Methode von Bradford. Das Zellpellet aus dem ersten Zentrifugationsschritt wurde in 250 µl Lysepuffer M resuspendiert und mittels Ultraschall (2 mal 10 Pulse, *Duty cycle*: 40%, *Output control*: 4) aufgebrochen. Durch Zentrifugation (14000 Upm, 15 min, 4°C) wurde der mitochondriale Extrakt geklärt. Die Proteinbestimmung des mitochondrialen Extrakts erfolgte mit der Methode nach Bradford. Die Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

2.2.14.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte wie beschrieben (Laemmli 1970). Es wurden denaturierende Polyacrylamidtrenngelle mit einem Polyacrylamidanteil von 5%, 7,5%, 10%, 12% oder 15% verwendet. Das Trenngel wurde zwischen Glasplatten (Bio-Rad, München) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisation war nach ca. 30 min abgeschlossen. Nach Entfernen des Isopropanols wurde ein Sammelgel (4% Polyacrylamidanteil) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Aussparung von Ladetaschen eingebracht. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit SDS-Lufpuffer ausgespült. Die aufzutragenden Proben wurden wie folgt behandelt. Pro Spur wurden 15-50 µg Protein mit

Material und Methoden

1/4 Vol Ladepuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 130 V.

2.2.14.9 Western-Blot-Transfer

Nach der Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Polyacrylamidgel wurde zuerst in Protein Transfer Puffer überführt und auf eine in Puffer getränkte Nitrozellulosemembran gelegt. Ober- und Unterseite wurden mit einem puffergetränkten Schwamm und je einer Doppellage in Puffer getränkten Whatman-Papier umschlossen, in einem Gelhalter fixiert und vertikal in eine mit Protein Transfer Puffer gefüllte Transferkammer (Bio-Rad, München) gegeben, so dass der Nitrozellulosefilter zur Anode hin orientiert war. Die Überführung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 320 mA für eine Stunde (Mini Trans Blot Cell), bei 300 mA für drei Stunden oder bei 100 mA über Nacht (Trans Blot Cell). Nach Beendigung des Transfers erfolgte eine Überprüfung der Beladung und der Proteinübertragung durch Färbung des Filters mit Ponceau's-Lösung. Anschließend wurde der Nitrozellulosefilter mit TBS-Tween20 (0,1%) gespült, um die Färbelösung abzuwaschen.

2.2.14.10 Detektion von Proteinen mittels Antikörper

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung wurde der Nitrozellulosefilter für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (TBS mit 5% Magermilchpulver und 0,1% Tween20) inkubiert. Der Filter wurde nun mit dem primären Antikörper (1:200 - 1:6000 in Blockierungslösung oder gegebenenfalls in TBS mit 5% BSA und 0,1% Tween20) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Filter 3x 10 min mit TBS-Tween20 gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Filter mit einem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:4000 in Blockierungslösung) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3x 10 min gewaschen. Das Chemolumineszenzsignal von gebundenen Antikörpern erfolgte mittels eines ECL-Kits und die Detektion mit „High performance chemiluminescence film“ (beide Amersham, Braunschweig). Um für eine weitere Inkubation die Antikörper von dem Filter abzuwaschen, wurde der Filter 2x 20 min in 100 mM Glycinlösung (pH 2,8) inkubiert, danach 1x 10 min in TBS-Tween20 gewaschen und 1 h in Blockierungslösung inkubiert.

2.2.15 Gelretardationsexperiment (EMSA)

2.2.15.1 Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden

Zur Herstellung der Fehlpaarungsoligonukleotide wurden 250 pmol G-oligo mit 250 pmol C-oligo oder 250 pmol T-oligo gemischt und auf 40 µl mit *A.bidest* aufgefüllt. Die Oligonukleotide wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Schwimmer platziert und in 1 l Wassers bei 80°C denaturiert. Die Proben blieben im Wasser, bis dieses sich auf 20°C abgekühlt hatte. In dieser Zeit erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotide. Zum Schluss wurden die Ansätze mit *A.bidest* auf 100 µl aufgefüllt. Um die Sonde radioaktiv zu markieren, wurden 1,4 µl (3,5 pmol) des Oligonukleotids mit 1 µl 10x Poly-Nucleotid-Kinase-Puffer, 3 µl $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP und 1 µl PNK (Polynukleotidkinase) gemischt und der Reaktionsansatz mit *A.bidest* auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 60 min erfolgte die Zugabe von 90 µl *A.bidest*. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 250 µl abs. Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die DNA wurde für 30 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit 70%-igen Ethanol gewaschen, in 100 µl *A.bidest* gelöst und erneut mit 2,5 Vol abs. Ethanol gefällt. Nach einer Inkubation bei -20°C über Nacht wurde die DNA für 30 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl *A.bidest* gelöst.

2.2.15.2 Bereitung von Kernextrakten

Die Zellen wurden in 1 ml Lysispuffer 1 (10 mM Tris-HCl [pH 7,4], 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DDT, 2 mM PMSF) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl 10%-igem NP40 wurden die Zellmembranen durch eine fünfminütige Inkubation aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation bei 3200 Upm und 4°C für 5 min wurden die Zellkerne in 1 ml Lysispuffer I resuspendiert, um Reste des Zytoplasmas zu entfernen. Durch erneute Zentrifugation bei 3200 Upm und 4°C für 5 min wurden die Zellkerne sedimentiert, anschließend in 2 Vol hypotonem Kernextraktionspuffer (20 mM Hepes-KOH [pH 7,4], 0,6 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 10 mM DDT) und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 Upm bei 4°C. Der Überstand, welcher die gelösten Kernproteine enthält, wurde abgenommen, mit 1 Vol Kernextraktionspuffer ohne KCl verdünnt, auf 20% Glycerin eingestellt und bei -80°C eingefroren. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford.

2.2.15.3 EMSA-Reaktion

Die Bestimmung der Bindungsaktivität von Proteinen beruht auf einer Bindung des zu detektierenden Proteins an ein definiertes, radioaktiv markiertes Oligonukleotid. Hierzu wurden 3-6 µg des isolierten Kernextraktes (siehe 2.2.15.2) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 15 µl Reaktionsmix (10% Glycerin, 10 mM Hepes-KOH [pH.7,9], 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 4 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 0,005% BSA, 0,005% poly [dIdC]) gemischt. Anschließend wurden 25 fmol des radioaktiv markierten Oligonukleotids (siehe 2.2.15.1) zugegeben, der Ansatz mit *A.bidest* auf 20 µl aufgefüllt und für 30 min bei RT inkubiert.

2.2.15.4 EMSA- Elektrophorese

Bei den verwendeten Polyacrylamidgelen handelte es sich im Gegensatz zu der SDS-PAGE um native Gele. Die Gelkammer wurde nach dem Zusammenbau mit 1% „low-melting“-Agarose abgedichtet, ein 4%-iges Polyacrylamidgel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm zu Aussparung von Taschen eingesteckt. Nach der Polymerisierung des Gels wurde es in eine spezielle Kammer eingespannt und erneut mit Agarose abgedichtet. Das Gel wurde durch einen einstündigen Vorlauf bei 100 mV äquilibriert, als Laufpuffer diente hierbei 0,25%-iger TBE-Puffer. Die fertigen Proben wurden auf das Gel aufgetragen; der Gellauf erfolgte bei 100 mV, bis die Lauffront eines separat aufgetragenen Bromphenolblauamarkers ca. 1-2 cm vor dem Auslaufen war. Danach wurde das Gel abgebaut, bei +80° C und Unterdruck getrocknet und in einer Röntgenkassette mit Verstärkungsfilter mit einem Röntgenfilm belegt und über Nacht bei -80° C exponiert.

2.2.16 Bestimmung der Caspaseaktivität

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Caspasen-8, -9 und -3 erfolgte mit Hilfe des Colorimetric Caspase Activity Assays von R&D System: Es wurden jeweils 2 x10⁶ Zellen pro Probe ausgezählt und für 10 min zentrifugiert (1500 Upm, 4°C). Das Zellpellet einer Probe wurde in 50 µl Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für 5 min zentrifugiert (14000 Upm, 4°C), der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben (jeweils 50 µl) wurden auf einer Mikrotiterplatte auspipettiert und jeweils 50 µl 2x Reaktionspuffer (mit frisch zugegebenem 10 mM DTT) zugegeben. Anschließend wurden 5 µl des entsprechenden Caspasensubstrats mit dem Lysat gemischt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte bei 405 nm am Mikroplatten-Reader.

2.2.17 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde mittels CellTiter-Glo Lumineszenz Test (Promega, Mannheim) bestimmt und basiert auf Messung des ATPs in einer Probe. Durch Zugabe von Luziferase wurde durch das ATP und Sauerstoff ein Lichtsignal erzeugt und mittels Luminometer bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.18 Interstrand Crosslink-Komet-Test (ICL-Komet-Test)

2.2.18.1 Behandlung mit ICL-induzierenden Agenzien

Für diese Methode ist es zwingend notwendig, alle Proben gemeinsam aufzuarbeiten, um mögliche Schwankungen zwischen einzelnen Zeitpunkten innerhalb eines Versuchs auszuschließen. Bei einem Versuchsaufbau mit mehreren Messpunkten über die Zeit ist daher eine Behandlungsstrategie mit mehreren Behandlungszeitpunkten zwingend notwendig.

2.2.18.2 Ionisierende Bestrahlung

Ionisierende Strahlung wird in diesem Versuch als methodische Größe verwendet. Die DNA der Zellen wird durch die Strahlung gleichmäßig fragmentiert, was sich im Komet-Test in Mobilität der DNA niederschlägt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mittels Trypsin abgelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde verworfen, da tote Zellen nicht auswertbar sind. Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, erfolgte ein Zentrifugationsschritt (1000 Upm, 5 min, 4°C). Um eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml zu erreichen, wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge eiskaltem PBS resuspendiert. Um Reparaturprozesse zu vermeiden, mussten die Proben konsequent in Eiswasser gelagert werden. Die Proben wurden einheitlich mit 6 Gy bestrahlt.

2.2.18.3 Alkalische Einzelzellelektrophorese (Komet-Test)

Die Einzelzellelektrophorese unter alkalischen Bedingungen erlaubt die Detektion von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie von alkali-labilen Stellen (Singh et al. 1988; Klaude et al. 1996). Da die DNA unter den alkalischen Bedingungen in Einzelsträngen vorliegt, zeichnet sich ICL-verknüpfte DNA, in Verbindung mit der vorherigen Fragmentierung mittels IS, durch eine Abnahme an Mobilität aus. Hierzu wurden Objektträger mit Agarose (1,5% in PBS) beschichtet und ÜN getrocknet. 10 µl Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) wurde mit 120 µl LMP-Agarose (0,5% in *A.bidest*, 37°C) gemischt und auf dem beschichteten Objektträger aufgebracht. Um eine gleichmäßige Verteilung auf dem Objektträger zu gewährleisten, wurde direkt im Anschluss ein Deckglas (24 x 60 mm) darüber gelegt. Zum Erstarren der Agarose wurden die Objektträger 5 min bei 4°C gelagert. Nach Entfernen des Deckglases erfolgte die Zellyse in alkalischem Lysepuffer (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Na-Laurylsarcosinat, pH 10) bei 4°C für 1 h. Zu dem Lysepuffer wurde mindestens 1 h vor Gebrauch 1 ml Triton X-100 und 10 ml DMSO hinzu gegeben und bei 4°C vorgekühlt. Nach der Lyse erfolgte die Alkalidenaturierung für 25 min in Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) direkt in der Elektrophoresekammer. Die Elektrophorese erfolgte direkt im Anschluss für 25 min bei 300 mA (25 V). Zum Neutralisieren der Proben wurden die Objektträger 3x 5 min mit Neutralisationspuffer (0,4 M Tris-HCl, pH 7.5) überschichtet. Die Objektträger wurden anschließend mit destilliertem Wasser abgespült, 5 min in 100%-igem Ethanol fixiert und über Nacht getrocknet. Vor der Auswertung wurde 50 µl EtBr (20 µg/ml) auf den Objektträger gegeben, um die DNA anzufärben, und ein Deckglas (24 x 60 mm) aufgebracht. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer CCD-Kamera und der

Material und Methoden

Software Kinetic Imaging Komet 4.0.2. (BFI-Optilas, Puchheim). Pro Objektträger wurden 50 Zellen ausgewertet, indem das „*Olive Tail Moment*“ (OTM) bestimmt wurde. Das OTM ist als das Produkt der DNA-Menge im Komet-Schweif (%) und der Distanz zwischen dem Zentrum der Masse vom Komet-Kopf (Zellkern) und dem Ende des Komet-Schweifs definiert (Olive et al. 1991).

2.2.19 Messung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase Aktivität (MGMT-Test)

Das Prinzip beruht auf Übertragung von radioaktiv markierten Methylgruppen von Kalbsthymus-DNA auf das MGMT-Protein in einem zu untersuchenden Zellextrakt. Die Methylierung der DNA wurde zuvor durch Inkubation mit [³H]-Methyl-N-Nitrosoharnstoff erreicht. Die DNA wird anschließend durch Behandlung mit Trichloressigsäure (TCA) hydrolysiert und die zellulären Proteine ausgefällt. Die Radioaktivität, die von der DNA auf das MGMT-Protein übertragen wurde, ist ein Maß für die Methyltransferaseaktivität im Zellextrakt. Zur Aktivitätsmessung wurden 200 µg Gesamtprotein und 40 µl [³H]-markierte DNA (ca. 80000 cpm) in 200 µl Reaktionspuffer (70 mM Hepes-KOH [pH 7,8], 1 mM DDT, 5 mM EDTA) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 90 min bei 37°C erfolgte die Zugabe von 400 µl 13%-iger TCA und von 100 µg BSA. Durch das Aufkochen der Probe für 15 min bei 95°C wurde die DNA hydrolysiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis abgekühlt, wobei die Proteine gefällt wurden. Durch einen Zentrifugationsschritt (14000 Upm, 10 min, 4°C) wurden die Proteine sedimentiert, anschließend dreimal mit 400 µl 5%-iger TCA gewaschen und zum Abschluss in 300 µl 0,2 N NaOH hydrolysiert. Die gebundene Radioaktivität wurde nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler bestimmt. Die MGMT-Aktivität wurde in fmol/mg Gesamtprotein angegeben.

2.2.20 Immunhistochemie

2.2.20.1 Bereitung der Deckgläser und Zellkultur

Deckgläser (24 x 24 mm) wurden für 15 min mit Diethylether gereinigt und anschließend 5 min in 100%-igem Ethanol, 5 min in 70%-igem Ethanol und 5 min in *A.bidest* gewaschen. Damit sich Zellen auf der Oberfläche anheften können, wurden die Deckgläser für 20 min mit 1 M KCl aufgeraut und anschließend in 70%-igem Ethanol gelagert. In eine Zellkulturschale (6 cm) wurden je zwei Deckgläser (Doppelansatz) gelegt. Nachdem der Ethanol vollständig verdampft war, wurden Zellen in die Schalen ausgesät und entsprechend behandelt.

2.2.20.2 Markierung mit Antikörpern

Die Fixierung der Zellen erfolgte, nach einem Waschschrift mit PBS, in PBS mit 4% Formaldehydanteil für 15 min bei Raumtemperatur. Nach 3x 5 min Waschen mit PBS wurden die Zellen mit eiskaltem, reinen Methanol überschichtet und 20 min bei -20°C gelagert. Jedes Deckglas wurde nun in eine eigene Zellkulturschale (2 cm) überführt, sofort mit Blockmedium (PBS, 5% BSA, 0,3% Triton X-100) überschichtet und für 1 h inkubiert. Nach Entfernen des Blockmediums wurden 50 µl der Erstantikörperlösung (1:50 bis 1:1000 in PBS mit 0,3% Triton X-100) auf das Deckglas gegeben und in feuchter Atmosphäre über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgten zwei Waschschriffe mit PBS für 5 min, ein Waschschrift mit PBS-*high salt* (0,4 M NaCl) für 2 min und ein weiterer Waschschrift mit PBS (0,3% Triton X-100). Anschließend wurden 50 µl einer fluoreszenzgekoppelter Zweitantikörperlösung (1:500 in PBS, 0,3% Triton X-100) auf das Deckglas gebracht und für 90 min in Dunkelheit und bei Raumtemperatur inkubiert. Es

Material und Methoden

folgten zwei Waschschriffe mit PBS für 5 min, ein Waschschriff mit PBS-*high salt* (0,4 M NaCl) für 2 min und ein weiterer Waschschriff mit PBS (0,3% Triton X-100).

2.2.20.3 Kernfärbung mit DAPI

Um den Zellkern zu visualisieren, wurden die Zellen zusätzlich mit DAPI gefärbt. Die Zellen wurden dazu, im Anschluss an den letzten Waschschriff der Zweitantikörperfärbung, direkt mit 0,5 ml DAPI-Färbelösung (100 ng/ml DAPI, PBS, 0,1% Tween20) für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit PBS (0,1% Tween20).

2.2.20.4 Versiegelung der Proben und Dokumentation

Die Versiegelung der Proben erfolgte mit DABCO (1% DABCO, 90% Glycerin in PBS). Auf einen Objektträger wurde für die beiden Deckgläser der Doppelansätze je 15 µl DABCO-Lösung aufgebracht. Die Deckgläser wurden aus dem Waschpuffer des letzten Waschriffs genommen und mit der Seite, auf der sich die Zellen befanden, in die Lösung gelegt. Nach Abtupfen der überschüssigen Lösung wurden die Ränder der Deckgläser mit Nagellack versiegelt. Die Dokumentation der Zellen erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer Digitalkamera und der Software Cell A (Olympus, Hamburg). Das Auszählen von Foci wurde ebenfalls mit der Cell A-Software vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Grundparameter der untersuchten Zelllinien

Das verwendete Zellsystem besteht aus verschiedenen Melanomzelllinien. Zum einen aus den etablierten Zelllinien SK29 (Wolfel et al. 1989) und MeWo, sowie aus der von MeWo abgeleiteten Zelllinie MeWoF40 (Christmann et al. 2001). Die Zelllinien D03, D05 und D14 stammen aus metastasierenden Tumoren des malignen Melanoms aus Patienten in Australien (O'Rourke et al. 2003), die Zelllinie MZ7 aus einem metastasierenden Tumor eines Patienten aus Mainz (Deutschland) (Lennerz et al. 2005). Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Verdopplungszeit und das Grundniveau an Zelltod in Kultur gemessen (Tabelle 3-1). Für das Feststellen der Verdopplungszeit wurden Ansätze mit 1×10^5 Zellen ausgesät und vier Messpunkte im Abstand von 24 h ausgezählt. Aus vier Wiederholungen wurde die Verdopplungszeit ermittelt. Die Zellen der Linie MeWo verdoppelten sich alle 27 h und waren somit die am schnellst wachsenden Zellen im untersuchten Zellsystem. Die Zellen der Linie D03 verdoppelten sich mit 40 h am langsamsten. Die Zelllinien D05, D14, MZ7 und SK29 verdoppelten sich zwischen 32,4 h bis 34,8 h und wuchsen somit fast gleich schnell. Das Grundniveau an Zelltod in Kultur wurde durch Bestimmung der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zelllinien D05, MZ7 und SK29 hatten mit rund 5-6% das niedrigste Grundniveau und die Linie D03 mit 15,5% das höchste.

Tabelle 3-1: Verdopplungszeit und Grundniveau an Zelltod in Kultur im untersuchten Zellsystem

Zelllinien	Verdopplungszeit (h)	Grundniveau an Zelltod in Kultur (%)
D03	39,94	15,54 +/- 5,73
D05	32,36	5,34 +/- 1,48
D14	34,44	8,77 +/- 3,22
MeWo	27,01	6,67 +/- 2,68
SK29	33,54	5,21 +/- 0,71
MZ7	34,78	5,85 +/- 2,89

3.2 Untersuchung der alkylierungsinduzierten Zytotoxizität im untersuchten Zellsystem

3.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität nach Fotemustin- und Temozolomidbehandlung

Das chlorethylierende und ICL-bildende Nitrosoharnstoff-Derivat Fotemustin und das methylierende Imidazotetrazin-Derivat Temozolomid wirken zytotoxisch und werden als Mittel erster Wahl bei der Therapie des malignen Melanoms verwendet (Jacquillat et al. 1990; Bleehen et al. 1995; Middleton et al. 2000; Mornex et al. 2003). Um die Zytotoxizität dieser beiden Zytostatika auf das verwendete Zellsystem zu untersuchen, wurden die sechs Melanomzelllinien D03, D05, D14, MeWo, SK29 und MZ7 mit 32 μM Fotemustin oder 50 μM Temozolomid behandelt und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Die gewählte Dosis orientierte sich an Erfahrungen im Institut für Toxikologie, gewonnen an vergleichbaren Zellsystemen. Um den Einfluss des Reparaturproteins MGMT auszuschließen, wurde das Protein durch einstündige Vorinkubation der Zellen mit dem MGMT-Inhibitor O⁶BG depletiert. Die Bestimmung der Zytotoxizität wurde anhand der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie in Abbildung 3-1 gezeigt, führte die Behandlung mit beiden Agenzien, Fotemustin (Abb. 3-1 A) und Temozolomid (Abb. 3-1 B) zur Induktion von Zelltod.

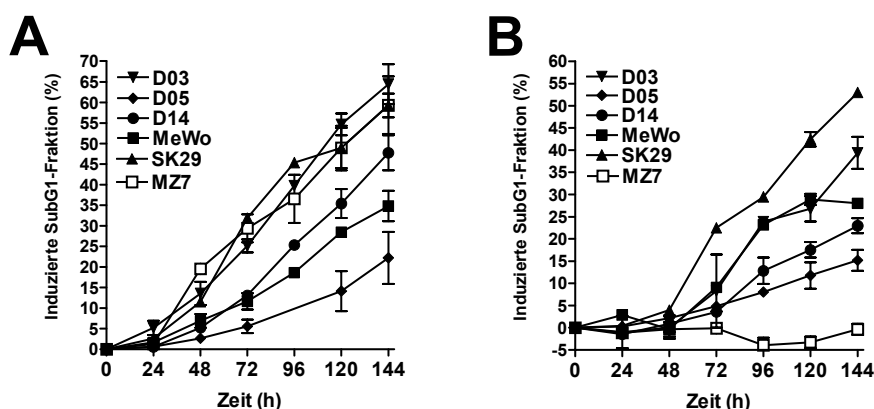


Abb. 3-1 Zytotoxizität nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung in fünf Melanom-Zelllinien
(A) Die Zelllinien D03, D05, D14, MeWo, SK29 und MZ7 wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Die Zytotoxizität wurde anhand der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. **(B)** Die fünf Zelllinien wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 50 μM Temozolomid inkubiert und wie unter (A) beschrieben ausgewertet.

Betrachtet man den Zelltod gemessen 144 h nach Behandlungsbeginn, so reagierten die Zelllinien D03 und SK29 auf beide Behandlungen mit einer hohen Zytotoxizität von 45 bis

Ergebnisse

60%. Die Zelllinie D14 reagierte sensitiv auf Fotemustinbehandlung (45% Zelltod), aber nur mäßig auf Gabe von Temozolomid (ca. 25% Zelltod). MeWo zeigte eine mäßige Zytotoxizität von 30% Zelltod nach Einwirkung beider Alkylantien, während die Zelllinie D05 auf beide Behandlungen am resistantesten reagierte (15-20% Zelltod). Ein Unterschied zwischen den beiden Agenzien bestand im Zeitpunkt der Zelltodinduktion. Während Zelltod in Fotemustin behandelten Zellen bereits 24 h nach Agensgabe zu beobachten war, war in den ersten zwei Tagen nach Temozolomidbehandlung in keiner der Zelllinien Zelltod zu detektieren. Ein zytotoxischer Effekt ist erst nach 72 h nach Temozolomidgabe zu beobachten. Beide Agenzien wirkten zytotoxisch auf das untersuchte Zellsystem, wobei Unterschiede in der Sensitivität der einzelnen Zelllinien zu beobachten waren. Die Zelllinie MZ7 zeigte im Vergleich zu den anderen fünf Zelllinien einen abweichenden Phänotyp. MZ7-Zellen reagierten mit einer hohen Zytotoxizitätsrate auf Fotemustin (ca. 60% Zelltod nach 144 h). Temozolomid vermochte in dieser Zelllinie allerdings überhaupt keinen Zelltod zu induzieren. Die Zelllinie MZ7 ist somit die einzige Linie des untersuchten Melanomzellsystems die nur auf eines der beiden Alkylantien sensitiv reagiert. Sie wurde daher eingehender untersucht (siehe 3.6).

3.2.2 Charakterisierung der alkylierungsinduzierten Zytotoxizität nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass das Zellsystem auf die verwendeten alkylierenden Agenzien mit Zytotoxizität reagiert, sollte untersucht werden, auf welchem Weg die Zellen sterben. Dazu wurden die fünf Zelllinien mit O⁶BG vorbehandelt und entweder mit 32 µM Fotemustin oder 50 µM Temozolomid für 144 h inkubiert. Um festzustellen, wie groß der jeweilige Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen in den Proben ist, wurden die Zellen mit Annexin V / Propidium Jodid doppelt gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Annexin V positive Zellen werden als rein apoptotisch definiert, während Annexin V / Propidium Jodid doppelt positive Zellen als nekrotisch bzw. spät apoptotisch beschrieben wurden (Vermes et al. 1995).

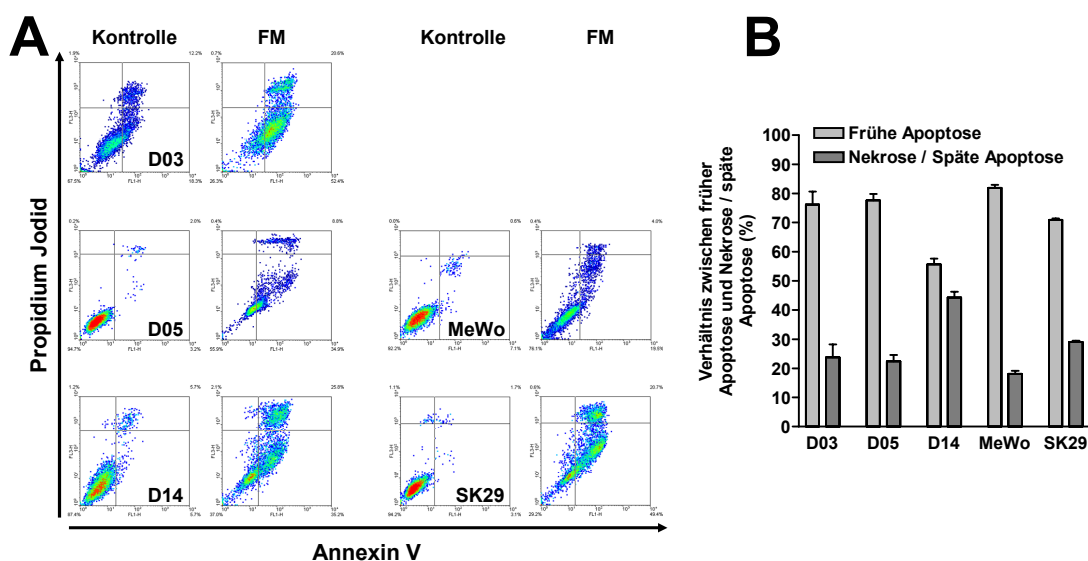


Abb. 3-2 Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz nach Fotemustinbehandlung

Die Zelllinien wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin für 144 h inkubiert. Die Zellen wurden für die Messung der Apoptose bzw. Nekrose mit Annexin V / Propidium Jodid gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Repräsentative „Density Plots“ für die fünf Melanom Zelllinien D03, D05, D14, MeWo und SK29. **(B)** Prozentuale Verteilung der apoptotischen gegenüber der nekrotischen Fraktion aus zwei unabhängigen Versuchen für alle fünf Zelllinien.

Für Fotemustin konnte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen für alle Zelllinien eine Zunahme der apoptotischen und nekrotischen Population beobachtet werden (Abb. 3-2 A). Für Abbildung 3-2 B wurde für jede Messung die apoptotische und nekrotische Population als 100% definiert und daraus der prozentuale Anteil für jede der beiden Populationen ermittelt. Dies wurde für zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Für alle Zelllinien konnte gezeigt werden, dass selbst nach einem sehr späten Nachbehandlungszeitpunkt der Anteil der apoptotischen Zellen überwog und dies zum Teil deutlich. Nur in der Zelllinie D14 überwog nach Fotemustingabe die apoptotischen Fraktion mit 60% nur knapp gegenüber der nekrotischen Fraktion mit 40%. Auch nach Temozolomidbehandlung zeigten alle fünf Zelllinien einen Anstieg in der apoptotischen und nekrotischen Population (Abb. 3-3 A). Das Auftragen der apoptotischen und nekrotischen Populationen nach prozentualen Anteilen zeigte, dass auch nach Temozolomidgabe die apoptotische Population in vier von fünf Zelllinien überwog (Abb. 3-3 B). Nach Temozolomidgabe lag D14-Zellen das Verhältnis zwischen apoptotischer und nekrotischer Fraktion in bei je 50%. Die Verhältnisse von apoptotischem und nekrotischem Anteil in jeder Zelllinie liegen, wenn man Fotemustin- und Temozolomidbehandlung vergleicht, auf ähnlichem Niveau. Für beide Agenzien scheint der Zelltod überwiegend durch Apoptose vermittelt zu werden.

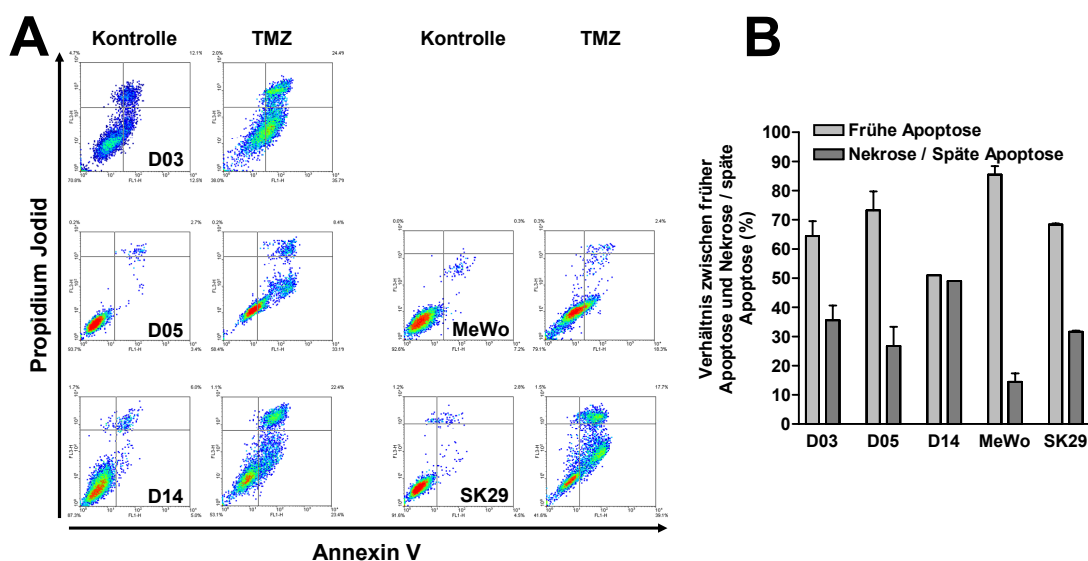


Abb. 3-3 Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz nach Temozolomidbehandlung

Die Zelllinien wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 50 μM Temozolomid für 144 h inkubiert. Die Zellen wurden für die Messung der Apoptose bzw. Nekrose mit Annexin V / Propidium Jodid gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Repräsentative „Density Plots“ für die fünf Melanom Zelllinien D03, D05, D14, MeWo und SK29. **(B)** Prozentuale Verteilung der apoptotischen gegenüber der nekrotischen Fraktion aus zwei unabhängigen Versuchen für alle fünf Zelllinien.

3.2.3 Untersuchungen der alkylierungsinduzierten Apoptose nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung

Um die Daten der Annexin V / Propidium Jodid-Messung zu bestätigen, wurden weitere Parameter des apoptotischen Zelltodes betrachtet. Als Indikator des apoptotischen Zelltodes sollte die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 untersucht werden, sowie die Spaltung von PARP-1, einem bekannten Substrat der Caspase-3 und Caspase-7 (Cohen 1997), sowie der Initiatorcaspase-9 (Duan et al. 1996). Caspaseaktivität wurde über die Detektion von Spaltprodukten der Caspasen nachgewiesen, die im Zuge ihrer Aktivierung entstehen. Dafür wurden Zellen der Linien D03, D05, D14, MeWo und SK29 mit 10 μM O⁶BG eine Stunde vorbehandelt und mit 32 μM Fotemustin inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten für Western-Blot-Analysen aufbereitet. Alle Ansätze wurden parallel durchgeführt und die Filme des Western-Blots unter identischen Bedingungen belichtet. Für die drei sensitiven Zelllinien D03, D14 und SK29 konnte in den ersten beiden Tagen nach Behandlung eine starke Anreicherung von Spaltprodukten der Caspase-3 und Caspase-7 detektiert werden (Abb. 3-4). Auch die Anreicherung des PARP-1 Spaltproduktes ist für diese drei Zelllinien nachzuweisen. Für die resistenteren Zelllinien D05 und MeWo konnten für die gewählten Expositionszeit des Films keine Spaltprodukte der Caspasen detektiert werden, wohl aber eine leichte Anreicherung des

Ergebnisse

PARP-1 Spaltproduktes ab 24 h nach Behandlung in der Zelllinie D05 und eine starke Anreicherung des PARP-1 Spaltproduktes 120 h nach Behandlung in der Zelllinie MeWo (Abb 3-4).

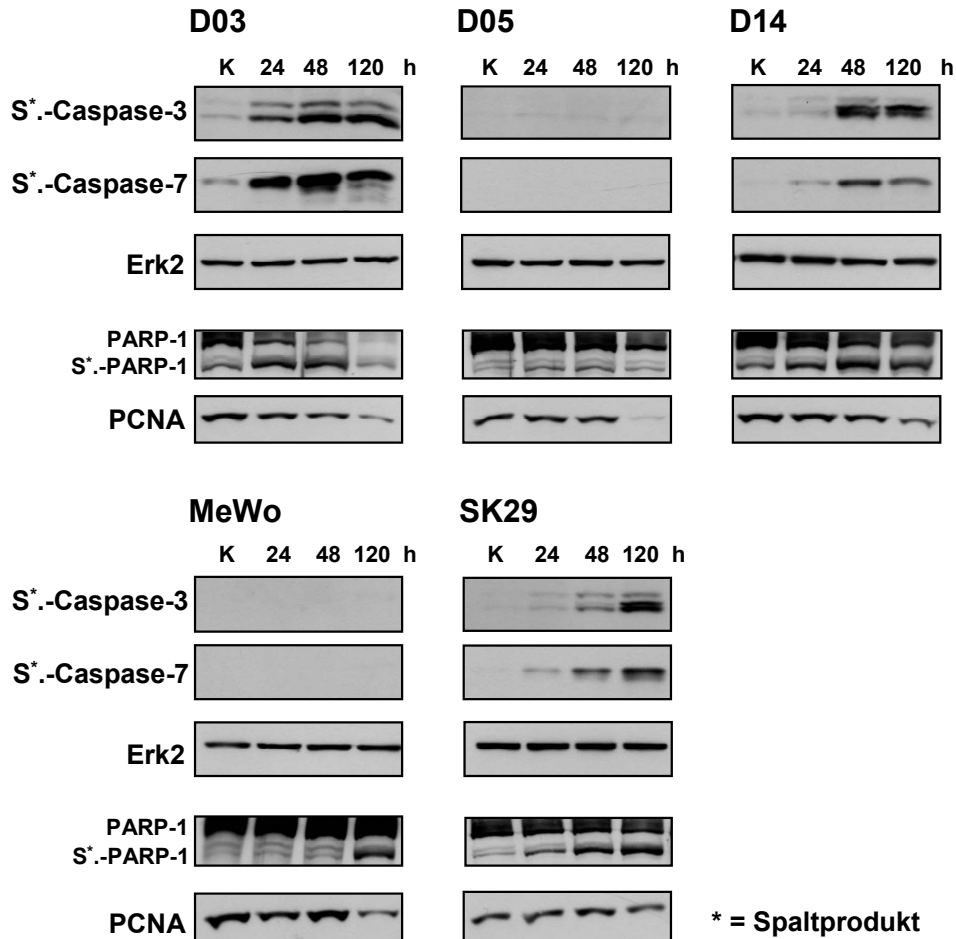


Abb. 3-4 Untersuchung der Caspasenaktivierung und PARP-1 Spaltung nach Fotemustinexposition
Die Zelllinien D03, D05, D14, MeWo und SK29 wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten zu zytosolischen Extrakten und Kernextrakten aufbereitet. Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Spaltprodukte der Caspase-3 (p17 und p19) und Caspase-7 (p20) in der zytosolischen Fraktion durch spezifische Antikörper detektiert. PARP-1 und dessen Spaltprodukt wurde in Kernextrakten mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrollen diente anti-Erk2 für zytosolische Extrakte und anti-PCNA für Kernextrakte.

Für die Untersuchung derselben Parameter nach Temozolomidbehandlung wurden die fünf Zelllinien mit 10 μM O⁶BG vorinkubiert und mit 100 μM Temozolomid behandelt. 120 h nach Behandlung wurden die Zellen für Western-Blot-Analyse aufbereitet und eingesetzt. Alle Ansätze wurden parallel durchgeführt und die Filme des Western-Blots gemeinsam belichtet. In Abbildung 3-5 war für die drei sensitiven Zelllinien D03, D14 und SK29 ebenfalls eine klare Anreicherung von Spaltprodukten der Caspase-3, Caspase-7 und PARP-1 zu detektieren. Temozolomidbehandlung führte auch in der Linie D05 zu einer leichten Spaltung von Caspase-3 und Caspase-7, sowie zur Spaltung von PARP-1. Für die

Ergebnisse

gewählte Expositionszeit konnte für die Linie MeWo kein Spaltprodukt der beiden Caspasen detektiert werden, auch eine PARP-1 Spaltung war nicht zu erkennen.

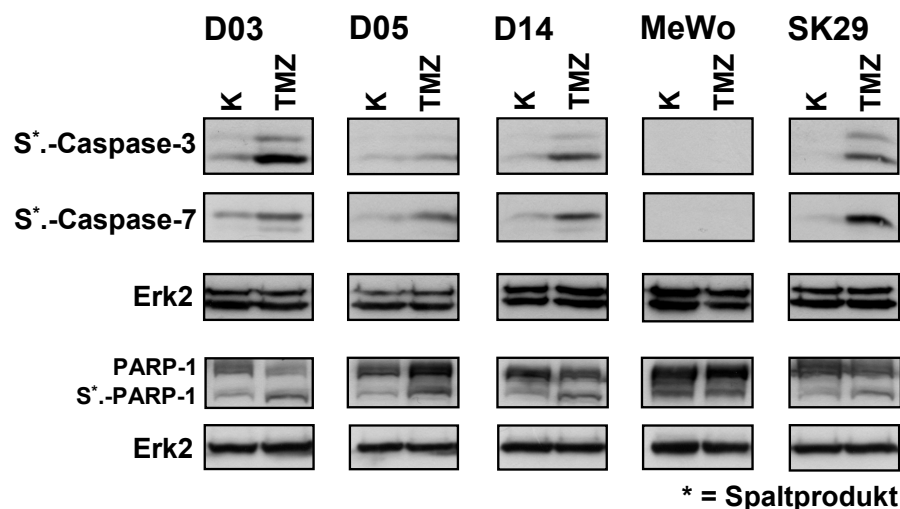


Abb. 3-5 Untersuchung der Caspasenaktivierung und PARP-1 Spaltung nach Temozolomidexposition
Die Zelllinien D03, D05, D14, MeWo und SK29 wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 100 μM Temozolomid behandelt und 120 h nach Behandlung zu zytosolischen Extrakten und Kernextrakten aufbereitet. Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Spaltprodukte der Caspase-3 (p17 und p19) und Caspase-7 (p20) in der zytosolischen Fraktion durch spezifische Antikörper detektiert. PARP-1 und dessen Spaltprodukt wurde in Kernextrakten mittels spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente anti-Erk2.

3.3 Bedeutung der Alkylierungen an der Position O⁶ der Base Guanin für die Apoptoseinduktion durch Fotemustin und Temozolomid

Beide Agenzien, Fotemustin und Temozolomid, alkylieren die DNA. Die von der Stoffklasse der CENU-Derivate (zu dem Fotemustin gehört) verursachten Chlorethylierungen in der DNA erfolgen in ca. 2-5% an der O⁶ Position des Guanins (Inga et al. 1999). In einer zweiten, unabhängigen Reaktion bildet sich aus diesem O⁶ClEtG ein G-C Interstrand Crosslink (Tong et al. 1982; Ludlum 1990). Temozolomid methyliert die O⁶ Position des Guanins mit einem Anteil von ca. 5% der verursachten DNA-Methylierungen (Newlands et al. 1997). O⁶-Alkylguanine sind als hoch toxische Läsionen beschrieben. Sie werden spezifisch von dem Reparaturenzym MGMT entfernt (Kaina et al. 2004). Im folgenden Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, welche Bedeutung die Alkylierungen des O⁶-Guanins für die Zytotoxizität nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung im untersuchten Zellsystem besitzt und welche Rolle MGMT in diesem Zusammenhang als Resistenzfaktor einnimmt.

3.3.1 Bestimmung der MGMT-Enzymaktivität im untersuchten Zellsystem

Mit Hilfe des MGMT-Tests wurde für die Zelllinien D03, D05, D14, MZ7 und SK29 die Aktivität des MGMT-Reparaturproteins ermittelt. Die Daten für die Zelllinien MeWo und MeWoF40 stammen aus bereits durchgeführten Versuchen im Institut. MeWoF40 wurde durch chronische Behandlung mit Fotemustin aus der Zelllinie MeWo gewonnen und verfügt über eine überdurchschnittlich hohe MGMT-Aktivität (Christmann et al. 2001). Die MGMT-Aktivität liegt bei fünf von sieben Zelllinien zwischen 0 und 12 fmol/mg Gesamtprotein (Abb. 3-6). Die Zelllinie D05 besitzt mit 120 fmol/mg eine moderate MGMT-Aktivität und nur die Linie MeWoF40 verfügt mit über 1100 fmol/mg Protein über eine sehr hohe MGMT-Aktivität.

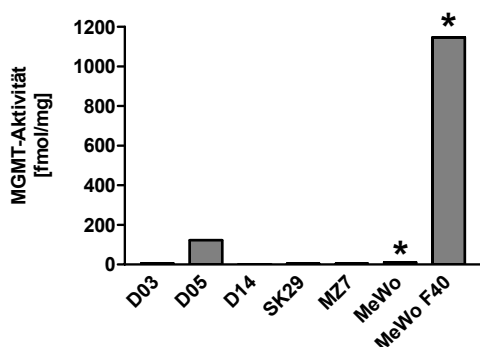


Abb. 3-6 MGMT-Aktivitätsbestimmung

Aus Zellen der Linien D03, D05, D14, MZ7 und SK29 wurden Gesamtzellextrakte bereitet und mit radioaktiv markierter, methylierter DNA inkubiert. Die MGMT-Aktivität wurde aus dem Anteil des radioaktiv markierten Proteins pro mg Gesamtprotein ermittelt. Durch * gekennzeichnete Messungen stammen aus bereits publizierten Daten von Prof. Kaina (Christmann et al. 2001).

3.3.2 Einfluss von MGMT auf die Apoptoseinduktion durch Fotemustin und Temozolomid

Um zu untersuchen, ob MGMT fähig ist, die zytotoxischen Effekte von Fotemustin und Temozolomid zu beeinflussen, wurden MGMT positive Zellen mit dem MGMT-Inhibitor O⁶BG behandelt. O⁶BG ist ein Pseudosubstrat für MGMT, indem es dem Enzym eine geeignete Benzylgruppe anbietet. Durch Übertragung selbiger wird das MGMT-Enzym inaktiviert und depletiert. Es wurden Versuchsreihen von MeWoF40-Zellen mit 10 µM O⁶BG inkubiert und mit Versuchsreihen ohne O⁶BG-Inkubation (Lösungsmittelkontrollen) verglichen. Eine Stunde später wurden die Zellen mit 32 µM Fotemustin oder 50 µM Temozolomid behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten durch Messung der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometrie ausgewertet (Abb. 3-7 A). Die Behandlung mit Fotemustin oder Temozolomid allein führte bis 144 h nach Behandlung zu keiner messbaren Induktion von Apoptose. Wurden die Zellen mit O⁶BG vorbehandelt,

Ergebnisse

konnte Apoptose induziert werden. Nach 144 h Inkubation lag die Apoptoserate nach Fotemustingabe bei ca. 30% und nach Temozolomidgabe bei ca. 20%. Dies ist ein Bereich, der vergleichbar ist mit der Apoptoseinduktion in der parentalen Zelllinie MeWo (siehe Abb. 3-1 A und B). Der gleiche Versuch wurde für die Zelllinie D05 durchgeführt, die nur ein Zehntel der MGMT-Aktivität von MeWoF40 besitzt und allgemein resistenter auf die beiden Alkylatien reagiert. In Gegensatz zu MeWoF40-Zellen war die Apoptoseinduktion in den Ansätzen ohne Inhibitor nach 96 h vergleichbar hoch, wie in den O⁶BG und Fotemustin behandelten Ansätzen, und lag bei ca. 15% Apoptose (Abb. 3-7 B). Erst die späten Zeitpunkte, nach 120 und 144 h zeigten einen weiteren Anstieg der Apoptose in den MGMT depletierten Zellen auf 25%, während die Apoptoserate in den ausschließlich mit Fotemustin behandelten Zellen sogar leicht abfiel. Die mit Temozolomid behandelten D05-Zellen verhielten sich dagegen vergleichbar zu den MeWoF40-Zellen (Abb. 3-7 C). Während die MGMT depletierten Zellen eine Apoptoseinduktion von über 15% nach 144 h Temozolomid zeigten, stagnierten die Zellen, deren MGMT-Protein nicht depletiert wurde, auf dem Apoptosebasisniveau von ca. 7%. Das endogen exprimierte MGMT ist somit in der Lage, im verwendeten Zellsystem die Zytotoxizität nach Fotemustin- und Temozolomidgabe zu reduzieren bzw. vollständig aufzuheben.

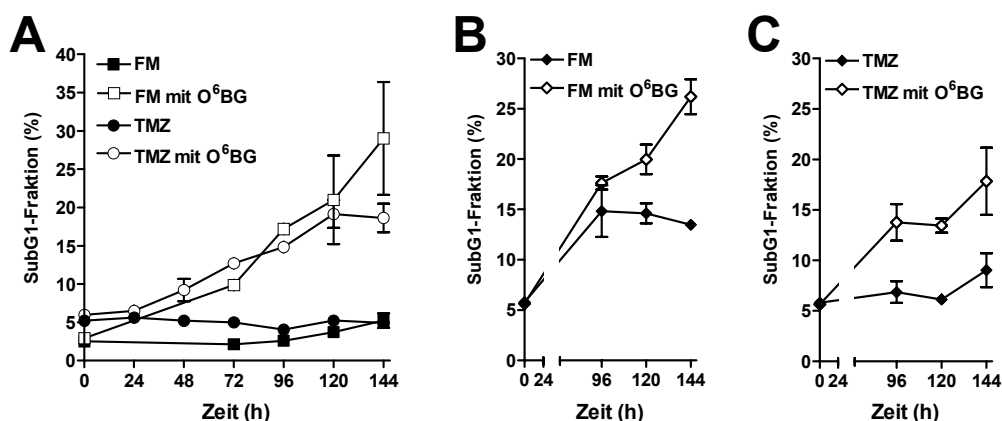


Abb. 3-7 Einfluss von MGMT auf die Apoptoserate

(A) Eine Versuchsreihe mit MeWoF40-Zellen wurde mit 10 μ M O⁶BG vorinkubiert, eine andere nicht. Die Zellen wurden nach Fotemustin- (32 μ M) oder Temozolomidbehandlung (50 μ M) zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet und die Apoptoserate durch Messung der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometer bestimmt. (B) D05-Zellen wurden mit O⁶BG vorinkubiert oder nicht und anschließend mit 32 μ M Fotemustin behandelt. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgt durch Messung der SubG1-Fraktion zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten. (C) D05-Zellen wurden mit O⁶BG vorinkubiert oder nicht und anschließend mit 50 μ M Temozolomid behandelt. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgt durch Messung der SubG1-Fraktion zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten. In allen drei Graphen repräsentieren die Werte den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen.

3.3.3 Reduktion der Zytotoxizität durch transiente Transfektion eines MGMT-Gen tragenden Vektors in einer MGMT negativen Zelllinie

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob in der MGMT negativen Zelllinie SK29 (MGMT-Expression unter 5 fmol/mg Protein) durch transiente Transfektion des MGMT-Gens eine Reduktion der Alkylanzinduzierten Apoptose erreicht werden kann. SK29-Zellen wurden mit dem Vektor *pSV2MGMT* (Kaina et al. 1991) transfiziert. Einen Tag später wurden diese Zellen für den Versuch neu ausgesät und wiederum 24 h später mit 32 μ M Fotemustin oder 50 μ M Temozolomid behandelt. Die Apoptoserate wurde 120 h nach Behandlung durch Messung der SubG1-Fraktion ermittelt. Als Transfektionskontrolle wurden Zellen zum Zeitpunkt der Alkylantienbehandlung gestoppt und mittels Western-Blot-Analyse auf MGMT-Expression untersucht. Wie Abbildung 3-8 A zeigt, konnte im Gegensatz zur untransfizierten Kontrolle zum Zeitpunkt der Alkylantiengabe eine deutliche MGMT-Expression detektiert werden. Eine signifikante Reduktion der Apoptoserate nach MGMT-Transfektion war im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollen für beide Agenzien nachweisbar (Abb. 3-8 B). Selbst transient exprimiertes MGMT ist in der Lage, Fotemustin und Temozolomid-vermittelte Apoptose signifikant zu senken.

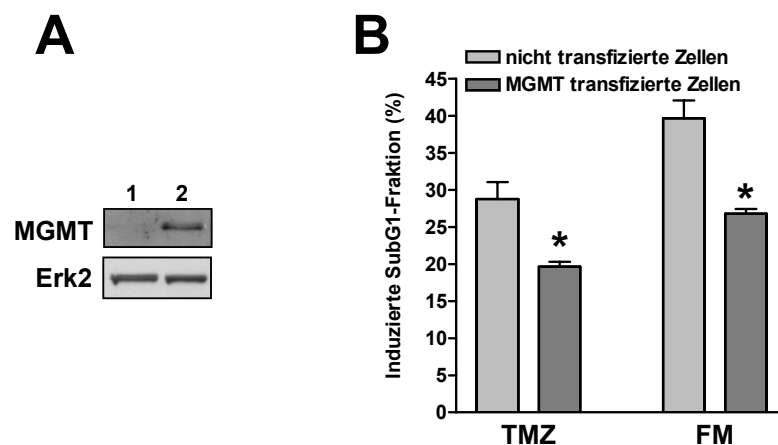


Abb. 3-8 Resistenzerwerb gegen Fotemustin und Temozolomid durch Transfektion des MGMT-Gens
(A) SK29-Zellen wurden für 48 h transient mit MGMT transfiziert. Gesamtzellextrakte wurden mittels Western-Blot-Analyse auf MGMT-Expression getestet. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle. Spur 1: untransfizierte Zellen; Spur 2: MGMT-transfizierte Zellen (B) SK29-Zellen wurden transient mit MGMT transfiziert und 48 h später mit 32 μ M Fotemustin oder 50 μ M Temozolomid behandelt. Die Bestimmung der SubG1-Fraktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Durch * gekennzeichnete Daten entsprechen einer Signifikanz von $P < 0,01$.

3.4 Rolle von γ H2AX als sekundärer Schadensmarker nach Alkylantienexposition

Die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 ist als gammaH2AX (γ H2AX) beschrieben. Die Modifikation an dieser Aminosäure tritt einerseits im Prozess der DNA-Replikation und andererseits nach DNA-Schäden auf. Gemeinhin ist die Bildung von γ H2AX als Marker für DSBs akzeptiert, auch wenn ihre Rolle in der letzten Zeit differenzierter diskutiert wird (Ismail and Hendzel 2008). Im Folgenden soll die γ H2AX-Induktion nach Fotemustin- oder Temozolomidexposition untersucht werden.

3.4.1 Untersuchungen zur γ H2AX-Induktion nach Fotemustinexposition

Um die Phosphorylierung von H2AX nach Fotemustingabe zu untersuchen, wurden Zellen der Linien D03, D05, D14, MeWo, MZ7 und SK29 mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten mittels Western-Blot-Analyse untersucht. In Abbildung 3-9 A ist gezeigt, dass Fotemustin γ H2AX induziert. 24 h nach Behandlung war in den sensitiven Zelllinien D03, D14 und SK29 eine starke Induktion zu detektieren. Bis 120 h nach Behandlung blieb das detektierte Signal konstant hoch. Die sensitiven MZ7-Zellen zeigten ein allgemein niedrigeres γ H2AX-Niveau. In MeWo-Zellen konnte in den ersten 48 h nach Gabe keine Induktion detektiert werden, erst 120 h nach Behandlung wurde ein deutliches Signal nachgewiesen. Die resistente Zelllinie D05 zeigte ein sehr viel geringeres Niveau an γ H2AX im Vergleich zu den anderen Linien. Im Weiteren wurde untersucht, ob γ H2AX-Induktion mit der Apoptoserate der Zelllinien korreliert. Die γ H2AX-Induktion wurde unter Berücksichtigung der Ladekontrolle für die Zeitpunkte 24, 48 und 120 h ermittelt und jeweils mit dem Mittelwert der induzierten Apoptoserate nach 120 h (siehe Abb. 3-1 A) mittels linearer Regression ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3-9 B). Für die frühen Zeitwerte, wie auch für den späten Wert nach 120 h Behandlung, war die Korrelationsanalyse nicht signifikant.

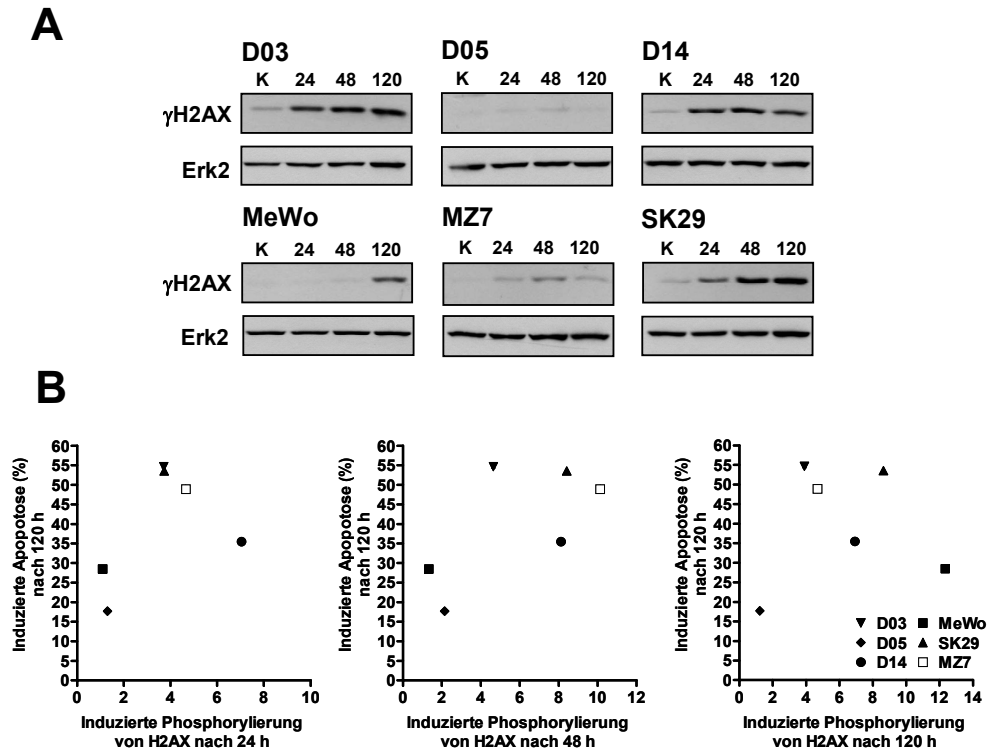


Abb. 3-9 γ H2AX-Induktion im Verhältnis zur Apoptoserate nach Fotemustinexposition

(A) Die Zelllinien D03, D05, D14, MeWo, MZ7 und SK29 wurden mit 10 μ M O⁶BG und mit 32 μ M Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten zu Kernextrakten aufbereitet. Mittels Western-Blot-Analyse wurden γ H2AX durch spezifische Antikörper detektiert. Als Ladekontrollen diente anti-Erk2. (B) Graphisch dargestelltes Verhältnis zwischen γ H2AX-Induktion nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten und dem Mittelwert der induzierten Apoptoserate nach 120 h Fotemustinbehandlung in sechs Melanomzelllinien (siehe Abb. 3-1 A). Die Induktion von γ H2AX wurde unter Berücksichtigung der Ladekontrollen ermittelt. Die Korrelationsanalysen waren nicht signifikant.

3.4.2 Untersuchungen zur γ H2AX-Induktion nach Temozolomidexposition

Um die Phosphorylierung von H2AX nach Temozolomidgabe zu untersuchen, wurden Zellen der Linien D03, D05, D14, MeWo, MZ7 und SK29 mit 10 μ M O⁶BG und 50 μ M Temozolomid behandelt und nach 120 h Inkubation mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 3-10 A). Nach Temozolomidinkubation wurde in den sensitiven Zelllinien D03, D14 und SK29 eine starke γ H2AX-Induktion detektiert. In den Zelllinien D05 und MeWo, sowie in der Mismatch-Reparatur defizienten Linie MZ7 (siehe 3.6) konnte keine γ H2AX-Induktion detektiert werden. Im Weiteren wurde untersucht, ob γ H2AX-Induktion mit der Apoptoserate der Zelllinien korreliert. Die γ H2AX-Induktion wurde unter Berücksichtigung der Ladekontrolle ermittelt und mit dem Mittelwert der induzierten Apoptoserate 120 h nach Temozolomidgabe (siehe Abb. 3-1 B) mittels linearer Regression ins Verhältnis gesetzt. Die statistische Analyse ergab eine signifikante Korrelation (P = 0,035) (Abb. 3-10 B).

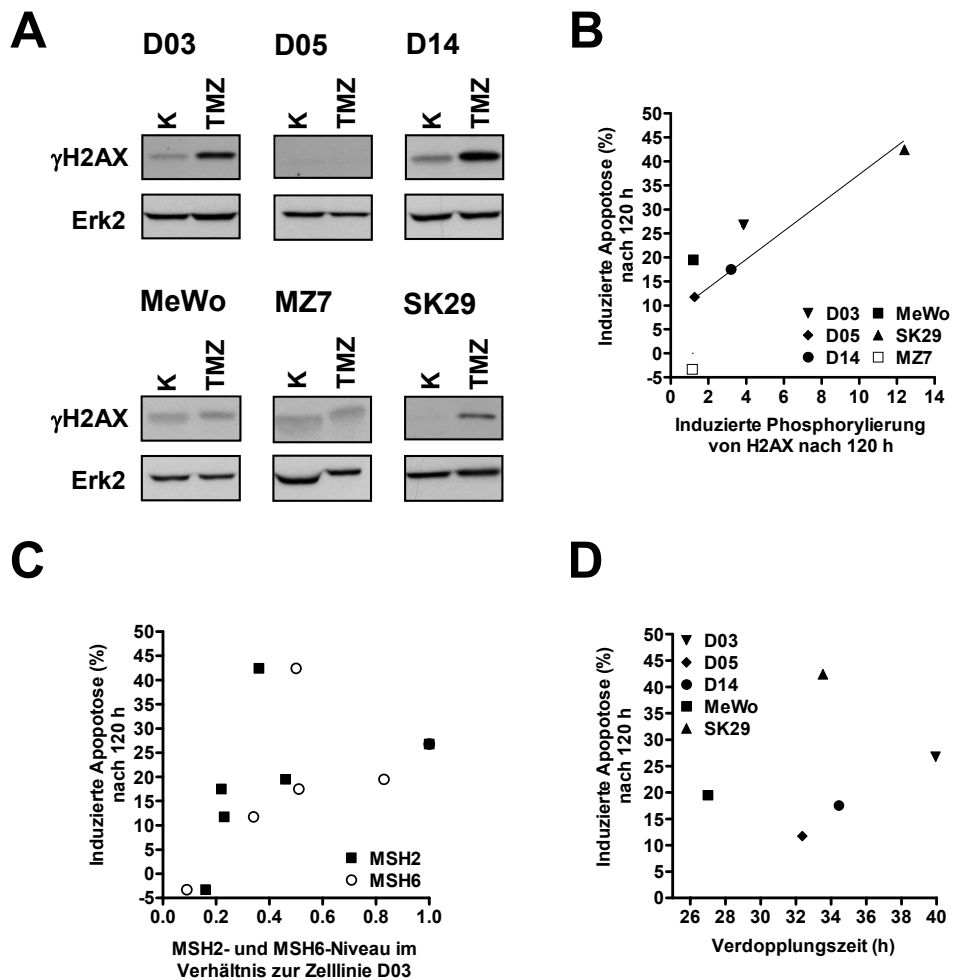


Abb. 3-10 γ H2AX-Induktion im Verhältnis zur Apoptoserate nach Temozolomidexposition

(A) Die Zelllinien D03, D05, D14, MeWo, MZ7 und SK29 wurden mit 10 μ M O⁶BG und mit 50 μ M Temozolomid behandelt, 120 h inkubiert und zu Kernextrakten aufbereitet. Mittels Western-Blot-Analyse wurden γ H2AX durch spezifische Antikörper detektiert. Als Ladekontrollen diente anti-Erk2. (B) Graphisch dargestelltes Verhältnis zwischen γ H2AX-Induktion und dem Mittelwert der induzierten Apoptoserate nach 120 h Temozolomidbehandlung (siehe Abb. 3-1 B). Die Induktion von γ H2AX wurde unter Berücksichtigung der Ladekontrollen ermittelt. Die Korrelationsanalyse war signifikant ($P = 0,035$). (C) Graphisch dargestelltes Verhältnis zwischen dem basalen MSH2- bzw. MSH6-Niveau (siehe Abb. 3-17) und dem Mittelwert der induzierten Apoptoserate nach 120 h Temozolomidbehandlung (siehe Abb. 3-1 B). Die Korrelationsanalyse war nicht signifikant. (D) Graphisch dargestelltes Verhältnis zwischen der Verdopplungszeit (siehe Tabelle 3-1) und dem Mittelwert der induzierten Apoptoserate nach 120 h Temozolomidbehandlung (siehe Abb. 3-1 B). Die Korrelationsanalyse war nicht signifikant.

Um zu untersuchen, ob MMR-Proteine MSH2 und MSH6 mit der Apoptoserate korrelieren, wurden die basalen Expressionsniveaus dieser beiden Proteine (siehe Abb. 3-17) und der Mittelwert der induzierten Apoptoserate 120 h nach Temozolomidgabe (siehe Abb. 3-1 B) mittels linearer Regression ins Verhältnis gesetzt. Die statistische Analyse ergab keine signifikante Korrelation (Abb. 3-10 C). Des weitern wurde die Verdopplungszeit (siehe Tabelle 3-1) und der Mittelwert der induzierten Apoptoserate 120 h nach Temozolomidgabe (siehe Abb. 3-1 B) mittels linearer Regression ins

Ergebnisse

Verhältnis gesetzt. Auch diese statistische Analyse ergab keine signifikante Korrelation (Abb. 3-10 D). Die Zelllinie MZ7 wurde hierfür ausgeklammert, weil durch das Defizit in der MMR dieser Zellen (siehe 3.6) keine Apoptoseinduktion und damit keine Abhängigkeit zur Verdopplungszeit bestehen kann.

3.5 Status des Tumorsuppressorproteins p53 im verwendeten Zellsystem

Das Tumorsuppressorgen *p53* weist in 50% aller menschlichen Tumore Mutationen auf, welche die Funktion des p53-Proteins beeinflussen (Vousden and Lu 2002). p53 ist damit das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren. Stabilisiert und aktiviert wird p53 durch DNA-Schäden und anderen Stress auslösenden Stimuli. p53 fungiert in erster Linie als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von Genen, die an Prozessen der Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind (Lavin and Gueven 2006). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob p53 im verwendeten Zellsystem als Wildtyp oder in mutierter bzw. degradierter Form vorliegt.

3.5.1 p53 Stabilisierung und Translokation nach DNA-Schäden

Die Funktion des p53-Proteins in den untersuchten Zelllinien wurde über die Anreicherung und über die Translokation des Proteins in den Zellkern bestimmt. Als Initiator diente UV-C Strahlung, welche DNA-Schäden in Form von Thymindimere verursacht und als klassischer „p53-Stabilisator“ beschrieben ist (Campbell et al. 1993). Es wurde ebenfalls untersucht, ob p53 nach Behandlung mit den Alkylantien Fotemustin und Temozolomid stabilisiert werden kann. Für die Zelllinie MeWo wurde bereits beschrieben, dass sie über eine mutierte Form des p53-Gens verfügt (Albino et al. 1994; Zolzer et al. 1995); die Linie wurde deshalb nicht untersucht. Die Zelllinien D03, D05, D14 und SK29 wurden mit UV-C Strahlung (30 J/m^2) behandelt und für 6 h inkubiert. Aus den Zellen wurden Kernextrakte gewonnen und mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich p53 untersucht (Abb. 3-11 A). Nur für die Zelllinie D05 konnte eine Anreicherung des p53-Proteins nach UV-C Bestrahlung nachgewiesen werden. Die Linie D14 zeigte in der unbehandelten Kontrolle eine deutliche p53-Expression, aber keine Anreicherung nach UV-C Bestrahlung. In den Zelllinien D03 und SK29 konnte keine p53-Expression detektiert werden. Für Behandlung mit Fotemustin ($32 \mu\text{M}$) oder Temozolomid ($100 \mu\text{M}$) wurden Ansätze der vier Zelllinien mit $10 \mu\text{M}$ O⁶BG eine Stunde vorinkubiert. Nach Zugabe der Alkylation wurden die mit Fotemustin behandelten Ansätze nach 24 und 48 h Inkubationszeit aufbereitet und die mit Temozolomid behandelten Ansätze nach 120 h

Ergebnisse

Inkubationszeit. Kernextrakte aus den behandelten und unbehandelten Proben wurden mittels Western-Blot-Analyse auf p53 untersucht. Die Abbildung 3-11 B zeigt, dass Fotemustin in der Zelllinie D05 ebenfalls p53 zu stabilisieren vermag. Im Gegensatz zu UV-C Behandlung wurde eine p53 Stabilisierung nach Fotemustingabe auch in der Zelllinie D14 nachgewiesen. In der Zelllinie D03 wurde keine p53-Expression detektiert. Die Zelllinie SK29 zeigte ein Signal, das aber ein Protein mit einem niedrigeren Molekulargewicht als p53 aufwies. Die Behandlung mit Temozolomid reicherte p53 in den vier Zelllinien nach dem selben Muster an wie nach Fotemustingabe (Abb. 3-11 C). Nur in der Zelllinie D05 wird p53 in der Form stabilisiert, wie es für p53-Wildtyp beschrieben ist. Es wird daraus geschlussfolgert, dass die Zelllinien D03 und SK29 p53 defizient sind. Die Daten zur Zelllinie D14 sind nicht eindeutig und erfordern deshalb weitergehende Untersuchungen.

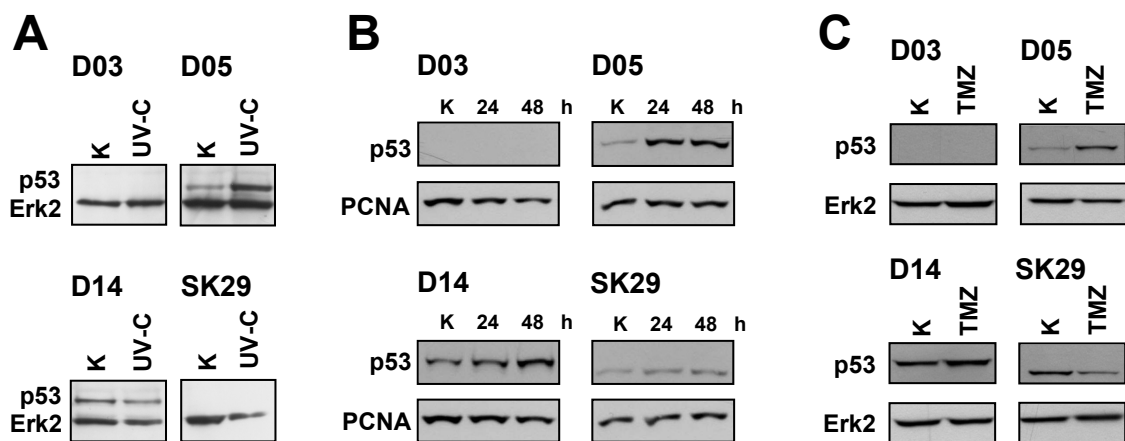


Abb. 3-11 Untersuchung des p53-Status in vier Melanomzelllinien

(A) Die Zelllinien D03, D05, D14 und SK29 wurden mit 30 J/m^2 behandelt und 6 h inkubiert. Es wurden Kernextrakte der Ansätze in einer Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion des Proteins erfolgte mittels Antikörper gegen p53. Der als Ladekontrolle verwendete Antikörper gegen Erk2 wurde zeitgleich mit dem p53-Antikörper inkubiert und detektiert. (B) Die Zelllinien D03, D05, D14 und SK29 wurden mit $10 \mu\text{M}$ O^6BG und mit $32 \mu\text{M}$ Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurden Kernextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion des Proteins erfolgte mit demselben p53-Antikörper. Anti-PCNA diente als Ladekontrolle. (C) Die Zelllinien D03, D05, D14 und SK29 wurden mit $10 \mu\text{M}$ O^6BG und mit $100 \mu\text{M}$ Temozolomid inkubiert und 120 h nach Behandlung geerntet. Es wurden Kernextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion des p53-Proteins erfolgte mit demselben Antikörper. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle.

3.5.2 Untersuchung der p53-Aktivierung in den Zelllinien D05 und D14

Um die Aktivierbarkeit von p53 in den Zelllinien D05 und D14 zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen die Position Serin 15 des p53-Proteins durchgeführt. Serin 15 wird DNA-schadensabhängig von den Proteinkinasen ATM und ATR phosphoryliert und trägt zur Stabilisierung von p53 bei

Ergebnisse

(Niida and Nakanishi 2006). Neben dem ICL-induzierenden Fotemustin wurden die Thymindimer-induzierende UV-C Strahlung und die DSB-induzierende ionisierende Strahlung zur DNA-Schädigung verwendet. Ansätze beider Zelllinien wurden mit O⁶BG (10 µM) und Fotemustin (32 µM) für 48 h, UV-C Strahlung (30 J/m²) für 6 h oder ionisierende Strahlung (10 Gy) für 6 h inkubiert und zu Gesamtzellextrakten aufbereitet. Wie in Abbildung 3-12 gezeigt, führen alle drei DNA-Schäden der Noxen in beiden Zelllinien zu einer Phosphorylierung des p53-Proteins am Serin 15. In der Zelllinie D05 wurde Serin 15 durch Fotemustin und UV-C stark phosphoryliert. Parallel wurde für die beiden Behandlungen eine deutliche Anreicherung des Gesamtproteins detektiert. Ionisierende Strahlung führte zu einem schwächeren Phosphorylierungsniveau des Serin 15 und nur zu einer minimalen Stabilisierung des Gesamtproteins. In der Zelllinie D14 führte Fotemustinbehandlung zum stärksten Phosphorylierungsniveau des Serin 15, parallel zu einer Stabilisierung des Gesamtproteins. Nach UV-C und ionisierender Strahlung wurde das Serin 15 ebenfalls deutlich phosphoryliert, es konnte aber keine Erhöhung im Gesamtproteinniveau beobachtet werden. p53 konnte in beiden Zelllinien DNA-schadensabhängig durch Phosphorylierung aktiviert werden.

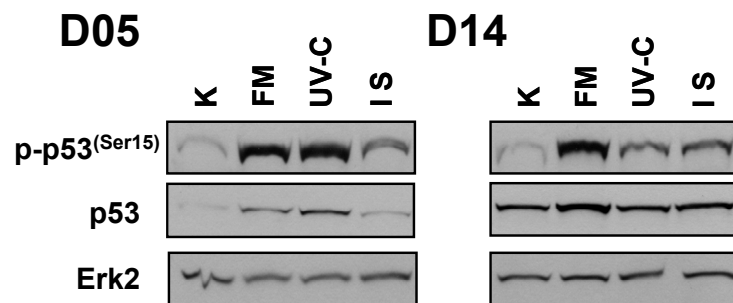


Abb. 3-12 Untersuchung der p53-Aktivierung in den Melanomzelllinien D05 und D14

D05- und D14-Zellen wurden mit 10 µM O⁶BG und 32 µM Fotemustin für 48 h, 30 J/m² UV-C Strahlung für 6 h oder 10 Gy Gammastrahlung für 6 h inkubiert. Es wurden Gesamtextrakte der Ansätze in einer Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen das Serin 15 von p53 und einem Antikörper gegen p53. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle.

3.5.3 Untersuchung der p53-regulierten Transkription in den Zelllinien D05 und D14

Um die für p53 beschriebene transkriptionelle Aktivität nach DNA-Schadensinduktion zu untersuchen, wurden D05- und D14-Zellen mit 10 µM O⁶BG vorinkubiert, mit Fotemustin (32 µM) oder Temozolomid (50 µM) behandelt und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Expression von

Ergebnisse

p21, einem klassischen über p53 transaktivierten Gen, untersucht (el-Deiry et al. 1993). In der Zelllinie D05 kann p21-Protein 24 h nach Fotemustingabe nachgewiesen werden (Abb. 3-13). Die Expression stieg für die nächsten beiden Nachbehandlungstage weiter an und blieb auch 120 h nach Behandlung stabil. 48 h nach Temozolomidgabe konnte p21 in D05-Zellen nicht nachgewiesen werden. 120 h nach Behandlung war dagegen eine deutliche p21-Expression zu beobachten. D14-Zellen zeigten weder nach Fotemustin- noch nach Temozolomidbehandlung eine p21-Expression. Nur in der Zelllinie D05 ist p53 nach DNA-Schadensinduktion transkriptionell aktiv. Das in D14-Zellen detektierte p53 scheint dagegen die Eigenschaft als Transkriptionsfaktors verloren zu haben.

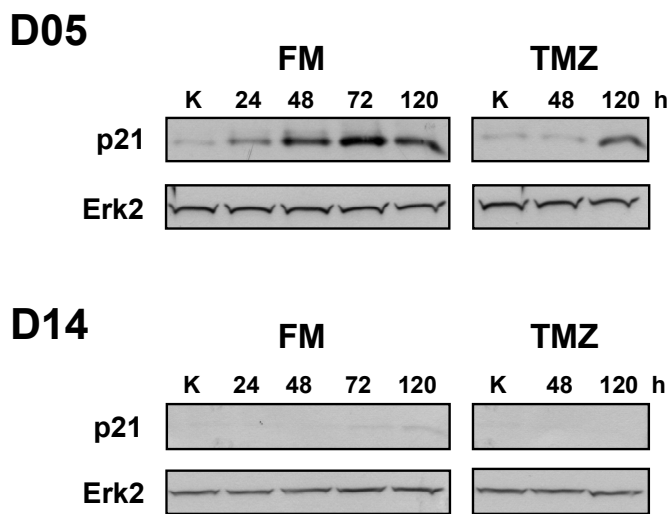


Abb. 3-13 Nachweis p53-abhängiger Transkription in den Melanomzelllinien D05 und D14

D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG vorbehandelt und entweder mit 32 μ M Fotemustin oder 50 μ M Temozolomid inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten gesammelt. Es wurden Gesamtextrakte der Ansätze in einer Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels eines p21-Antikörpers. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle.

3.5.4 Einfluss von p53 auf das Überleben nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung

Da das p53-Protein in der Regulation von Apoptose und DNA-Reparatur eine herausragende Stellung besitzt und eine wichtige Rolle für die alkylierungsinduzierte Apoptose spielt (Roos and Kaina 2006; Roos et al. 2007), sollte untersucht werden, ob eine siRNA-vermittelte Depletion des Proteins Einfluss auf die apoptotische Antwort im untersuchten Zellsystem ausübt. Mit der Zelllinie D05 standen p53-Wildtypprotein exprimierende Zellen zu Verfügung. p53 fördert Apoptose, neben den transkriptionsregulierenden Eigenschaften, auch durch transkriptionsunabhängige Prozesse u.a. durch seine Translokation zu den Mitochondrien (Murphy et al. 2004). Anhand des aktivierbaren aber transkriptionell inaktiven p53-Proteins in der Zelllinie D14, konnte die transkriptionell unabhängige Rolle für die Apoptoseinduktion in diesem Zellsystem untersucht werden. Im ersten Schritt der Untersuchung sollte eine geeignete Konzentration

Ergebnisse

an siRNA ermittelt werden. D05- und D14-Zellen wurden mit 5, 10 und 50 nM p53-siRNA transfiziert (Abb. 3-14 A). Um die Zunahme der Proteinmenge nach DNA-Schadensinduktion zu berücksichtigen, wurden für jede ausgetestete Konzentration zwei Ansätze ausgesät und einer der Ansätze 24 h nach siRNA Transfektion mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt. 48 h nach Fotemustingabe wurden Gesamtzellextrakte aus den Proben gewonnen und mittels Western-Blot-Analyse auf p53 und p21 untersucht. Die Zelllinie D05 zeigte in den untransfizierten Kontrollen eine Stabilisierung nach Fotemustinbehandlung. Erst die höchste Dosis von 50 nM siRNA führte zu einer deutlichen Herunterregulierung um 77% des stabilisierten p53-Proteins. Die Expression des über p53 transaktivierten Proteins p21 konnte durch die Konzentration von 50 nM p53-siRNA komplett unterdrückt werden. Die mutierte Form des p53 in der Zelllinie D14 konnte mit der verwendeten siRNA ebenfalls herunterreguliert werden. Auch hier war die Dosis von 50 nM siRNA in der Lage, das durch Fotemustin stabilisierte p53-Protein deutlich (83%) zu depletieren. Eine Expression von p21 war, wie bereits gezeigt, nicht zu beobachten.

Da eine Konzentration von 50 nM siRNA das p53-Protein auch nach Stabilisierung in beiden Zelllinien deutlich herunterregulieren konnte, und im Falle der Linie D05 auch die p53-abhängige Transkription effektiv hemmte, wurden alle weiteren Versuche mit dieser Konzentration durchgeführt. Um den Effekt nach Fotemustinbehandlung zu testen, wurden nicht transfizierte Zellen mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen sowie mit Zellen, welche mit der spezifischen p53-siRNA transfiziert wurden, verglichen. O⁶BG (10 μ M) und Fotemustinbehandlung (32 μ M) wurden 24 h nach Transfektion durchgeführt. Die Apoptoserate wurde 120 h nach Gabe des Alkylanz mittels Durchflusszytometrie durch Bestimmung der SubG1-Fraktion ermittelt (Abb. 3-14 B). Die Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigten etwas mehr Apoptose, als die untransfizierten Kontrollen. Die mit p53-siRNA transfizierten D05-Zellen waren etwas sensitiver als die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Diese Zunahme war jedoch nicht signifikant. Die Apoptoserate der p53-siRNA transfizierten D14-Zellen lag auf dem selben Niveau wie die untransfizierte Kontrolle. Parallel zu einer der Apoptosemessungen wurde ein Ansatz 96 h nach Transfektion bzw. 72 h nach Fotemustinbehandlung isoliert und auf Expression von p53, phosphoryliertem p53 an Position Serin 15, p21 und Bax überprüft (Abb. 3-14 C). In beiden Zelllinien wurde p53 nur in den Ansätzen mit spezifischer p53-siRNA herunterreguliert. Auch die aktivierende Phosphorylierung am Serin 15 konnte in diesen Ansätzen nicht mehr nachgewiesen werden. In D05-Zellen wurde in den Kontrollansätzen

Ergebnisse

nach Fotemustingabe deutlich mehr p21 exprimiert. Die p21 Expression war hingegen in den Ansätzen, die mit p53-siRNA transfiziert wurden, nicht mehr zu detektieren. Die selbe Beobachtung konnte auch für das p53 transaktivierte und proapoptotische Protein Bax gemacht werden. In D14-Zellen konnte keine p21 Expression und nur eine sehr geringe Expression von Bax beobachtet werden, die nicht durch die siRNA reguliert wurde. Weder transkriptionsfähiges Wildtyp p53 noch eine transkriptionell inaktive Form des Proteins scheinen einen protektiven oder sensibilisierenden Effekt auf das untersuchte Zellsystem nach Fotemustinbehandlung zu haben.

Um den Einfluss von p53 nach Temozolomidbehandlung zu untersuchen, wurde der Versuch unter gleichen Bedingungen durchgeführt und, statt mit Fotemustin, mit 50 μ M Temozolomid behandelt. Bei beiden Zelllinien wurden keine signifikanten Unterschiede auf die apoptotische Antwort, zwischen nicht transfizierten, Kontroll-siRNA und p53-siRNA transfizierten Ansätzen beobachtet (Abb. 3-14 D). Die Kontrollen mittels Western-Blot-Analyse zeigten auch hier für beide Zelllinien eine p53-Stabilisierung nach Behandlung, während in den mit p53-siRNA transfizierten Ansätzen kein p53-Protein detektierbar war. Dies traf auch auf die Detektion mit phosphospezifischen Antikörpern gegen die Position Serin 15 des p53-Proteins zu (Abb. 3-14 E). In D05-Zellen konnte 48 h nach Temozolomidgabe keine Zunahme der p21-Expression detektiert werden (siehe Abb. 3-13). Auch nach einer Inkubationszeit von 72 h, welche in dieser siRNA-Versuchsanordnung verwendet wurde, war keine Zunahme der p21-Expression zu beobachten. Das detektierte Grundniveau an p21 konnte allerdings durch p53-siRNA herunterreguliert werden (Abb. 3-14 E). Ein vergleichbares Muster war für das Protein Bax zu beobachten. Auch nach Temozolomidbehandlung wirkte p53 weder protektiv noch sensibilisierend.

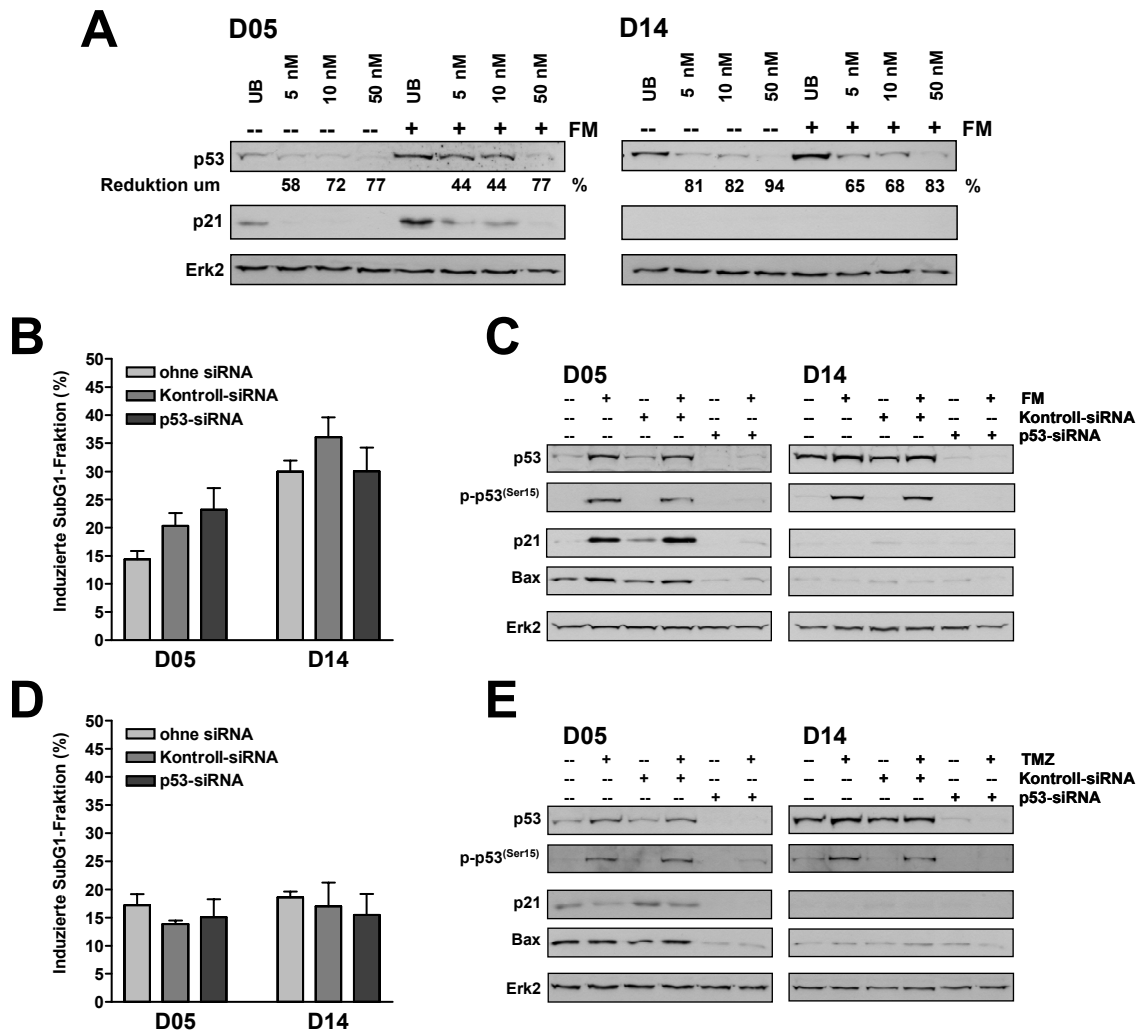


Abb. 3-14 Einfluss von p53 auf die apoptotische Antwort

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von p53-siRNA transfiziert und 24 h später mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fomestustin behandelt. Es wurden 72 h nach Transfektion Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels polyklonalen anti-p53 und anti-p21 Antikörper. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle. (B) D05- und D14-Zellen wurden nicht, mit 50 nM Kontroll-siRNA oder 50 nM p53-siRNA transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit 10 μ M O⁶BG und mit 32 μ M Fomestustin behandelt und für 120 h inkubiert. Die Bestimmung der SubG1-Fraktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie. (C) D05- und D14-Zellen wurden wie unter B beschrieben behandelt und nach 72 h Fomestustininkubation geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen p53, phospho-p53(Ser15), p21 und Bax. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle. (D) D05- und D14-Zellen wurden nicht, mit 50 nM Kontroll-siRNA oder 50 nM p53-siRNA transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit 10 μ M O⁶BG und mit 50 μ M Temozolomid behandelt und für 120 h inkubiert. Die Bestimmung der SubG1-Fraktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie. (E) D05- und D14-Zellen wurden wie unter D beschrieben behandelt und nach 72 h Temozolomidinkubation geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen p53, phospho-p53(Ser15), p21 und Bax. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle.

3.6 Untersuchung der Zelllinie MZ7

Wie unter 3.2.1 bereits beschrieben, zeigte die Zelllinie MZ7 im Vergleich zu den anderen Zelllinien einen abweichenden Phänotyp. Die Zelllinie MZ7 ist die einzige Linie des untersuchten Melanomzellsystems die gegenüber Temozolomid resistent reagierte, während sie auf Behandlung mit Fotemustin hoch sensitiv war. Gegenstand der vertiefenden Untersuchungen an dieser Zelllinie sollte die Aufklärung der spezifischen Resistenz gegenüber Temozolomid sein. Eine zusätzliche Information war über die Zelllinie MZ7 bekannt: Sie wurde aus einem Melanom von einem Patienten in Mainz (Deutschland) isoliert, welcher bereits mit dem Alkylanz Dacarbazin therapiert wurde. Dacarbazin gehört, wie Temozolomid, zu der Stoffgruppe der Imidazotetrazin-Derivate, welche Methylgruppen auf die DNA übertragen.

3.6.1 Zytotoxizität detektion in MZ7-Zellen nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung

Die in Abbildung 3-1 A und B dargestellten SubG1-Fraktionsmessungen der Zelllinie MZ7 nach Fotemustin- (32 μM) und Temozolomidbehandlung (50 μM) wurden in Abbildung 3-15 A noch einmal in einem Diagramm gegenübergestellt. MZ7-Zellen reagierten hoch sensitiv auf Fotemustin mit über 60% Zelltod nach 144 h. Temozolomid verursachte dagegen keine Induktion von Zelltod. Um zu untersuchen, ob der Fotemustin-vermittelte Zelltod über Apoptose erfolgt, wurden Zellen mit 32 μM Fotemustin oder 50 μM Temozolomid für 144 h inkubiert, Annexin V / Propidium Jodid doppelt gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 3-15 B). Die apoptotische Fraktion zeigte eine massive Zunahme um den Faktor 21 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, während die nekrotische Fraktion nur um den Faktor 2,5 zunahm. Auch mit dieser Methode konnte kaum Zelltod nach Temozolomidbehandlung detektiert werden (Anstieg der apoptotischen Fraktion von 3,7% auf 6,1% und Anstieg der nekrotischen Fraktion von 1,7% auf 5,6%). Caspase-3 Aktivierung wurde durch Detektion der Caspase-3 Spaltprodukte mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Wie in Abbildung 3-15 C gezeigt führte nur Fotemustinbehandlung zu einer klaren Anreicherung der Spaltprodukte ab 24 h nach Behandlung. 48 h nach Temozolomidgabe konnte kein Caspase-3 Spaltprodukt detektiert werden, 120 h nach Behandlung wurde eine schwache Bande detektiert. Der Fotemustin-vermittelte Zelltod wird in MZ7-Zellen, wie in den bisher untersuchten Melanomzelllinien, über Apoptose initiiert.

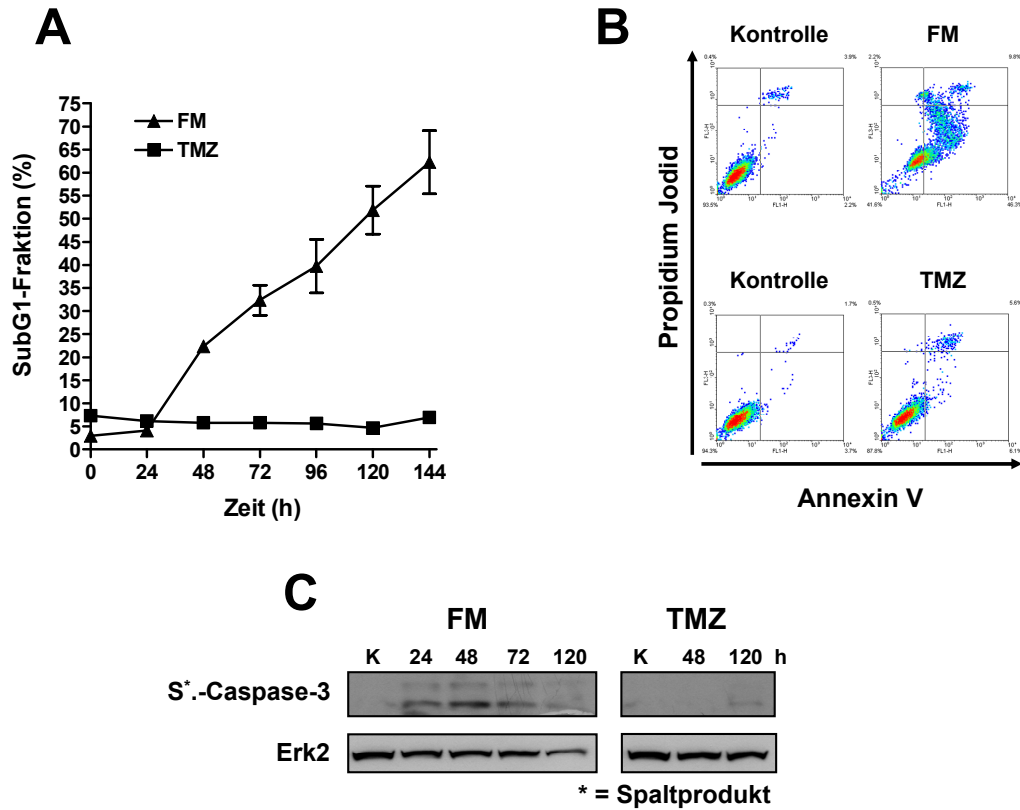


Abb. 3-15 Untersuchung der Zytotoxizität in MZ7-Zellen nach Fotemustin- und Temozolomidexposition

(A) MZ7-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin oder 50 μM Temozolomid inkubiert und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Die Bestimmung der SubG1-Fraktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie. (B) MZ7-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin für 144 h inkubiert. Die Zellen wurden Annexin V / Propidium Jodid gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (C) MZ7-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin oder 50 μM Temozolomid inkubiert und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und mittels Western-Blot-Analyse analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen das Spaltprodukt der Caspase-3 (p17 und p19). Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle.

3.6.2 Schadensdetektion in MZ7-Zellen nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung

Es ist bekannt, dass Temozolomid-vermittelter Zelltod über Mismatch-Reparatur und die daraus resultierenden DSB initiiert wird (Kaina et al. 2007). Als zellulärer Marker für DSBs wurde das γH2AX -Niveau nach Behandlung mittels Western-Blot-Analyse untersucht. MZ7-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin oder 50 μM Temozolomid behandelt. Es wurden zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten Gesamtzellextrakte isoliert (Abb 3-16 A). MZ7-Zellen reagierten auf den gesetzten DNA-Schaden nur nach Fotemustinbehandlung mit Phosphorylierung von H2AX. 24 h nach Fotemustingabe konnte bereits ein deutliches Phosphorylierungsniveau detektiert werden, welches 48 h nach Behandlung sein Maximum erreichte und noch nach 120 h nachweisbar

Ergebnisse

war. Im Gegensatz dazu führte der durch Temozolomid gesetzte Schaden in MZ7-Zellen nicht zu einer Induktion von γ H2AX. In den selben Extrakten wurde die Aktivierung der Proteinkinase ATM mittels Antikörper gegen phosphoryliertes Serin 1981 in diesem Protein untersucht (Abb. 3-16 B). ATM wird durch DSBs aktiviert und ist einer der übergeschalteten Kinasen, welche H2AX phosphorylieren. Auch aktive ATM-Kinase ist in MZ7-Zellen nur nach Fotemustin-, nicht aber nach Temozolomidbehandlung nachweisbar und verhält sich somit vergleichbar zu den γ H2AX Daten. Die Resistenz von MZ7-Zellen gegenüber Temozolomid manifestiert sich folglich auf der Ebene der DNA-Schadenserkennung und Prozessierung nach DNA-Methylierung.

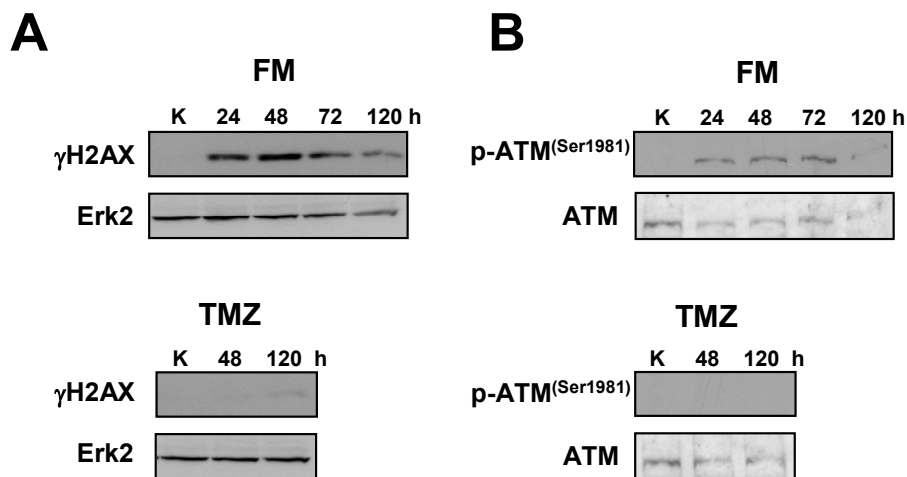


Abb. 3-16 γ H2AX-Bildung und ATM-Aktivierung in MZ7-Zellen nach Fotemustin- und Temozolomidexposition

MZ7-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin oder 50 μ M Temozolomid inkubiert und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und mittels Western-Blot-Analyse analysiert. (A) Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle. (B) Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes ATM und unphosphoryliertes ATM.

3.6.3 Basale Expression der Mismatch-Reparaturproteine MSH2 und MSH6

MSH2 und MSH6 bilden zusammen den MutS α -Komplex. Der MutS α -Komplex erkennt und bindet fehlgepaarte Basenpaare, aber auch die sekundär, durch Temozolomid vermittelte, O⁶MeG-T Fehlpaarung und initiiert dadurch Mismatch-Reparaturprozesse (Toorchen and Topal 1983; Duckett et al. 1996). Um die Basisexpression der Proteine MSH2 und MSH6 zu bestimmen, wurden für die Zelllinien D03, D05, D14, MeWo, MZ7 und SK29 jeweils 1,6 x 10⁵ Zellen in einer Western-Blot-Analyse eingesetzt (Abb. 3-17). Das MSH2-Protein ist in allen Zelllinien detektierbar. In der Zelllinie D03 wurde MSH2 am stärksten exprimiert, die schwächste Expression konnte in der Linie MZ7

Ergebnisse

nachgewiesen werden. Das Protein MSH6 konnte auch in allen Zelllinien detektiert werden. Die mit Abstand schwächste Expression wurde ebenfalls in der Linie MZ7 nachgewiesen. D03- und MeWo-Zellen besaßen die stärkste MSH6 Expression. MZ7 besitzt somit im untersuchten Zellsystem das niedrigste Expressionsniveau der MutS α -Komplexproteine MSH2 und MSH6.

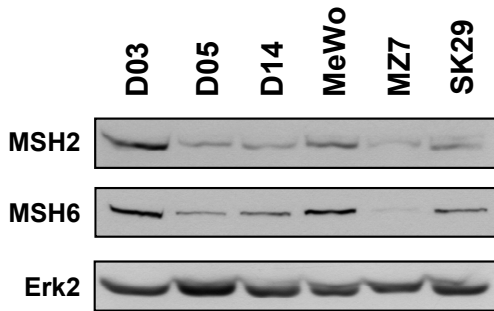


Abb. 3-17 Basale Expression der Proteine MSH2 und MSH6

Es wurden Gesamtzellextrakte aus $1,6 \times 10^5$ Zellen von sechs verschiedenen malignen Melanomzelllinien zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen MSH2 und MSH6. Als Ladekontrolle dienten Antikörper gegen Erk2.

3.6.4 Bindungsnachweis des MutS α -Komplexes an GT-Fehlpaarungen

Mittels eines auf der EMSA-Methode basierenden MutS α -Bindungstests wurde die Bindungsaktivität des MutS α -Komplexes der sieben Melanomzelllinien an ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit GT-Fehlpaarung untersucht (Abb. 3-18). Die ersten beiden Spuren zeigten eine Negativkontrolle, in der nicht fehlgepaarte GC-Oligonukleotide eingesetzt wurden und eine Positivkontrolle, mit GT-fehlgepaartem Oligonukleotid, durchgeführt mit MeWo-Zellextrakten. Während in der Negativkontrolle keine Bindungsaktivität detektiert werden kann, zeigte die Positivkontrolle eine deutliche Bande, die den Komplex aus Oligonukleotid und MutS α repräsentiert. In allen Zelllinien, bis auf die Zelllinie MZ7, konnte eine Bindung von MutS α an das GT-fehlgepaarte Oligonukleotid auf dieser Bandenhöhe nachgewiesen werden. Die Zelllinie MZ7 zeigte eine deutlich schwächere Bande in der entsprechenden Höhe und eine zweite, niedrigere Bande, die ausschließlich in MZ7-Zellen nachgewiesen werden konnte. MZ7-Zellen haben nicht nur eine geringere Expression der MutS α -Proteine, sondern auch ein gestörtes Bindungsverhalten des MutS α -Komplexes mit GT-Fehlpaarungen.

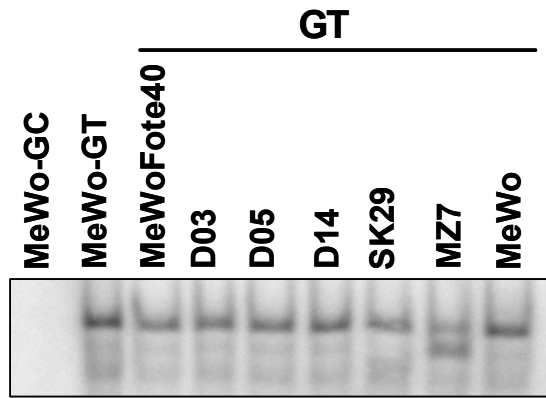


Abb. 3-18 Bindungseigenschaften des MutS α -Komplex an GT-Fehlpaarungen in sieben Melanomzelllinien

Je 4 μ g Kernextrakte der Zelllinien D03, D05, D14, MeWo, MZ7 und SK29 wurden mit spezifische radioaktiv markierten GT-Oligonukleotid inkubiert. Als Negativkontrolle dienten spezifisch radioaktiv markierte GC-Oligonukleotide, welche mit MeWo-Kernextrakten inkubiert wurden.

3.7 Zellzyklusverteilung, Zellzyklusblock und Replikationsabhängigkeit nach Fotemustinexposition

Für methylierende Alkylantien wurden die Auswirkungen auf den Zellzyklus (Hirose et al. 2001) und eine Replikationsabhängigkeit auf die Apoptoseinduktion (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007) schon weitgehend aufgeklärt. Weit weniger ist über die Replikationsabhängigkeit auf die Apoptoseinduktion nach Behandlung mit CENU-Derivaten bekannt. Mit diesen Experimenten soll die Einwirkung von Fotemustin an Melanomzellen auf den Zellzyklus, sowie die Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von DNA-Replikation untersucht werden.

3.7.1 Untersuchung des Zellwachstums nach Fotemustinexposition

Um die Auswirkungen von Fotemustin auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden für jeden Messpunkt $1,3 \times 10^5$ Zellen der Linien D05 oder D14 ausgesät und nach 24 h mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt. Die Zellzahl wurde in den folgenden vier Tagen im Abstand von 24 h bestimmt. Temozolomid wurde als Referenzagens verwendet. Die Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und 50 μ M Temozolomid behandelt. Die unbehandelten Kontrollen beider Linien wuchsen exponentiell. Nach Fotemustingabe konnte in beiden Zelllinien keine Zellvermehrung mehr beobachtet werden (Abb. 3-19). Die Zellzahl blieb konstant auf dem Niveau des Behandlungszeitpunkts. Die Zellen beider Linien, die mit Temozolomid behandelt wurden, vermehrten sich in den ersten 48 bis 72 h nach Behandlung, stagnierten aber in der darauf folgenden Nachbehandlungszeit (Abb. 3-19). Fotemustinbehandlung in einer Dosis von 32 μ M führt somit zu einem umfassenden Zellteilungsstopp in den behandelten Zellen.

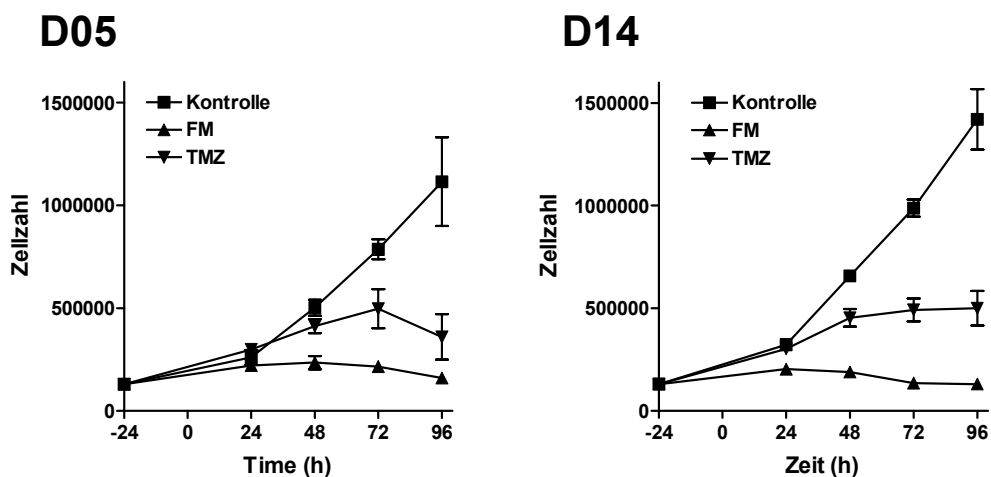


Abb. 3-19 Zellwachstum nach Fotemustin- und Temozolomidexposition

Es wurden $1,3 \times 10^5$ Zellen der Linien D05 oder D14 ausgesät und 24 h später mit $10 \mu\text{M}$ O^6BG und $32 \mu\text{M}$ Fotemustin oder $50 \mu\text{M}$ Temozolomid behandelt. Nach Alkylantien-gabe wurden in Abständen von 24 h die Zellzahlen bestimmt. Der Zeitpunkt -24 h markiert die Aussaat; der Zeitpunkt 0 h markiert die Alkylantien-behandlung.

3.7.2 Untersuchung der Zellzyklusverteilung nach Fotemustinbehandlung

Nachdem ein umfassender Zellteilungsstopp in Zellen nach Fotemustingabe zu beobachten war, wurde die Verteilung des Zellzyklus nach Behandlung untersucht. D05- und D14-Zellen wurden dazu mit $10 \mu\text{M}$ O^6BG und $32 \mu\text{M}$ Fotemustin inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Temozolomid wurde als Referenzagens verwendet. Die Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ O^6BG und $50 \mu\text{M}$ Temozolomid behandelt. Mit Fotemustin behandelte D05-Zellen verließen die G1-Phase, durchliefen die S-Phase und arretierten in der G2/M-Phase (Abb. 3-20 A). Dieser G2/M-Phaseblock konnte bis 144 h nach Behandlung detektiert werden. G1-Phasezellen konnten 96 h nach Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden. Ein transienter S-Phaseblock war nicht zu beobachten. Die mit Temozolomid behandelten D05-Zellen zeigten in den ersten beiden Nachbehandlungstagen keine Beeinträchtigung des Zellzyklus (Abb. 3-20 B). Ab 72 h nach Behandlung war eine Abnahme der G1-Phase zu beobachten, die mit einer Zunahme der S- und G2/M-Phase einherging. Im Gegensatz zu Fotemustin behandelten D05-Zellen konnten nach Temozolomidgabe bis zu 144 h nach Behandlung G1-Phasezellen detektiert werden. Auch die sensitiven D14-Zellen arretierten nach Fotemustingabe in der G2/M-Phase (Abb. 3-20 C). G1-Phasezellen konnten 72 h nach Behandlung nicht mehr detektiert werden. 24 sowie 48 h nach Behandlung zeigten D14-Zellen einen transienten S-Phaseblock. Im Gegensatz zu D05-Zellen bildeten D14-Zellen eine deutliche polyploide Fraktion nach Behandlung aus (Abb. 3-20 C). In Temozolomid

Ergebnisse

behandelten D14-Zellen wurde eine kontinuierliche Abnahme der G1-Phase und eine entsprechende Zunahme der G2/M-Phase beobachtet (Abb. 3-20 D). Im Gegensatz zur Fotemustinbehandlung wurde nach Temozolomidgabe auch bis 144 h nach Behandlung eine G1-Phasefraktion detektiert. Wie nach Fotemustinbehandlung wurde eine polyploide Fraktion ausgebildet. Fotemustin behandelte Zellen bilden einen starken, bis 144 h nach Behandlung detektierbaren, irreversiblen G2/M-Phaseblock aus.

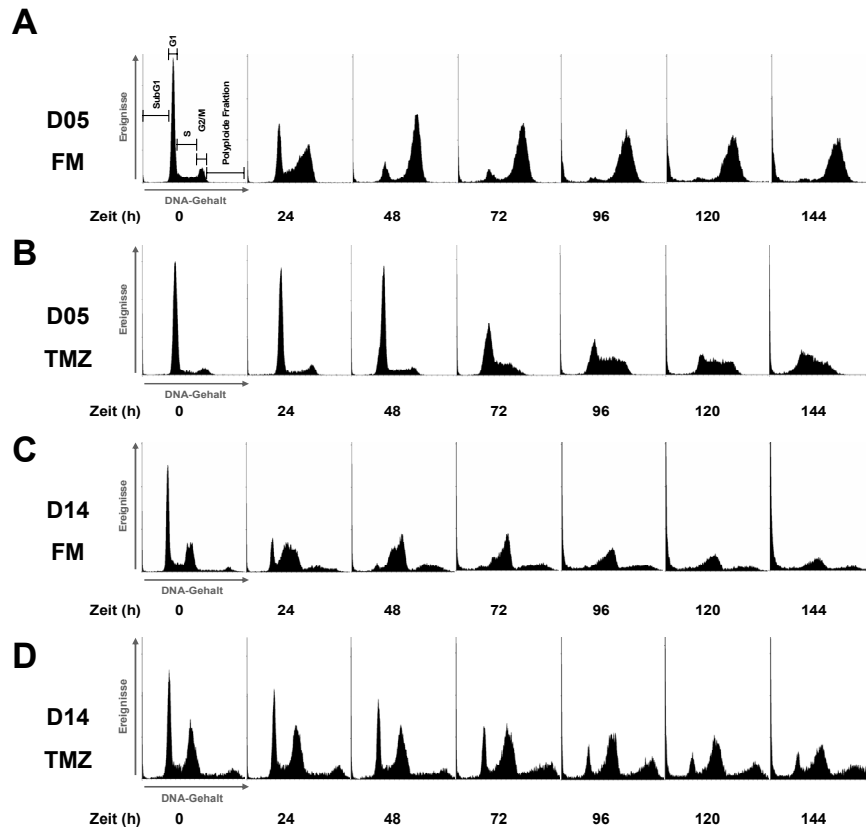


Abb. 3-20 Zellzyklusverteilung nach Alkylantienbehandlung

(A) D05-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten gestoppt. (B) D05-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 50 μM Temozolomid behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten gestoppt. (C) D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten gestoppt. (D) D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 50 μM Temozolomid behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten gestoppt. Die Analyse des Zellzyklus erfolgt mittels Durchflusszytometrie.

3.7.3 Untersuchung der Zellkernmorphologie im G2/M-Arrest

Um den G2/M-Phasenblock besser zu charakterisieren, wurde der Zellkern von D05- und D14-Zellen mittels DAPI angefärbt. Durch morphologische Studien des Zellkernes ist es möglich, Interphasezellen von mitotischen Zellen, bzw. von Zellen, welche eine mitotische Katastrophe unterlaufen, zu unterscheiden (Liao et al. 1995; Curry et al. 2007). Die Behandlung erfolgte mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin oder mit 10 μM O⁶BG und

Ergebnisse

50 μM Temozolomid für 96 h. In Abbildung 3-21 A wurden exemplarisch angefärbte Zellkerne beider Linien abgebildet. D05-Zellen zeigten nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung intakte, nicht mitotische Zellkerne. Auch die überwiegende Mehrheit der mit Fotemustin oder Temozolomid behandelten D14-Zellen zeigte Zellkerne mit einer für die Interphase typischen Morphologie. In D14-Zellen konnte allerdings nach Alkylantienbehandlung zusätzlich eine kleine Fraktion von Zellen mit Mikronuklei festgestellt werden, welche als mitotische Katastrophen zu werten sind (exemplarische gezeigt in Abb. 3-21 B).

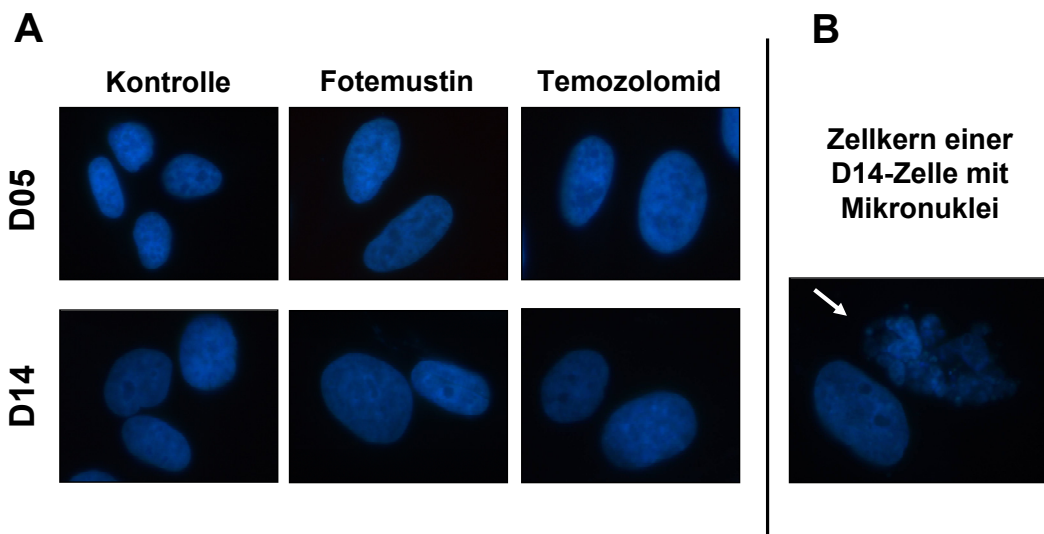


Abb. 3-21 Exemplarische Abbildung von DAPI gefärbten Zellkernen nach Alkylantienbehandlung
D05- und D14-Zellen wurden für 96 h mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin oder 50 μM Temozolomid behandelt und anschließend mittels DAPI gefärbt. (A) Exemplarisch abgebildete Zellkerne. (B) Exemplarisch abgebildeter Zellkern einer D14-Zelle mit Mikronuklei (Pfeil).

3.7.4 Fotemustin erzeugt einen G2/M-Phaseblock im Behandlungszyklus

Es konnte nachgewiesen werden, dass Zellen nach Behandlung mit einer toxischen Dosis Fotemustin von 32 μM kein Wachstum mehr zeigen. Dies konnte auf einer Akkumulation in der G2/M-Phase zurückgeführt werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Zellzyklusblock sich im Behandlungszyklus oder in nachfolgenden Zyklen manifestiert. Dazu wurde das Ausdünnen eines in der Membran eingelagerten Farbstoffes untersucht. Proliferation spiegelt das „Vererben“ des Farbstoffs einer Mutterzelle auf die Tochterzellen im Verhältnis 1:1 wieder. Konfluente D05- und D14-Zellen wurden mit dem Membranfarbstoff PKH26 in einer Endkonzentration von 2×10^6 M markiert. Die Behandlung mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin erfolgte am nächsten Tag. Nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie

Ergebnisse

analysiert. Temozolomid wurde als Referenzagens verwendet. Die Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 50 μM Temozolomid behandelt. Die unbehandelten Ansätze beider Zelllinien zeigten eine kontinuierliche Abnahme der Farbintensität in der Zellpopulation über die Zeit (Abb. 3-22). Wurden Zellen mit Fotemustin behandelt, so blieb in beiden Linien die Farbintensität der Zellpopulation für alle Nachbehandlungszeiten auf dem Niveau des Behandlungszeitpunkts. Die Zellen verharrten demnach im Behandlungszyklus. Im Gegensatz dazu nahm die Farbintensität der Zellpopulation nach Temozolomidbehandlung ab. Die Proliferation in D05-Zellen glich in den ersten 24 h nach Temozolomidgabe der Proliferation in unbehandelten Zellen. Bis 48 h nach Behandlung war in einer Subfraktion Proliferation zu beobachten. In D14-Zellen konnte deutliche Proliferation bis 48 h nach Behandlung beobachtet werden. Für spätere Nachbehandlungszeiten war die Proliferation geblockt (D05) oder stark eingeschränkt (D14). Im Gegensatz zu Temozolomid arretiert Fotemustin Zellen im Behandlungszyklus.

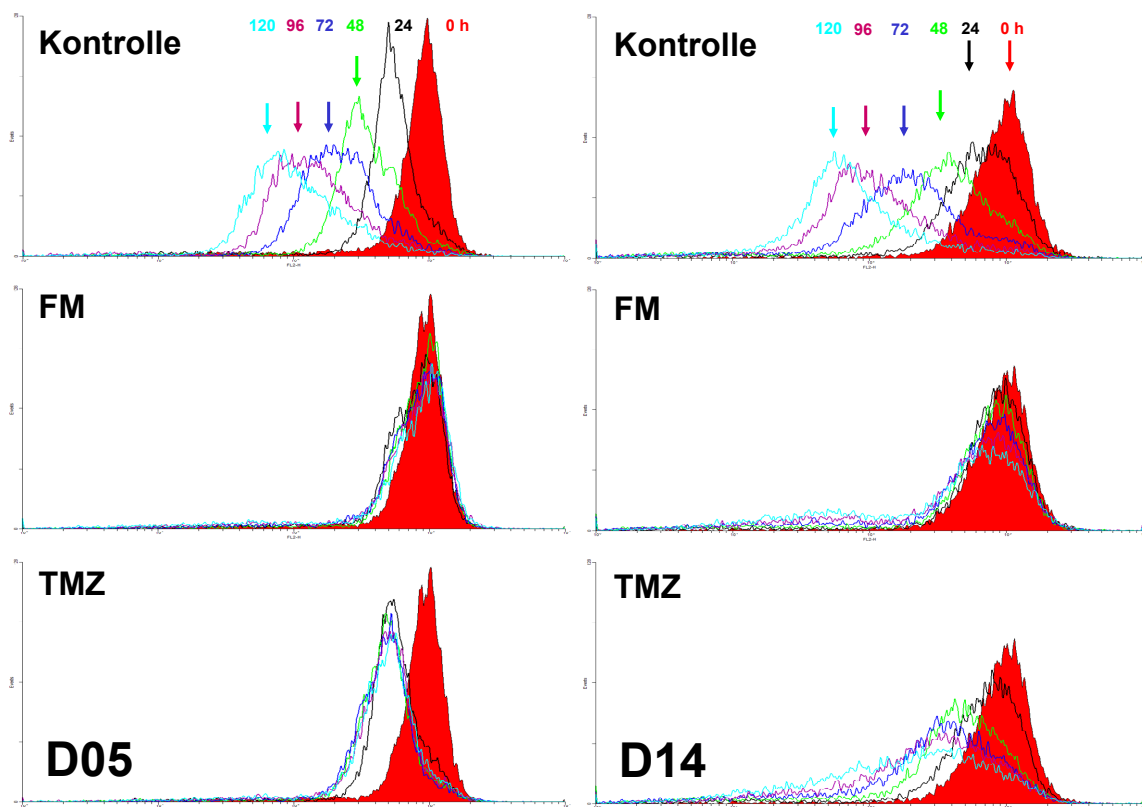


Abb. 3-22 Untersuchung der Proliferation nach Fotemustin- und Temozolomidexposition

D05- und D14-Zellen wurden mit einer 2×10^6 molaren Verdünnung des Farbstoffs PKH26 markiert und am nächsten Tag mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin oder 50 μM Temozolomid behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Nachbehandlungszeiten gesammelt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.7.5 Untersuchung der Proliferationsabhängigkeit der Fotemustin-induzierten Apoptose in P493-6-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass Fotemustin behandelte Zellen im Behandlungszyklus einen irreversiblen G2/M-Block ausbilden. Es sollte nun untersucht werden, ob das Durchlaufen der S-Phase oder der G2/M-Arrest für die Apoptoseinduktion relevant ist, oder ob G1-Phasezellen ebenfalls sensitiv auf Fotemustin reagieren. Die untersuchten Melanomzelllinien konnten weder durch Serumentzug noch durch einen Thymidin-Doppelblock in einen effizienten G1-Arrest versetzt werden. Ein zusätzliches Hindernis für Sensitivitätsstudien stellte der hohe basale Anteil an toten Zellen nach diesen Maßnahmen dar. Um die Fragestellung zu beantworten, wurde ein Zellsystem verwendet, welches in der Lage war, Zellen dauerhaft in einem G1-Arrest zu halten. Mit der aus primären B-Lymphozyten gewonnenen Zelllinie P493-6 standen Zellen zu Verfügung, die sich mittels Tetrazyklin regulierter c-Myc-Expression in G1 arretieren ließen (Kempkes et al. 1995; Pajic et al. 2000). Um P493-6-Zellen in der G1-Phase zu arretieren, wurde sie 48 h mit 0,1 µg/ml Tetrazyklin vorbehandelt und während der gesamten Versuchsdauer unter Tetrazyklin kultiviert und mit exponentiell wachsenden Zellen verglichen. Als interne Kontrolle wurden Zellen 48 h mit Tetrazyklin arretiert, welches 2 h vor Alkylantiengabe ausgewaschen wurde. Die Ansätze wurden mit 10 µM O⁶BG und 16 µM Fotemustin für 120 h inkubiert und der Zelltod durch Bestimmung der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 3-23 A zeigt exemplarisch die Zellzyklusverteilung von Ansätzen am Zeitpunkt der Behandlung, sowie von unbehandelten Kontrollen und Fotemustin behandelten Zellen nach 120 h. Die G1 arretierten Zellen zeigten auch am Ende des Versuchs keine Zellen in der S-Phase und nur eine marginale G2/M-Phasenpopulation. Die SubG1-Fraktion der arretierten und Fotemustin behandelten Zellen ist deutlich kleiner ausgeprägt, als in den Ansätzen der proliferierenden Zellen. Die Zellen, deren Arrest aufgehoben wurde, zeigten 120 h nach Entlassung aus dem Zellzyklusblock wieder eine normale Zellzyklusverteilung.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde Temozolomid als Referenzagens verwendet. Die Zellen wurden mit 10 µM O⁶BG und 50 µM Temozolomid für 120 h inkubiert. Die Behandlung von P493-6-Zellen mit Fotemustin oder Temozolomid induzierte in den proliferierenden Ansätzen 50 bzw. 60% Zelltod (Abb. 3-23 B). Durch das Arretieren der Zellen in der G1-Phase konnte der induzierte Zelltod für beide Agenzien bis auf ca. 10% reduziert werden. Eine Aufhebung des G1-Blocks vor Alkylantiengabe führte hingegen zu einer potenten Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Fotemustin oder

Ergebnisse

Temozolomid. Daraus wird geschlossen, dass G1 arretierte P493-6-Zellen nach Fotemustingabe, genauso wie nach Temozolomidbehandlung, nicht in der Lage sind, Zelltod zu induzieren.

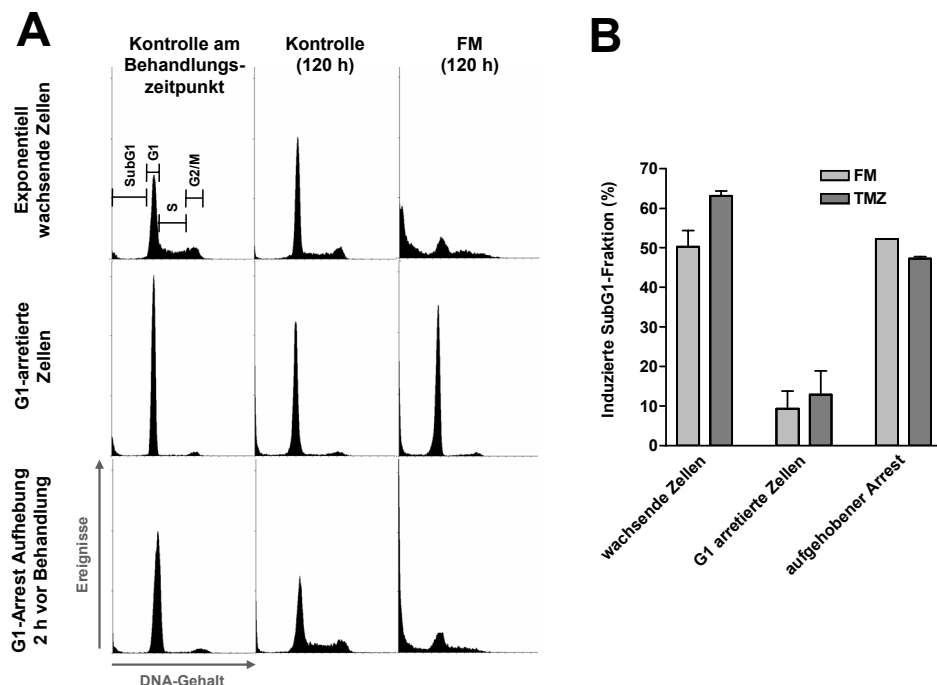


Abb. 3-23 Proliferationsabhängigkeit der Apoptoseinduktion nach Fotemustin- und Temozolomidexposition in P493-6-Zellen

P493-6-Zellen wurden mit 100 ng/ml Tetrazyklin durch 48 h Vorbehandlung bzw. anschließender Dauerbehandlung G1 arretiert. Zum Aufheben des Blocks wurde das Tetrazyklin 2 h vor Alkylantiengabe ausgewaschen. Die Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 16 μM Fotemustin behandelt und für 120 h inkubiert. **(A)** Exemplarische Darstellung der Zellzyklusverteilung zu verschiedenen Zeitpunkten. **(B)** Messung der Zytotoxizität anhand der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometrie. Als Referenzagens wurde Temozolomid (50 μM und 10 μM O⁶BG) verwendet.

3.7.6 Untersuchung der Proliferationsabhängigkeit der Fotemustin-induzierten Caspaseaktivierung in Melanomzellen

In der Zelllinie P493-6 konnte eine Resistenz gegenüber Fotemustin in G1 arretierten Zellen nachgewiesen werden. Um die Proliferationsabhängigkeit für Fotemustin-induzierte Apoptose auf das Melanomzellsystem zu übertragen, wurden konfluent gewachsene D14-Zellen in serumfreiem Medium kultiviert. Apoptoseinduktion wurde in diesem Fall nicht über Ermittlung der SubG1-Fraktion bestimmt, sondern durch das Aktivierungsniveau der Caspase-7. Konfluent gewachsene Zellen in serumfreiem Medium oder exponentiell wachsende Zellen in serumhaltigem Medium wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und für 48 h inkubiert. Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert, die Aktivierung von Caspase-7 über den Nachweis des

Ergebnisse

Caspase-7 Spaltprodukts p20 mittels Western-Blot-Analyse. Abbildung 3-24 A zeigt exemplarisch die Zellzyklusverteilung der unbehandelten Kontrollen und Fotemustin behandelten Zellen nach 48 h Inkubation. Im Gegensatz zu exponentiell wachsenden Zellen zeigten die konfluenten Zellen eine niedrigere S- und G2/M-Phasenpopulation. Nach Inkubation mit Fotemustin zeigten exponentiell wachsende Zellen einen starken Block in der S- bzw. G2/M-Phase. Die G1-Phasepopulation sank von 44% in den Kontrollzellen auf 8% nach 48 h Fotemustininkubation. Konfluente Zellen verweilten auch nach 48 h Fotemustinbehandlung überwiegend in G1. 72% der Kontrollzellen wurden in der G1-Phase detektiert, während bei Fotemustininkubation die Population der G1-Phasen nur marginal auf 69,4% fiel. Die Anreicherung des Spaltprodukts der Caspase-7 lag in exponentiell wachsenden Zellen knapp 33-mal höher als in der korrespondierenden Kontrolle (Abb. 3-24 B). Für G1 arretierte D14-Zellen konnte nur eine Induktion des Spaltprodukts vom 4,3 fachen der korrespondierenden Kontrolle detektiert werden. Konfluenz und Serumentzug arretierten D14-Zellen für 48 h in der G1-Phase. G1 arretierte D14-Melanomzellen zeigten nach Fotemustinbehandlung eine deutlich erniedrigte Caspase-7-Aktivierung.

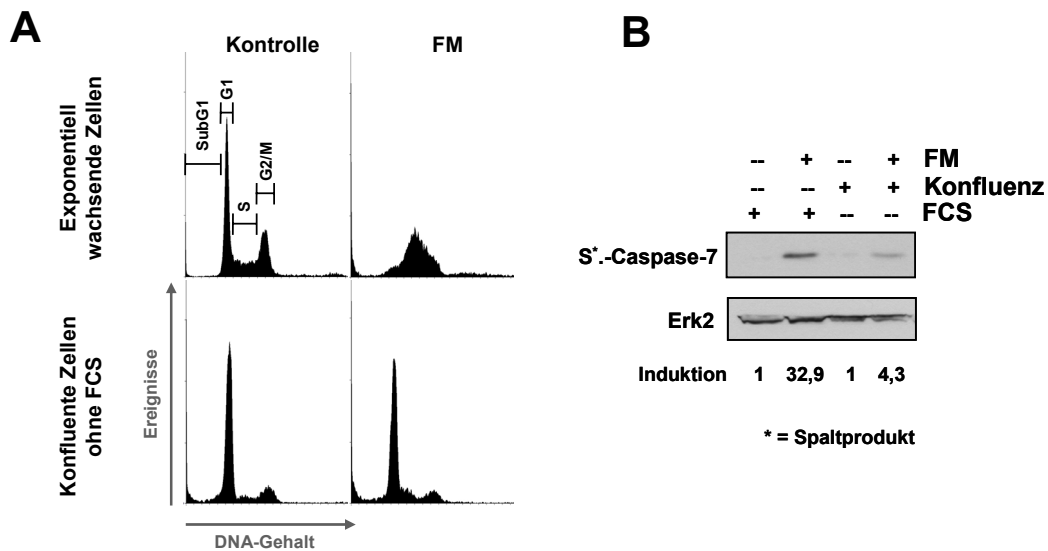


Abb. 3-24 Proliferationsabhängigkeit der Caspase-7-Aktivierung nach Fotemustinexposition in D14-Melanomzellen

D14-Zellen wurden mittels Konfluenz und Serumentzugs in G1 arretiert und mit exponentiell wachsenden Zellen verglichen. Die Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt und für 48 h inkubiert. Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Aktivierung der Caspase-7 wurde anhand ihres Spaltprodukts p20 mit spezifischen Antikörpern mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle. Die Induktion wurde unter Berücksichtigung der Ladekontrollen ermittelt und stellt den Mittelwert zweier unabhängiger Versuche dar.

3.8 Bestimmung der Interstrand-Crosslinkbildung und ihrer Prozessierung nach Fotemustinexposition in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien

Mit einem auf der Methode der alkalischen Einzelzellektrophorese basierenden Nachweisverfahren für ICLs sollte überprüft werden, ob die untersuchten Zelllinien D05 und D14 nach Fotemustinbehandlung in vergleichbarem Maße ICLs bilden. Mit dieser Methode kann auch die frühe ICL-Prozessierung der beiden Zelllinien untersucht werden. D05- und D14-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und gemeinsam dem ICL-Komet-Test unterzogen. Ein niedriger OTM-Wert spiegelt hierbei eine durch ICLs vernetzte DNA wieder. In D05- und D14-Zellen bewirkte Fotemustinbehandlung nach 16 h die Ausbildung von ICLs, repräsentiert durch die Abnahme des OTM von 11 auf 6,5 (D05) bzw. 7,5 (D14) im Vergleich zu den Kontrollen am Zeitpunkt 0 h (Abb. 3-25). Ein Reparaturprozess der ICLs konnte schon 24 h nach Behandlung gemessen werden (OTM von 8,5 in beiden Zelllinien). 48 h nach Behandlung wurde in beiden Zelllinien ein OTM von 11 (D05) bzw. 12 (D14) gemessen. Die Werte lagen 48 h nach Behandlung auf dem Niveau der Kontrollansätze am Zeitpunkt 0 h. Diese Ansätze wurden nur bestrahlt, nicht aber Fotemustinbehandelt um das Niveau der DNA-Fragmentierung durch die ionisierende Strahlung zu ermitteln (siehe 2.2.18). ICLs waren somit 48 h nach Fotemustingabe weder in D05- noch in D14-Zellen nachweisbar.

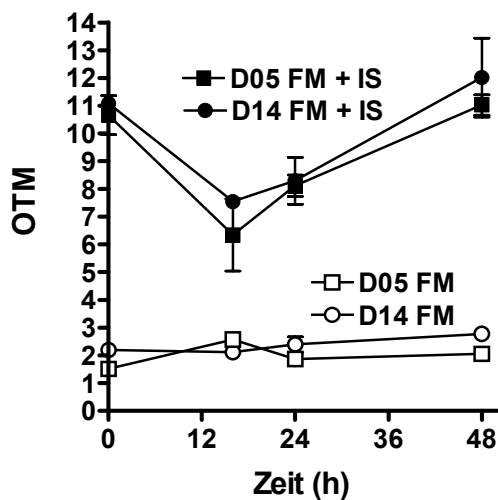


Abb. 3-25 ICL-Bildung und ICL-Prozessierung in zwei Melanomzelllinien nach Fotemustinexposition

D05- und D14-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin behandelt. Alle Ansätze wurden ionisierender Strahlung (6 Gy) ausgesetzt und mittels Alkalischen-Komet-Test analysiert. Als zusätzliche interne Kontrolle dienten Fotemustin behandelte Zellen, welche nicht bestrahlt wurden. Diese wurden parallel zu allen untersuchten Zeitpunkten durchgeführt. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen.

Ergebnisse

Als zusätzliche interne Kontrolle wurden nicht bestrahlte, doch Fotemustin behandelte Zellen der alkalischen Einzelzellelektrophorese unterzogen. Es wurde damit überprüft, ob Fotemustinbehandlung zur Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen führt, welches die Messung der ICLs beeinflusst. In beiden Zelllinien bewegten sich die ermittelten OTM-Werte für alle Messpunkte im Bereich von 1,5 bis 2,5. Ein Einfluss auf die ICL-Detektion konnte somit ausgeschlossen werden. Die Zelllinien D05 und D14 zeigten keine signifikanten Unterschiede in der ICL-Bildung und in der frühen ICL-Prozessierung nach Gabe von 32 μM Fotemustin.

3.9 Vertiefende Untersuchungen der Fotemustin-vermittelten H2AX Phosphorylierung

γH2AX ist ein akzeptierter Marker für DNA-Schäden wie DSBs (Ismail and Hendzel 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Fotemustin in Melanomzellen γH2AX -Induktion bewirkt (siehe 3.4.1). Auch wenn keine signifikante Korrelation zwischen γH2AX -Induktion und Apoptoserate besteht, wurde ein stärkeres γH2AX -Niveau in sensitiven Zelllinien beobachtet. Vertiefende Studien der H2AX Phosphorylierung in den zwei unterschiedlich sensitiven Zelllinien D05 und D14 sollte klären, ob sich die beobachtete Resistenz auf der Ebene des DNA-Schadens bzw. der DNA-Reparatur oder auf der Ebene der Apoptoseexekution manifestiert.

3.9.1 Vergleich der γH2AX -Induktion und der Bildung von γH2AX -Foci in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien

Es wurden resistente D05- und sensitive D14-Zellen mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten mittels Western-Blot-Analyse auf γH2AX untersucht. Alle Ansätze wurden parallel durchgeführt und gemeinsam für 12 sek, 1 min und 5 min belichtet (Abb. 3-26). H2AX wurde in der resistenten Zelllinie D05 deutlich schwächer phosphoryliert als in den sensitiven D14-Zellen. Erst nach 5 min Belichtungszeit war in D05-Zellen ein deutliches γH2AX Signal detektierbar. Ein vergleichbares Signal konnte in D14-Zellen schon nach 12 sek Belichtung detektiert werden. Ein weiterer Unterschied bestand in dem Signalniveau im Verlauf der Behandlung. In D05-Zellen wurde das maximale γH2AX -Niveau nach 48 h detektiert; es sank zu späteren Nachbehandlungszeiten auf ein schwächeres Niveau. In D14-Zellen konnte das nach 48 h erreichte maximale γH2AX -Niveau konstant bis 120 h nach Behandlung detektiert werden.

Ergebnisse

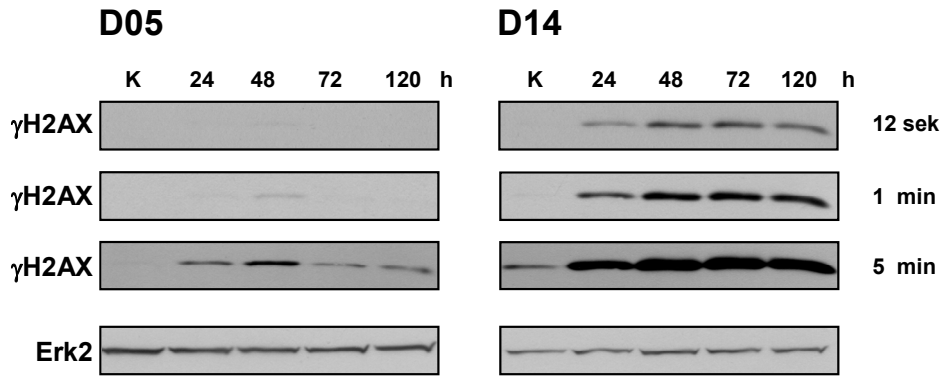


Abb. 3-26 γ H2AX-Induktion in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien nach Fotemustinexposition

D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und mit 32 μ M Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion von γ H2AX erfolgte nach unterschiedlichen Belichtungszeiten mittels spezifischer Antikörper. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle.

Um die Intensitätsunterschiede der γ H2AX-Induktion näher zu charakterisieren, wurde eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt. Es wurden D05- und D14-Zellen mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt, zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten immunhistochemisch gegen γ H2AX markiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Um die Intensität der H2AX Phosphorylierung zu vergleichen, wurden Abschnitte mit 1500 ms und 5000 ms Belichtungszeit dokumentiert (Abb. 3-27). Beide Zelllinien bildeten in erster Linie γ H2AX-Foci nach Fotemustinbehandlung. Zu beobachten waren auch Bereiche innerhalb des Zellkerns mit einer diffusen H2AX Phosphorylierung. In beiden Zelllinien konnten 48 h nach Behandlung eine große Anzahl kleiner Foci pro Zelle dokumentiert werden. 96 h nach Behandlung wurden weniger Foci pro Zelle beobachtet. Neben Zellen mit kleinen Foci wurden Zellen dokumentiert, die deutlich größer Foci ausgebildet hatten. Die exemplarische Dokumentation der γ H2AX-Foci zwischen den resistenten D05- und den sensitiven D14-Zellen erlaubt keine Aussage über Unterschiede in der Anzahl der Foci und damit auf Unterschiede im DNA-Schadensniveau. Die immunhistochemische Untersuchung ermöglichte die Charakterisierung der γ H2AX-Induktion als Foci und bestätigte den mittels Western-Blot-Analyse beobachteten Intensitätsunterschied (siehe Abb. 3-26). Die unterschiedliche Intensität der Foci zwischen beiden Zelllinien konnte als ein Grund dafür charakterisiert werden.

Ergebnisse

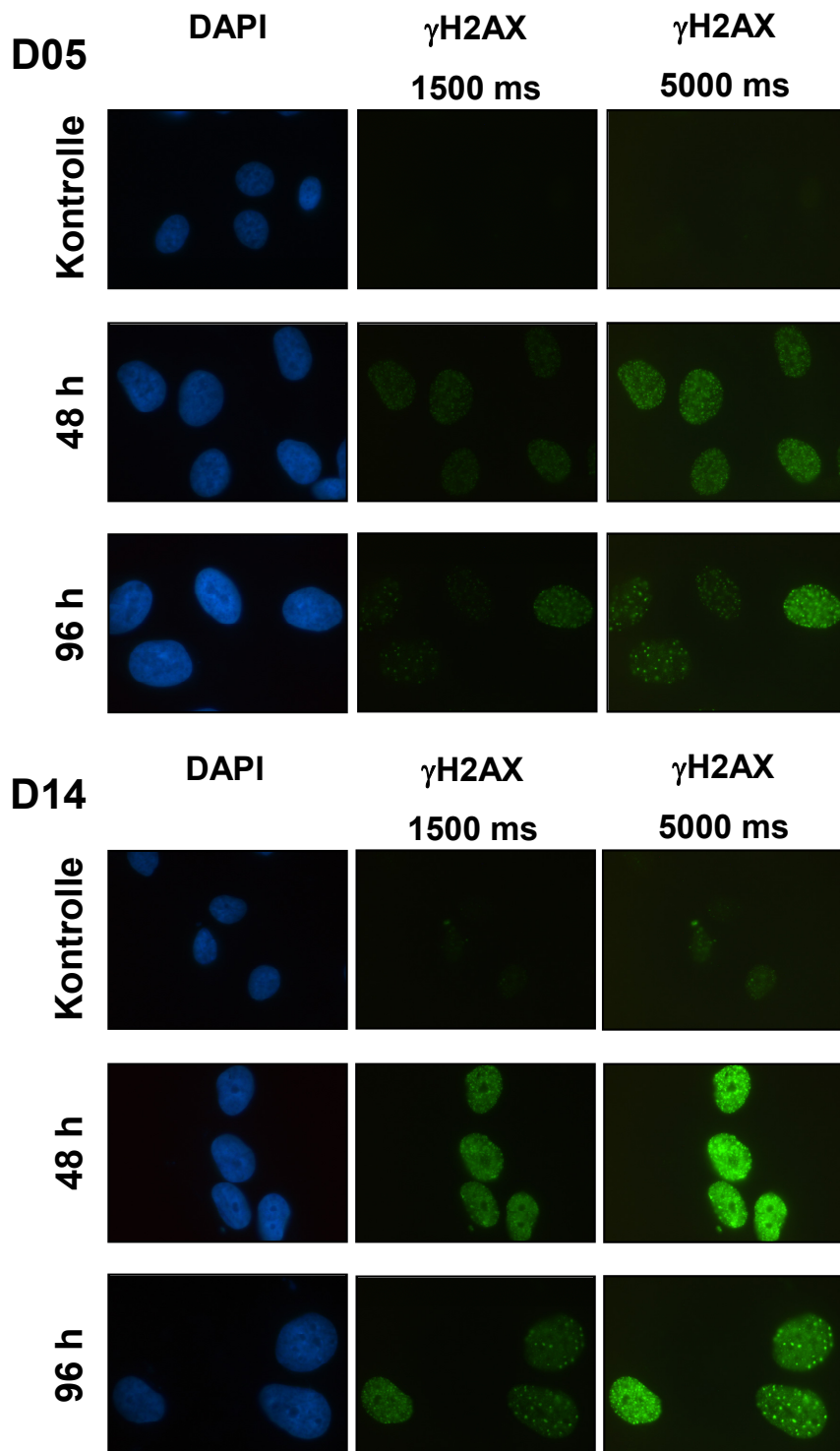


Abb. 3-27 γ H2AX-Focibildung in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien nach Fotemustinexposition

D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und mit 32 μ M Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten mittels immunhistochemischer Methoden gegen γ H2AX markiert. Die Dokumentation erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie bei Belichtungszeiten von 1500 ms und 5000 ms. DAPI-Färbung wurde zur Markierung des Zellkerns verwendet.

3.9.2 γ H2AX-Focibildung nach Fotemustinexposition in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien

Es konnte gezeigt werden, dass Fotemustinexposition zur Bildung von γ H2AX-Foci führt. Zwischen der resistenten D05 und der sensitiven D14 Zelllinie wurde eine unterschiedlich starke Intensität der Foci nach Behandlung dokumentiert. Um zu untersuchen, ob auch Unterschiede in der Anzahl der gebildeten Foci auftreten, wurden weitere immunhistochemische Versuche durchgeführt. Es wurden D05- und D14-Zellen mit $10 \mu\text{M}$ O⁶BG und $32 \mu\text{M}$ Fotemustin behandelt, zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten immunhistochemisch gegen γ H2AX markiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Das Zählen der Foci pro Zelle wurde mit der Cell A-Software per Hand vorgenommen. In Abbildung 3-28 wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten graphisch dargestellt. Die Focianzahl in unbehandelten Zellen lag für D05-Zellen bei 5 pro Zelle und bei D14 bei etwas über 10. In D14-Zellen konnte 16 und 24 h nach Behandlung eine deutlich stärkere Foci-Induktion, im Vergleich zu D05-Zellen, beobachtet werden. D14-Zellen hatten 16 h nach Behandlung mit 75 Foci pro Zelle fast doppelt so viele Foci gebildet wie D05-Zellen (40 Foci pro Zelle).

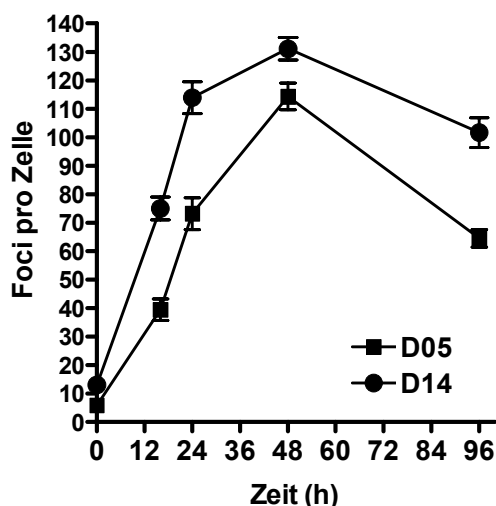


Abb. 3-28 Untersuchung der γ H2AX-Focianzahl pro Zelle in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien nach Fotemustinexposition

D05- und D14-Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ O⁶BG und mit $32 \mu\text{M}$ Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten mittels immunhistochemischer Methoden gegen γ H2AX markiert. Die Dokumentation erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, das Auszählen der Foci pro Zelle mittels der Cell A-Software. Die einzelnen Werte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar.

Auch 24 h nach Behandlung konnten in D14-Zellen mit über 110 Foci pro Zelle deutlich mehr Foci gezählt werden, als in D05-Zellen (75 Foci pro Zelle). 48 h nach Behandlung stagnierte die Focizahl in D14-Zellen bei ca. 130 Foci pro Zelle. D05-Zellen erreichten nach 48 h Behandlung mit ca. 115 Foci pro Zelle ebenfalls die maximale Focianzahl. Für

Ergebnisse

einen späten Nachbehandlungszeitpunkt (96 h) konnte für beide Zelllinien eine Abnahme der Focianzahl ermittelt werden. In D05-Zellen wurde eine Reduktion von fast 50% beobachtet (ca. 65 Foci pro Zellen), während in D14-Zellen nur ein moderater Abfall auf gut 100 Foci pro Zellen ausgezählt wurde. In den sensitiven D14-Zellen wurde eine schnellere und größere Akkumulation von Foci zu frühen Nachbehandlungszeitpunkten, sowie eine deutlich höheres Niveau beim späten Nachbehandlungszeitpunkt, im Vergleich zu resistenten D05-Zellen, beobachtet. Die höhere γ H2AX-Induktion und die stärkere Akkumulation an Foci in der sensitiven Zelllinie D14 sprechen für eine eingeschränkte oder verzögerte Reparatur der durch Fotemustin verursachten Schäden. Eine Aussage über einen Resistenzerwerb auf der Ebene der Apoptoseexekution kann nicht getroffen werden.

3.10 Studien zum apoptotischen Signalweg nach Fotemustinbehandlung

Es konnte gezeigt werden, dass Fotemustin im untersuchten Zellsystem Zelltod, p53 unabhängig, über Caspasen-vermittelte Apoptose bewirkt. Nun sollte untersucht werden, ob die durch Fotemustin ausgelöste Apoptose durch den Rezeptor-vermittelten oder extrinsischen Weg oder durch den Rezeptor-unabhängigen Weg, auch intrinsischer oder mitochondrialer Weg genannt, vermittelt wird.

3.10.1 Inhibierung der Caspasenaktivität unterdrückt die Fotemustin-vermittelte Apoptose

Um die Abhängigkeit der Fotemustin-vermittelten Apoptose von aktiven Caspasen zu untersuchen, wurde der globale und irreversible Caspaseinhibitor Boc-D-FMK benutzt. Die sensitive Zelllinie D14 und die resistente Zelllinie D05 wurden eine Stunde mit 10 μ M O⁶BG vorinkubiert und anschließend mit 32 μ M Fotemustin behandelt. Boc-D-FMK wurde 24 h nach Fotemustingabe zu einer Endkonzentration von 50 μ M zugesetzt und die Zellen wurden weitere 96 h inkubiert. Durch Bestimmung der SubG1-Fraktion wurde der Zelltod, und durch eine Annexin V / Propidium Jodid-Färbung wurde die Apoptose/Nekrose-Frequenz mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Nach Fotemustinbehandlung konnte die Apoptose durch die Gabe des Caspaseinhibitors in der sensitiven Zelllinie D14 hoch signifikant ($P < 0,01$) gehemmt werden (Abb. 3-29 A). Die apoptotische Population der Annexin V / Propidium Jodid-Färbung halbierte sich durch Gabe des Caspaseinhibitors (von 49,7% auf 26,6%), während die nekrotische Population nur um 37,4% zurück ging (von 26,5% auf 19,6%) (Abb. 3-29 B). Auch in der resistenten Zelllinie D05 konnte die Apoptose durch den Inhibitor leicht gesenkt werden. Die

Abnahme war allerdings nicht signifikant (Abb. 3-29 C). Die Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz zeigte jedoch eine Reduktion der apoptotischen Population um 41% durch Gabe des Inhibitors (von 32,4% auf 19,1%), während die nekrotische Population sogar um 17% zunahm (von 16,6% auf 19,5%) (Abb. 3-29 D). Die Fotemustin induzierte Apoptose in Melanomzellen ist folglich ein von Caspasen abhängiger Prozess.

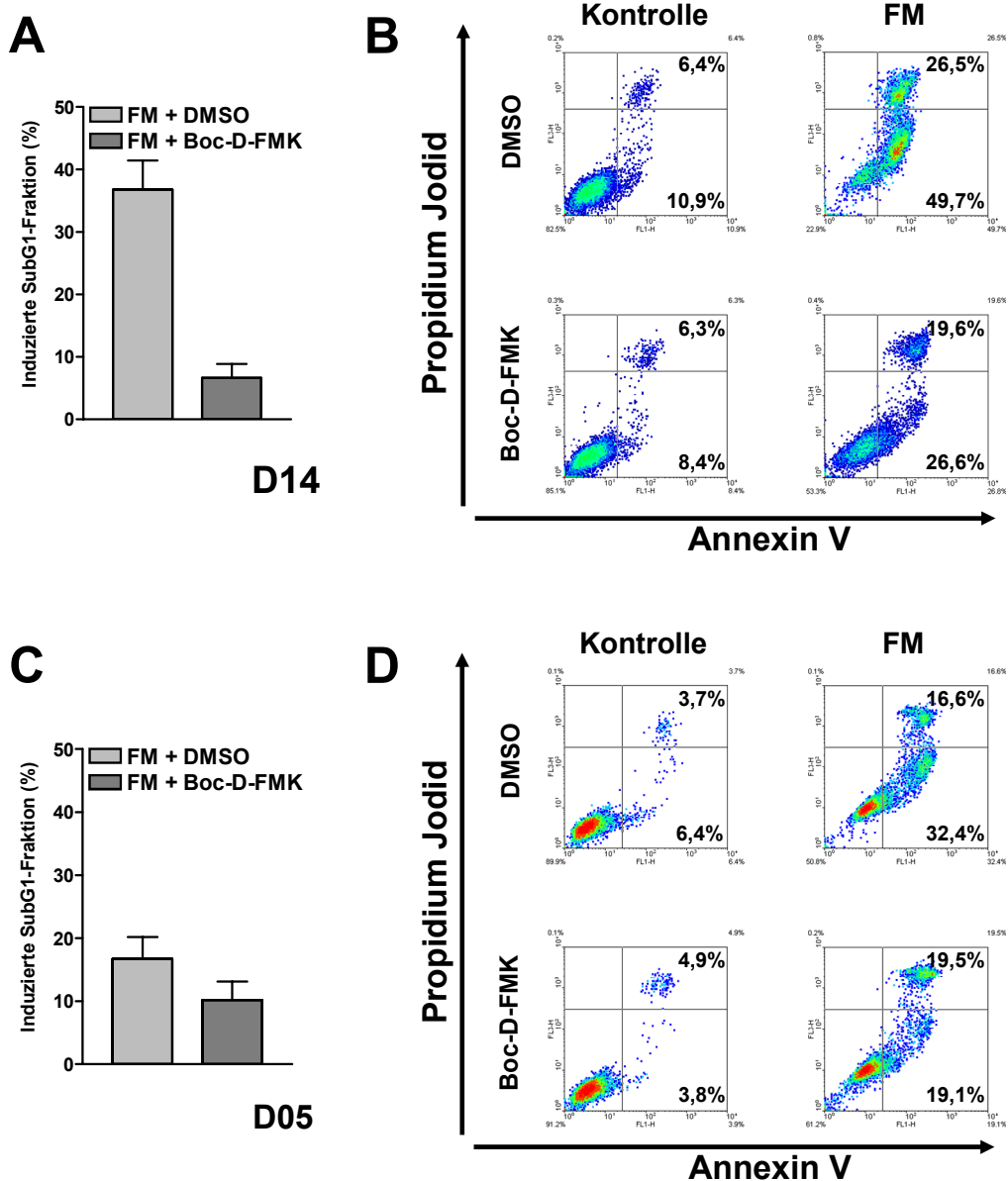


Abb. 3-29 Einfluss des Caspaseinhibitors Boc-D-FMK auf Fotemustin induzierte Apoptose
(A) Die Zelllinie D14 wurde mit 10 μ M O⁶BG vorbehandelt und mit 32 μ M Fotemustin für 120 h inkubiert. 24 h nach Fotemustingabe wurden 50 μ M Caspaseinhibitor Boc-D-FMK zugesetzt. Der Zelltod wurde anhand der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar. **(B)** Messung der Apoptose- und Nekrosefraktion wurde durch Annexin V / Propidium Jodid Färbung mittels Durchflusszytometrie analysiert **(C)**. Die Zelllinie D05 wurde mit 10 μ M O⁶BG vorbehandelt und mit 32 μ M Fotemustin für 120 h inkubiert. 24 h nach Fotemustingabe wurden 50 μ M Caspaseinhibitor Boc-D-FMK zugesetzt. Der Zelltod wurde anhand der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar. **(D)**. Messung der Apoptose- und Nekrosefraktion wurde durch Annexin V / Propidium Jodid Färbung mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.10.2 Bestimmung der Aktivität von Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-3 nach Fotemustinbehandlung

D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und für 72 h inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurde die Enzymaktivität für die Caspasen-8, -9 und -3 bestimmt (Abb. 3-30). Die resistente Zelllinie D05 zeigte keine messbare Aktivität der Initiatorcaspasen-8 und -9. Allerdings konnte eine Aktivitätsverdopplung der Effektorcaspase Caspase-3 gemessen werden. In der sensitiven Zelllinie D14 konnte eine Erhöhung der Aktivität aller drei Caspasen gemessen werden. Caspase-8 zeigte eine 1,5 fache Erhöhung ihrer Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, Caspase-9 eine Erhöhung um Faktor 2. Die Effektorcaspase-3 zeigte die maximale Aktivitätserhöhung um den Faktor 3.

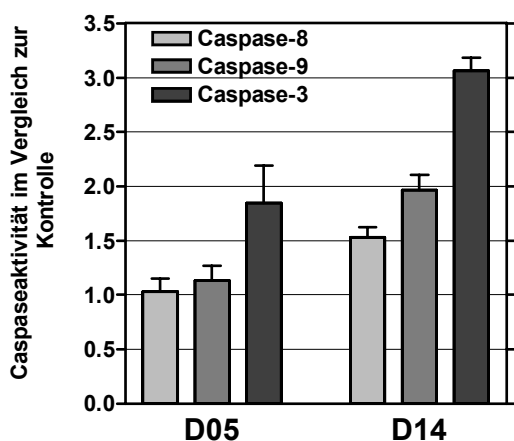


Abb. 3-30 Aktivierung von Caspasen nach Fotemustinexposition

D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin für 72 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend spezifischen Caspase-Aktivitäts-Tests für Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-3 eingesetzt. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen da.

3.10.3 Untersuchungen von Parametern der Rezeptor-vermittelten Apoptose

Der Fas-Rezeptorsstatus in unbehandelten Zellen wurde über die Markierung mit einem agonistischen Antikörper gegen den Fas-Rezeptor auf der Oberfläche intakter D05- und D14-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Als Kontrolle diente die Fas-Rezeptor positive Leberkarzinomzelllinie AKN1. Der auf der Zelloberfläche präsentierte Rezeptor wurde anhand des Fluoreszenzsignals zwischen Kontrolle (nur sekundärer Antikörper) und Messung (primärer und sekundärer Antikörper) für jede Zelllinie gemessen. Weder in D05- noch in D14-Zellen konnte ein Anstieg des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Fas-Rezeptor positive Zelllinie AKN1 eine deutlich höhere Intensität des Signals im Vergleich zur

Ergebnisse

Kontrolle. In den beiden Zelllinien D05 und D14 lag im unbehandelten Zustand kein nachweisbarer Fas-Rezeptor an der Zelloberfläche vor (Abb. 3-31 A).

Des Weiteren wurde untersucht, ob D05- und D14-Zellen nach Behandlung mit dem agonistischen Antikörper gegen den Fas-Rezeptor die Fähigkeit besitzen, Rezeptor-vermittelte Apoptose zu unterlaufen. Dazu wurden D05- und D14-Zellen für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antikörpers inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität durch Messung der ATP-Menge (Abb. 3-31 B). Die Aktivierung des Fas-Rezeptors mittels agonistischer Antikörper führte in beiden Zelllinien auch mit hohen Dosen (bis 400 ng/ml) nur zu einer geringen negativen Beeinflussung der Zellviabilität. Nachdem der Fas-Rezeptorstatus in den Zelllinien D05 und D14 untersucht wurde, sollte seine Induzierbarkeit nach Behandlung mit Fotemustin mittels Western-Blot-Analyse mit angereicherten Membranextrakten überprüft werden. Ebenfalls wurde der Nachweis von aktivierter Caspase-8 anhand von Spaltprodukten über Western-Blot-Analysen in Gesamtzellextrakten geführt. Dazu wurden D05- und D14-Zellen mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten aufbereitet. Als Positivkontrolle der Caspase-8 Aktivierung dienten verschieden behandelte HeLa- und Jurkat-Zellen. Wie in Abbildung 3-31 C zu sehen ist, war eine leichte basale Fas-Rezeptorexpression in der Zelllinie D05 nachzuweisen. Durch Fotemustinbehandlung kam es zu einer starken Induktion des Expressionsniveaus. In D14-Zellen konnte dagegen keine Fas-Rezeptorexpression und -induktion detektiert werden. Die typischen Spaltprodukte der Caspase-8 (43, 41 und 18 kDa) konnten weder in D05- noch in D14-Zellen nach Fotemustinbehandlung nachgewiesen werden (Abb. 3-31 D). Im Gegensatz dazu waren die Spaltprodukte (43 und 41 kDa) in allen drei Positivkontrollen deutlich detektierbar.

Um zu untersuchen, ob die Modulierung des Fas-Rezeptors nach Fotemustingabe Einfluss auf die Rezeptor-vermittelte Apoptose hat, wurden die Zelllinien D05 und D14 nach Fotemustinbehandlung mit einem antagonistischen Antikörper gegen den Fas-Rezeptor inkubiert. Die Auswertung erfolgte über Messung der SubG1-Fraktion mittels Durchflusszytometrie. D05- und D14-Zellen wurden dazu mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt. 24 h später wurde 1 $\mu\text{g/ml}$ des antagonistischen Antikörpers zugegeben und die Zellen weitere 96 h inkubiert. Die Inhibierung des Fas-Rezeptors hatte weder in D05-Zellen noch in D14-Zellen einen Einfluss auf die Apoptoserate (Abb. 3-31 E). Auch wenn die Zelllinie D05 das Fas-Rezeptorprotein exprimieren kann, scheint

Ergebnisse

Fotemustin-vermittelte Apoptose nicht über den Rezeptor-vermittelten Weg initiiert zu werden.

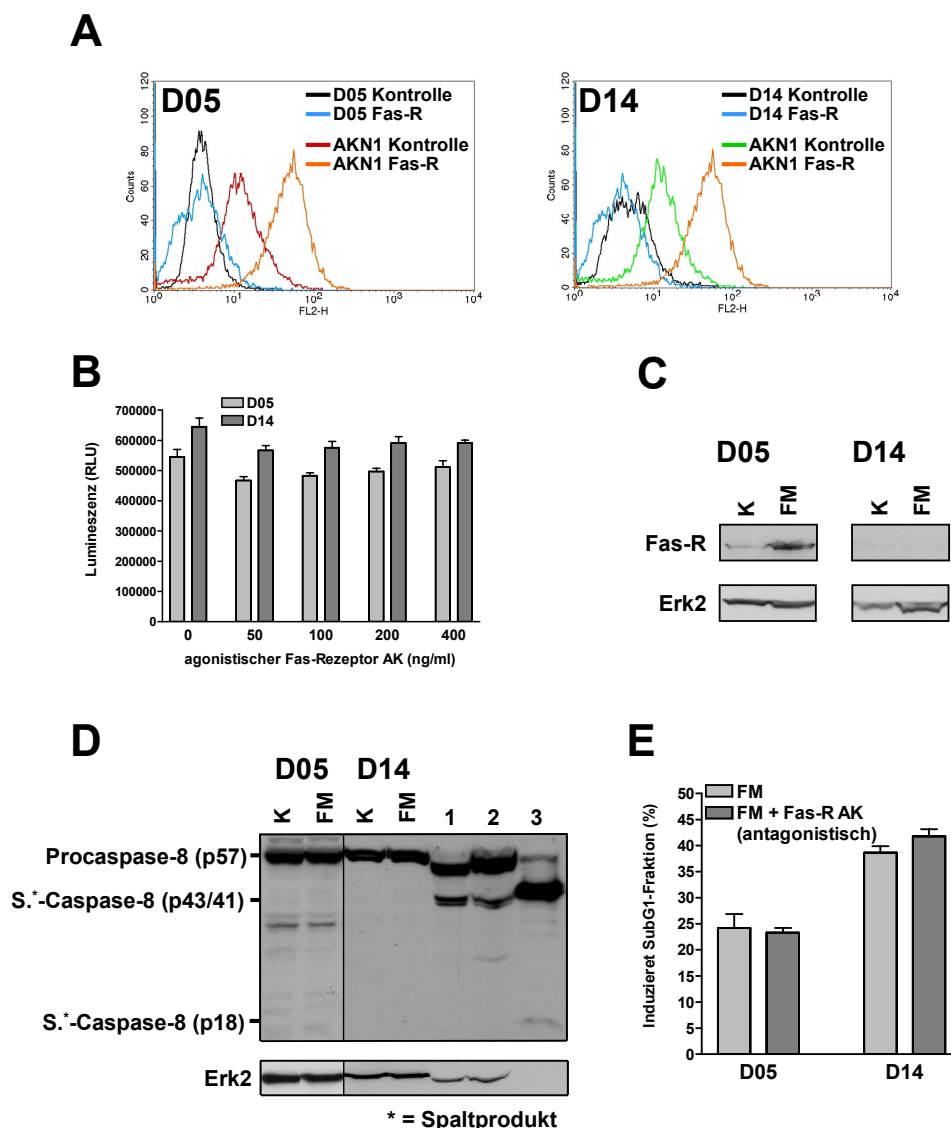


Abb. 3-31 Einfluss des Fas-Rezeptors und Aktivierung der Caspase-8 nach Fotemustinexposition

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit einem agonistischen Antikörper gegen Fas-Rezeptorprotein inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Fas-Rezeptor positive Zelllinie AKN1 diente als Positivkontrolle. (B) D05- und D14-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen eines agonistischen Antikörpers gegen den Fas-Rezeptor für 48 h inkubiert und mittels Zellviabilitäts-Test analysiert. (C) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin für 72 h inkubiert. Die isolierte Membranfraktion wurde mittels Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen Fas-Rezeptorprotein untersucht. Als Ladekontrolle diente anti-Erk2. (D) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin für 48 h inkubiert und zu Gesamtzellextrakten aufbereitet. Die Detektion der Procaspase-8 und deren Spaltprodukte p43, p41 und p18 erfolgte mittels Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper. Als Positivkontrollen dienten Gesamtextrakte aus: 1 = HeLa-Zellen (100 μ M Cisplatin für 24 h); 2 = HeLa-Zellen (1 μ M Staurosporine für 24h); 3 = Jurkat-Zellen (25 μ g/ml Etoposide (VP16) für 24h). Als Ladekontrolle diente anti-Erk2. (E) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin für 120 h inkubiert. 1 μ g/ml antagonistischer Antikörper gegen den Fas-Rezeptor wurde 24 h nach Fotemustinbehandlung zugegeben. Die Bestimmung der SubG1-Fraktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Die Abbildung A und die Daten für die Abbildung B wurden von Frau Dr. Susanne Strand (1. Medizinische Klinik und Poliklinik, Uni Mainz) zur Verfügung gestellt.

3.10.4 Untersuchungen von Parametern der mitochondrial vermittelten Apoptose

Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien dient als klassischer Marker der mitochondrial vermittelten Apoptose. Sie führt zur Aktivierung der Caspase-9. Gesteuert wird die Cytochrom C Freisetzung u.a. durch das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptischen Proteinen der Bcl-2-Familie in und an der Mitochondrienmembran. In Western-Blot-Analysen wurde die Lokalisierung der Proteine Cytochrom C, Bcl-2 und Bax untersucht. Für diese Untersuchung wurden fraktionierte Proteinextrakte der Mitochondrien und des Zytosols aus denselben Zellen hergestellt. Der Nachweis von aktivierter Caspase-9 erfolgte anhand von dessen Spaltprodukt. Es wurden D05- und D14-Zellen mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und zu verschiedenen Nachbehandlungszeiten für Western-Blot-Analysen aufbereitet. In Abbildung 3-32 A konnte gezeigt werden, dass Fotemustinbehandlung in der sensitiven D14-Zelllinie zu einer starken Abnahme von Cytochrom C in der mitochondrialen Fraktion und zu einer Anreicherung des Proteins im Zytosol führte. Das antiapoptische Protein Bcl-2 war nach Behandlung in der mitochondrialen Fraktion deutlich schwächer nachweisbar, während das Niveau des proapoptischen Proteins Bax nur marginal sank. Das zytosolisch vorliegende Bax-Protein konnte nach Behandlung nicht mehr detektiert werden. Die resistenten D05-Zellen zeigten im Gegensatz zu D14-Zellen nach Behandlung eine schwächere Anreicherung von Cytochrom C im Zytosol. In der mitochondrialen Fraktion konnte keine Veränderung im Cytochrom C- und Bcl-2-Niveau detektiert werden. Bax wurde in beiden Fraktionen nach Behandlung stärker detektiert. Das Spaltprodukt der Caspase-9 war in D14-Zellen schon 24 h nach Behandlung detektierbar (Abb. 3-32 B). In D05-Zellen konnte das Spaltprodukt der Caspase-9 nicht nachgewiesen werden.

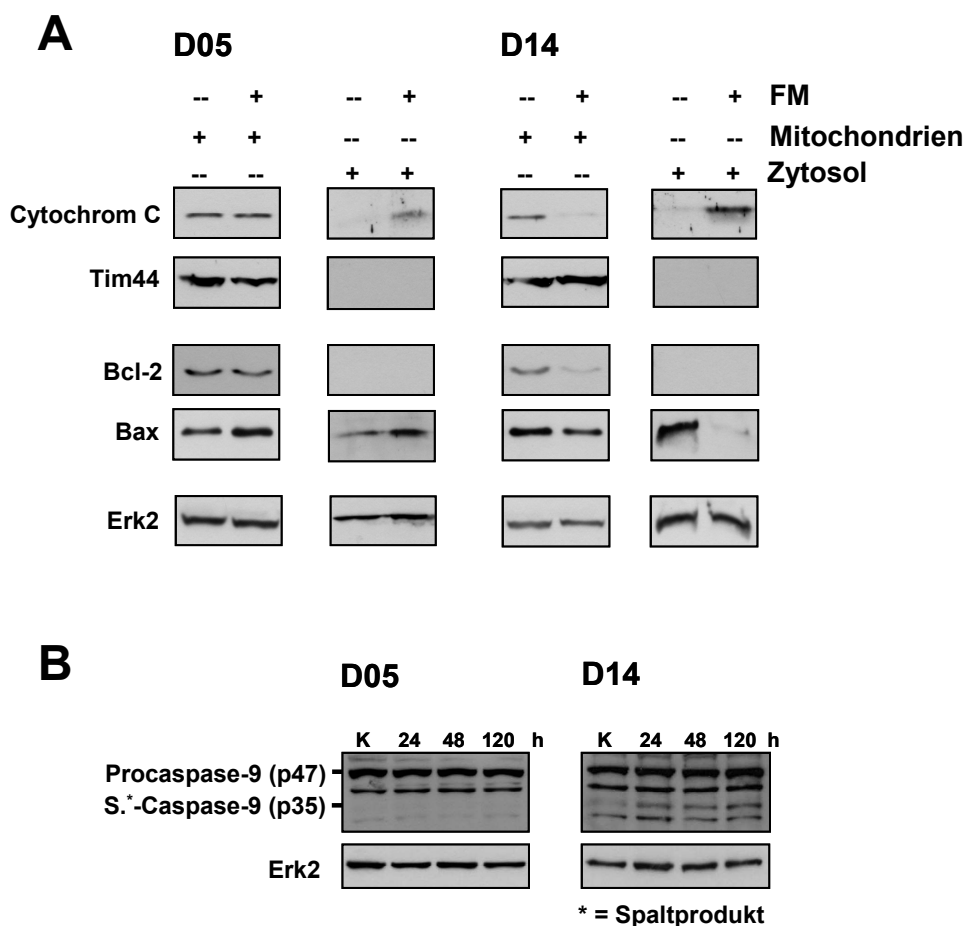


Abb. 3-32 Translokation von mitochondrialen Apoptosefaktoren und Aktivierung der Caspase-9 nach Fotemustinexposition

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin für 72 h inkubiert und zu mitochondrialen und zytosolischen Extrakten fraktioniert. Die Detektion von Cytochrom C, Bcl-2 und Bax erfolgte über spezifische Antikörper mittels Western-Blot-Analyse. Anti-Tim44 diente als Reinheitskontrolle für die fraktionierten Extrakte. Als Ladekontrolle diente anti-Erk2. (B) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin nach verschiedenen Nachbehandlungszeiten zu Gesamtzell-extrakten aufbereitet. Die Detektion der Procaspase-9 und deren Spaltprodukte p35 erfolgte mittels Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper. Als Ladekontrolle diente anti-Erk2.

3.11 Einfluss von Mitgliedern der IAP (Inhibitor of apoptosis) Proteinfamilie auf die Sensitivität von Melanomzelllinien nach Fotemustinbehandlung

Alle Mitglieder der IAP-Proteinfamilie besitzen antiapoptotische Eigenschaften, die über den Einfluss auf Caspasen vermittelt werden (Deveraux and Reed 1999). Für das hier verwendete Zellsystem sollte untersucht werden, ob eines der beiden IAP-Proteine XIAP oder Survivin als mögliche Resistenzmarker nach Fotemustinbehandlung in Frage kommt.

3.11.1 Basale Expression von XIAP, Survivin und XAF1

Um die Basisexpression der Proteine XIAP, Survivin sowie das IAP-inhibierende Protein XAF1 pro Zellzahl zu bestimmen, wurden für alle sechs Zelllinien jeweils $1,6 \times 10^5$ Zellen

Ergebnisse

in einer Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 3-33). Erk2 und RPA_{p32} dienten als Ladekontrollen. Die Zelllinien D03 und D05 zeigten die höchste XIAP-Expression und D14 zeigte deutlich die niedrigste Expression. Der XIAP-Antagonist XAF1 wurde in allen Zelllinien gleichstark exprimiert. Eine deutliche Doppelbande ist bei den Zelllinien D14 und MeWo zu erkennen. Ob es sich hierbei um Splice-Varianten oder sekundäre Modifikationen des Proteins handelt, konnte an Hand dieser Daten nicht geklärt werden. Das Basisniveau von Survivin ist in den Zelllinien D03, D14, Sk29 und MeWo nahezu gleich stark und in den Zelllinien D05 und MZ7 niedriger exprimiert. Da Survivin als antiapoptotischer Faktor in der resistentesten Zelllinie D05 eher schwach exprimiert ist (2,5 mal niedriger im Vergleich zu D14), XIAP im Vergleich aber sehr hoch exprimiert ist (8,75 mal höher im Vergleich zu D14), wurde im weiteren Verlauf die resistente Zelllinie D05 (hohes XIAP Basisniveau) mit der sensitiven Zelllinie D14 (niedrigstes XIAP Basisniveau) verglichen.

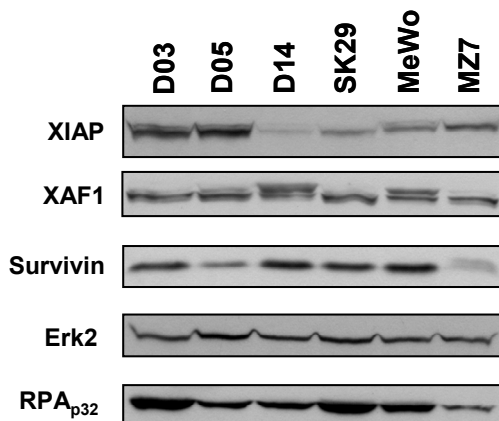


Abb. 3-33 Basale Expression der Proteine XIAP, Survivin und XAF1

Es wurden Gesamtzell-extrakte aus $1,6 \times 10^5$ Zellen von sechs verschiedenen Melanom-Zelllinien zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen XIAP, XAF1 und Survivin. Als Ladekontrolle dienten Antikörper gegen Erk2 und RPA_{p32}.

3.11.2 Expression von XIAP, Survivin und XAF1 nach Fotemustinbehandlung

Um das Niveau der Proteine XIAP, Survivin und XAF1 nach Fotemustinbehandlung zu untersuchen, wurden D05- und D14-Zellen mit $10 \mu\text{M}$ O⁶BG eine Stunde vorbehandelt und mit $32 \mu\text{M}$ Fotemustin inkubiert. Nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten wurden die Proben gesammelt und mittels Western-Blot-Analysen die Proteinniveaus der drei Proteine bestimmt (Abb. 3-34). Fotemustinbehandlung verändert die XIAP-Expression in der resistenten Zelllinie D05 nicht. In der sensitiven Zelllinie D14 war XIAP bis auf eine schwache Bande nach 120 h Behandlung nicht nachweisbar. Die XAF1-Expression veränderte sich in der Zelllinie D05 ebenfalls nicht, während nach 120 h in der Zelllinie D14 eine leichte Reduktion zu beobachten war. Survivin ist in beiden Zelllinien 72 h nach

Ergebnisse

Behandlung stark herabreguliert und nach 120 h in D05 nicht bzw. in D14 nur noch schwach nachweisbar.

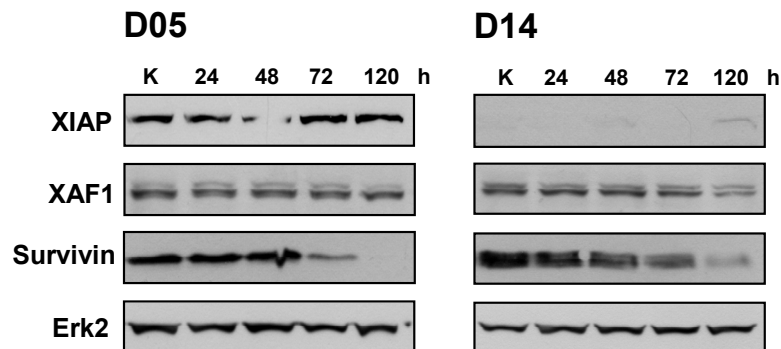


Abb. 3-34 Expression der Proteine XIAP, Survivin und XAF1 nach Fotemustinexposition

Die Zelllinien D05 und D14 wurden mit 10 μ M O⁶BG und mit 32 μ M Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen XIAP, XAF1 und Survivin. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle.

3.11.3 Einfluss von XIAP auf das Überleben nach Fotemustinbehandlung

Da die XIAP-Expression in der resistenten Zelllinie D05 auch nach Fotemustinbehandlung nicht beeinflusst wurde, sollte im nächsten Schritt die Herunterregulierung des Proteins mittels siRNA klären, ob XIAP einen Resistenzmarker darstellt. Wie in Abbildung 3-35 A gezeigt wird, konnte bereits eine Konzentration von 10 nM spezifischer XIAP siRNA das Proteinniveau nach 48 h in beiden Zelllinien um die 80% senken. Da eine Verfünffachung der siRNA-Menge nur zu einer marginalen Verbesserung der Reduktion führte, wurden alle folgenden Versuche mit einer siRNA-Konzentration von 10 nM durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie lange und wie effizient die siRNA in Zellkultur die Proteinexpression unterdrücken konnte (Abb. 3-35 B). Dafür wurden nach Transfektion für fünf Tage alle 24 h eine untransfizierte Kontrolle und eine transfizierte Probe geerntet und mittels Western-Blot-Analyse auf XIAP-Expression getestet. Für die Zelllinie D05 konnte nach 120 h eine maximale Reduktion des Proteins um 97% gegenüber der Kontrolle beobachtet werden, während bei D14-Zellen die maximale Reduktion nach 72 h (65%) beobachtet wurde, die nach 120 h auf 56% zurück ging.

Um den Effekt nach Fotemustinbehandlung zu testen, wurden nicht transfizierte Zellen mit Kontroll-siRNA transfizierten sowie mit spezifischer XIAP-siRNA transfizierte Zellen verglichen. Die Apoptoserate wurde nach 120 h mittels Durchflusszytometrie durch Bestimmung der SubG1-Fraktion ermittelt (Abb. 3-35 C). Der Vergleich zwischen nicht transfizierten und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zeigte, dass die Transfektion an

Ergebnisse

sich einen leicht toxischen Effekt auf beide Zelllinien hatte. Die Herunterregulation von XIAP dagegen sensibilisierte die Zellen nicht weiter, in der Zelllinie D05 zeigte dieser Ansatz sogar weniger Apoptose als die Transfektionskontrolle.

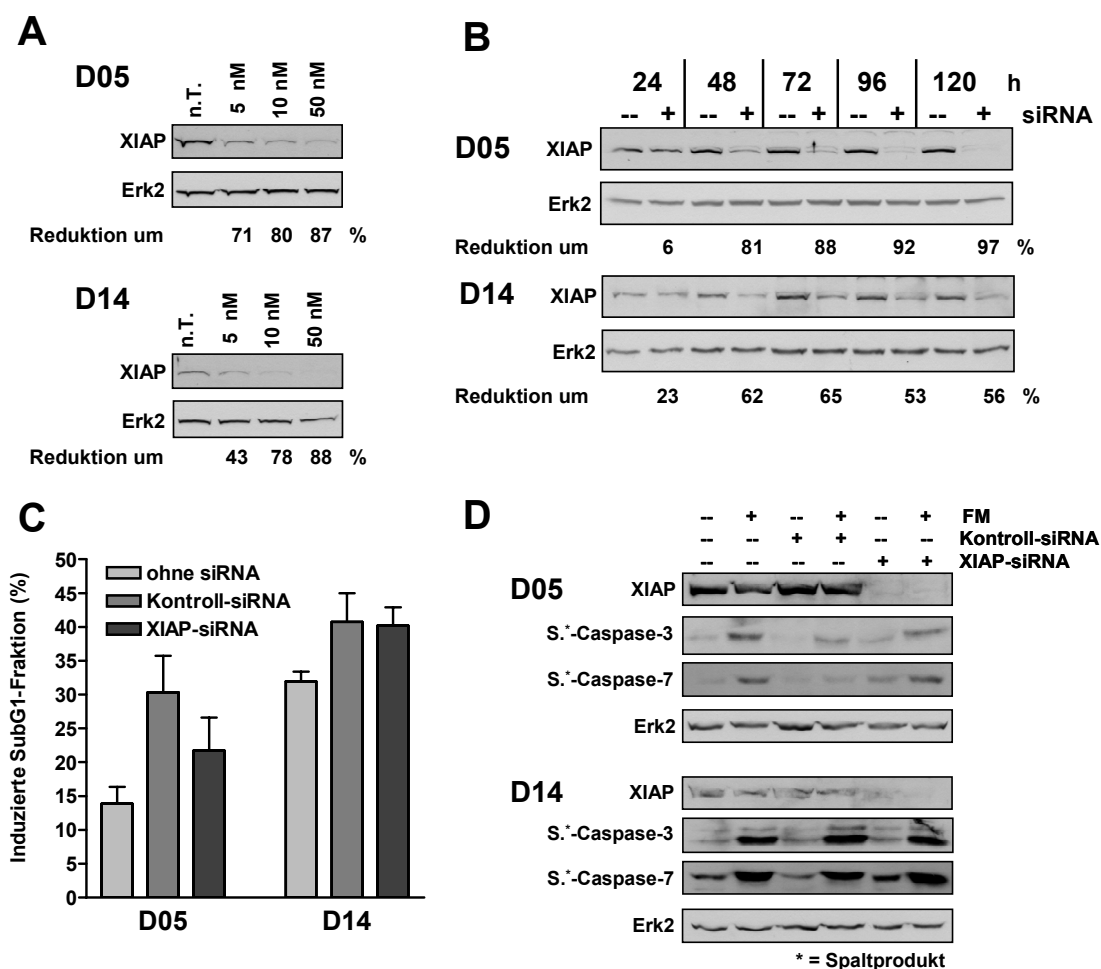


Abb. 3-35 Einfluss von XIAP auf die apoptotische Antwort nach Fotemustin

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von XIAP-siRNA transfiziert und für 48 h inkubiert. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion des Proteins erfolgte mittels eines polyklonalen XIAP-Antikörpers. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle. (B) D05- und D14-Zellen wurden nicht oder mit 10 nM XIAP-siRNA transfiziert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels eines polyklonalen XIAP-Antikörpers. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle. (C) D05- und D14-Zellen wurden nicht, mit 10 nM Kontroll-siRNA oder 10 nM XIAP-siRNA transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit 10 μ M O⁶BG und mit 32 μ M Fotemustin behandelt und für 120 h inkubiert. Die Bestimmung der SubG1-Fraktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie. (D) D05- und D14-Zellen wurden wie unter C beschrieben behandelt und nach 72 h Fotemustininkubation geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen XIAP, dem Spaltprodukt der Caspase-3 (p17 und p19) und dem Spaltprodukt der Caspase-7 (p20). Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle.

Ergebnisse

Zu einem der Ansätze, die mittels Durchflusszytometer ausgewertet wurden, wurden Proben parallel 96 h nach Transfektion bzw. 72 h nach Fotemustinbehandlung isoliert und auf Expression von XIAP und den Spaltprodukten der Effektorcaspasen-3 und -7 überprüft (Abb. 3-35 D). In beiden Zelllinien wurde XIAP herunterreguliert. Es konnte in den mit XIAP-siRNA transfizierten Zellen keine Erhöhung der Caspasespaltung im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Das antiapoptotische Protein XIAP hat daher in dem verwendeten Zellsystem keine resistenzfördernden Eigenschaften.

3.12 Untersuchung von DNA-schadensabhängigen Signalwegen

3.12.1 Aktivierung der ATM-Kinase nach Fotemustinexposition

Die Proteinkinase ATM, ATR und DNA-PK gelten als die Hauptsensorproteine für DNA-Schäden. Die Substrate dieser Kinasen sind, neben γ H2AX und p53 am Serin 15, u.a. die Stresskinasen Chk1 und Chk2, welche Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion p53 abhängig und unabhängig regulieren können (Matsuoka et al. 1998; Yang et al. 2002). Mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes Serin 1981 der Stresskinase ATM stand ein Aktivitätsmarker für dieses Protein zur Verfügung. D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt und zu verschiedenen Nachbehandlungszeiten zu Gesamtextrakten verarbeitet. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die phosphorylierte und nichtphosphorylierte Form von ATM, sowie die Phosphorylierung von Serin 15 des p53-Proteins untersucht. In beiden Zelllinien konnte phosphoryliertes ATM nach Behandlung detektiert werden (Abb. 3-36 A). Im Gegensatz zu D14-Zellen war die in D05-Zellen zu beobachtende Aktivierung schwächer und erst 48 h nach Behandlung zu detektieren. D14-Zellen zeigten schon 12 h nach Fotemustingabe phosphoryliertes ATM, welches nach 48 h sein höchstes Niveau erreichte. Die Untersuchung der ATM-Expression zeigte, dass die Zelllinie D05 im Vergleich zu D14-Zellen deutlich weniger ATM exprimiert. In beiden Zelllinien konnte nach Fotemustingabe die Phosphorylierung von p53 am Serin 15 detektiert werden (Abb. 3-36 B). Schon 12 h nach Behandlung wurde in beiden Zelllinien ein Signal nachgewiesen, welches sich im Verlauf der Nachbehandlungszeit verstärkte. D14-Zellen zeigten ein deutlich stärkeres Signal als D05-Zellen, besaßen als Träger einer mutierten Form des p53-Proteins aber auch eine allgemein höhere Proteinmenge. Daraus wird geschlossen, dass Fotemustin im untersuchten Zellsystem die Stresskinase ATM aktiviert.

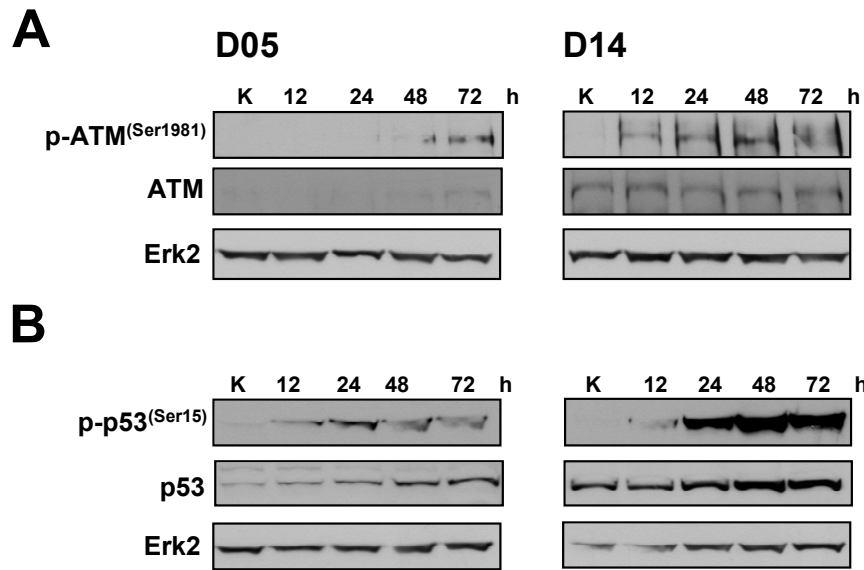


Abb. 3-36 Aktivierung der Stresskinase ATM nach Fotemustinexposition

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtextrakte der Ansätze in einer Western-Blot-Analyse eingesetzt und mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen Serin 1981 von ATM und einem Antikörper gegen ATM untersucht. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle. (B) D05- und D14-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Detektion der Proteine erfolgte hier mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen das Serin 15 von p53 und einem Antikörper gegen p53. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle.

3.12.2 Aktivierung der Checkpoint Kinase 1 nach Fotemustinexposition

Es konnte gezeigt werden, dass Fotemustin im untersuchten Zellsystem die Stresskinase ATM aktiviert. Für Untersuchungen Fotemustin-vermittelter Signale unterhalb der ATM-Kinase wurde die Aktivität der Checkpoint Kinase 1 überprüft. ATM und ATR vermögen Chk1 nach DNA-Schaden an den Serinresten 317 und 345 zu phosphorylieren und zu aktivieren (Zhao and Piwnicka-Worms 2001; Kurz et al. 2004). Mittels Western-Blot-Analyse wurden diese zwei Phosphorylierungstellen untersucht. Es wurden D05- und D14-Zellen mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt, nach verschiedenen Nachbehandlungszeiten gestoppt und Gesamtextrakte isoliert. In beiden Zelllinien konnte die Phosphorylierung an Serin 345 detektiert werden (Abb. 3-37 A). In D05-Zellen war eine transiente Aktivierung nach 18 h zu detektieren, welche 48 h nach Behandlung wieder deutlich abfiel. Im Gegensatz dazu war dieses Phosphorylierungssignal in D14-Zellen 18 und 48 h nach Behandlung gleichstark zu detektieren. Die Ergebnisse für die Phosphorylierung an Serin 317 unterstützten die vorherigen Daten (Abb. 3-37 B). Auch hier ist die Phosphorylierung in beiden Zelllinien nachzuweisen. In D05-Zellen wurde ein schwaches transientes Signal detektiert, welches 24 h nach Behandlung sein höchstes Niveau erreichte und weitere 24 h später nicht mehr nachzuweisen war. In D14-Zellen

Ergebnisse

konnte schon 12 h nach Behandlung die Phosphorylierung nachgewiesen werden. Dieses Signal war stärker und noch 72 h nach Behandlung konstant hoch. Die Untersuchung der Chk1-Expression zeigte einen Abfall des Gesamtproteins in D05-Zellen 48 h nach Behandlung. Nach 72 h Behandlung konnte kein Protein mehr detektiert werden. Das Chk1 Expressionsniveau in D14-Zellen war deutlich konstanter; es fiel 48 h nach Fotemustingabe nur leicht ab.

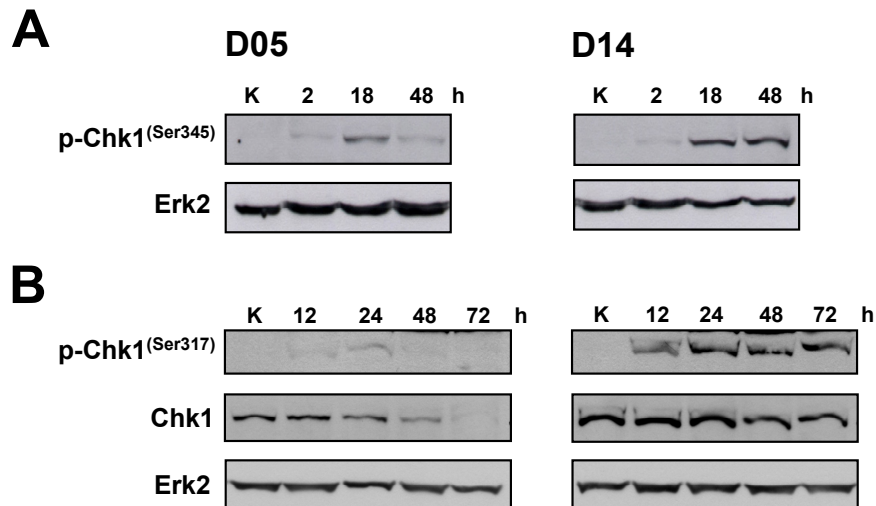


Abb. 3-37 Aktivierung der Checkpoint Kinase 1 nach Fotemustinexposition

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtextrakte der Ansätze in einer Western-Blot-Analyse eingesetzt und mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen Serin 345 von Chk1 inkubiert und detektiert. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle. (B) D05- und D14-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Detektion der Proteine erfolgte hier mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen das Serin 317 von Chk1 und einem Antikörper gegen Chk1. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle.

3.12.3 Aktivierung der Checkpoint Kinase 2 nach Fotemustinexposition

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ATM und Chk1 nach Fotemustinexposition aktiviert wird, sollte dies auch für die Checkpoint Kinase 2, untersucht werden. Die Aktivität von Chk2 wurde durch den Phosphorylierungsstatus des Threonin 68 mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Ahn et al. 2002). Zusätzlich wurde die Phosphorylierung von Serin 20 des p53-Proteins untersucht, eine spezifisch durch Chk2-vermittelte Phosphorylierung (Chehab et al. 2000). D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten zu Gesamtextrakten verarbeitet. In D05-Zellen konnte 24 h nach Fotemustingabe eine deutlich Phosphorylierung von Threonin 68 des Chk2-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 3-38 A). Diese war 120 h nach Behandlung noch zu

Ergebnisse

detektieren. In D14-Zellen konnte mit dem verwendeten Antikörper keine eindeutige Aussage getroffen werden. Auch in der unbehandelten Kontrolle wurde für die entsprechende Proteingröße ein Signal detektiert. Eine Zunahme nach Behandlung wurde nicht beobachtet. In beiden Zelllinien konnte Chk2-Gesamtprotein detektiert werden. Die Chk2-vermittelten Phosphorylierung von Serin 20 des p53-Proteins konnte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 3-38 B). In D05-Zellen wurde ein schwaches Signal 48 und 72 h nach Fotemustingabe detektiert. In D14-Zellen wurde eine deutliche Phosphorylierung ab 24 h nach Behandlung nachgewiesen. Die Ergebnisse beider phosphospezifischen Antikörper zeigten, dass Fotemustin in Melanomzellen die Checkpoint Kinase 2 zu aktivieren vermag.

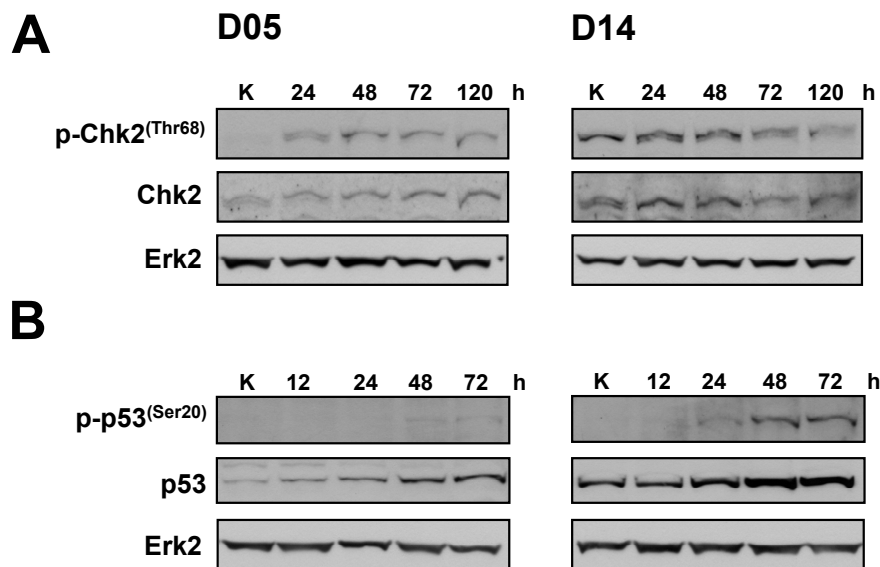


Abb. 3-38 Aktivierung der Checkpoint Kinase 2 nach Fotemustinexposition

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtextrakte der Ansätze in einer Western-Blot-Analyse eingesetzt und mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen Threonin 68 von Chk2 und einem Antikörper gegen Chk2 untersucht. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle. (B) D05- und D14-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Detektion der Proteine erfolgte hier mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen das Serin 20 von p53 und einem Antikörper gegen p53. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle.

3.12.4 Untersuchung verschiedener Phosphorylierungsstellen des p53-Proteins

Um weitere Rückschlüsse auf eine Beteiligung von Signaltransduktionswegen nach Fotemustinbehandlung zu ziehen, wurden mehrere Phosphorylierungsstellen des p53-Proteins in den beiden Zelllinien D05 und D14 untersucht. Dazu wurden D05- und D14-Zellen mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und nach 48 h geerntet.

Ergebnisse

Gesamtextrakte wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Phosphorylierung der Serine 6, 9, 15, 20, 37, 46 und 392 untersucht. p53-Gesamtprotein und p21 dienten als Kontrolle für p53-Stabilisierung und transkriptionelle Aktivität. In Abbildung 3-39 konnten die bereits beschriebenen Ergebnisse in Bezug auf p53-Stabilisierung und transkriptionelle Aktivität der beiden Zelllinien D05 und D14 bestätigt werden (siehe 3.5). Neben den ebenfalls bereits beschriebenen Phosphorylierungen der Serinreste 15 und 20 in beiden Zelllinien konnte für D05-Zellen eine sehr schwache Phosphorylierung des Serin 37 und eine Phosphorylierung an Serin 392 nachgewiesen werden. D14-Zellen zeigten ein starkes Phosphorylierungssignal an Serin 37. Ein gleichstarkes Signal zwischen Kontrolle und behandelten D14-Zellen in der erwarteten Proteingröße wurde für die Serine 6, 9 und 392 detektiert.

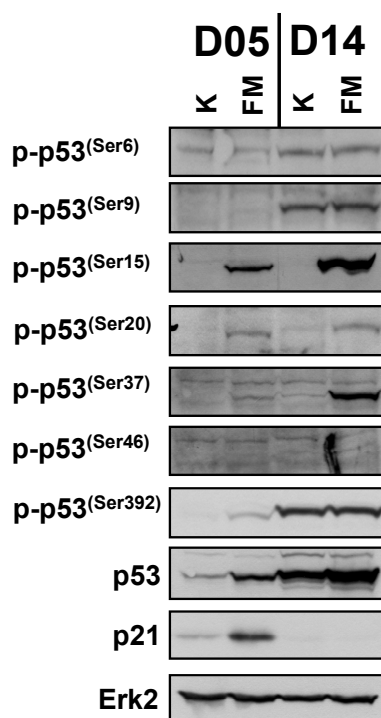


Abb. 3-39 Phosphorylierungsstudien am p53-Protein nach Fotemustinexposition

D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und nach 48 h Inkubation zu Gesamtextrakten verarbeitet. Mittels Western-Blot-Analyse wurden phosphospezifische Antikörper gegen die Serine 6, 9, 15, 20, 37, 46 und 392 des p53-Proteins, sowie p53-Gesamtprotein und p21 untersucht. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle.

3.13 Der Rb/E2F-1/p73-vermittelte Apoptoseweg

Der Transkriptionsfaktor E2F-1 spielt in der Zellzyklusregulation eine entscheidende Rolle. Seine Aktivierung fördert die Expression von S-Phasegenen, welche der Zelle den Übergang von der G1- bzw. G0-Phase in die S-Phase ermöglicht (Pardee et al. 2004). Für E2F-1 wurde ebenfalls eine Rolle in der Apoptoseinduktion beschrieben. E2F-1 reguliert direkt die Expression von APAF-1, eine Untereinheit des Apoptosoms und das p53-Homologe p73 (Irwin et al. 2000; Moroni et al. 2001). Es sollte untersucht werden, ob der

Ergebnisse

Transkriptionsfaktor E2F-1 als alternativer Weg der Apoptoseinduktion in p53 mutierten Melanomzellen eine Rolle spielt.

3.13.1 Untersuchungen der E2F-1 Expression und Regulation nach Fotemustinexposition

Um die Regulierung von E2F-1 auf der Ebene der mRNA zu untersuchen, wurden D05- und D14-Zellen mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt. Zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten wurde mRNA isoliert und nach Synthese der entsprechenden cDNA mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 3-40 A). *e2f-1* wurde auf mRNA-Ebene in D05-Zellen nach 12 h Behandlung leicht heraufreguliert. Die mRNA-Menge nahm danach stetig ab, bis 72 h nach Behandlung kaum ein Signal mehr nachweisbar war. Im Gegensatz dazu wurde in D14-Zellen *e2f-1* auf mRNA-Ebene nach Fotemustingabe deutlich heraufreguliert.

Um diese Beobachtung zu untermauern, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, wobei neben E2F-1 auch das Rb-Protein und dessen Phosphorylierungsstatus untersucht wurden. Dazu wurden D05- und D14-Zellen mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten zu Gesamtzellextrakten aufbereitet und analysiert (Abb. 3-40 B). Auch mittels Western-Blot-Analyse konnte in D05-Zellen die Herunterregulation der E2F-1-Expression nach Behandlung nachgewiesen werden. Eine Abnahme im Phosphorylierungsstatus des Rb-Proteins sowie in der Gesamtexpression des Rb-Proteins wurde detektiert. In D14-Zellen konnte die Heraufregulation von E2F-1 auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu D05-Zellen blieb das Niveau von phosphorylierten Rb sowie die Gesamtexpression des Rb-Protein nahezu konstant.

E2F-1 muss, um transkriptionelle Aktivität auszuüben, im Zellkern lokalisiert sein. Um zu überprüfen, ob es zu einer Anreicherung von E2F-1 im Zellkern kommt, wurden D05- und D14-Zellen mit Fotemustin behandelt, zu Kernextrakten aufbereitet und mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 3-40 C). In D05-Zellen konnte eine transiente Anreicherung von E2F-1 nach 24 und 48 h detektiert werden. 72 h nach Behandlung lag das E2F-1-Niveau im Bereich der unbehandelten Kontrolle. In D14-Zellen konnte dagegen eine starke Anreicherung von E2F-1 schon 12 h nach Behandlung detektiert werden. Die Anreicherung war bis 72 h nach Behandlung konstant hoch. In den sensitiven D14-Zellen scheint der durch Fotemustin induzierte DNA-Schaden zu einer Herausregulierung von E2F-1 zu führen.

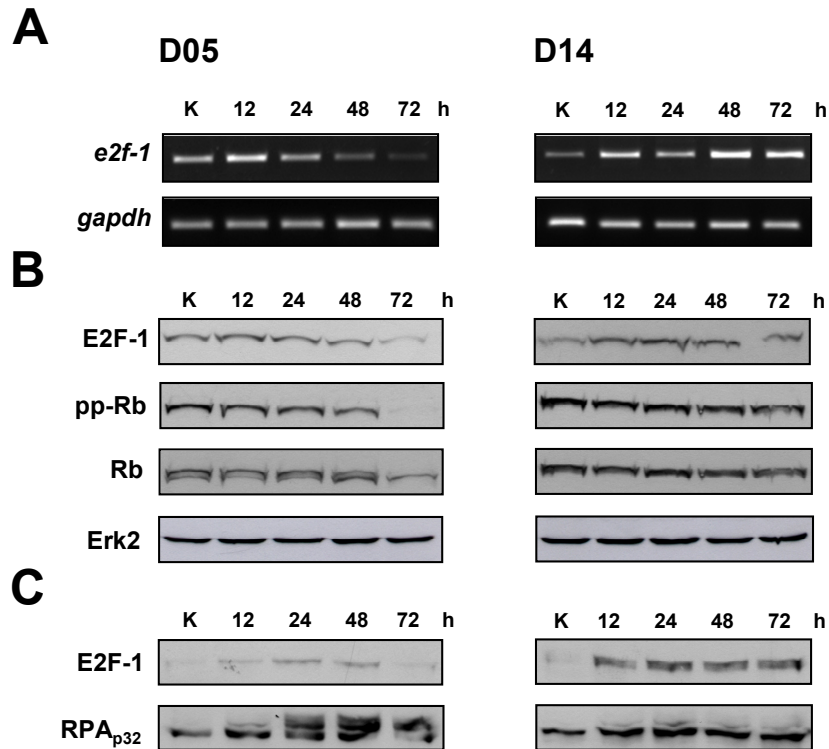


Abb. 3-40 Expression der Gene E2F-1 und Rb nach Fotemustinexposition

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurde cDNA von der isolierten mRNA hergestellt und mit spezifischen Primern in qRT-PCR eingesetzt. *gapdh* diente als Ladekontrolle. (B) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen E2F-1, Rb-Protein und phosphoryliertem Rb-Protein an den Serinen 807 und 811. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle. (C) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurden Kernextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen E2F-1. Anti-RPA_{p32} diente als Ladekontrolle.

3.13.2 Untersuchungen der Expression von E2F-1-regulierten, proapoptischen Genen nach Fotemustinexposition

Es konnte gezeigt werden, dass E2F-1 in der sensitiven, p53 mutierten Zelllinie D14 nach Fotemustinexposition heraufreguliert wird. Eine deutliche Akkumulation des Proteins konnte nach Behandlung im Zellkern nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob E2F-1 auch transkriptionelle Aktivität zeigt, wurde die Expression der proapoptischen Transkriptionsprodukte Apaf-1 und TAp73 untersucht. D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt. Anschließend wurde mRNA zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten isoliert. Nach Synthese der entsprechenden cDNA wurden qRT-PCRs durchgeführt. Wie in Abbildung 3-41 A gezeigt, wurde in D05-Zellen die Expression von *apaf-1* mRNA nach Fotemustingabe nicht beeinflusst. *TAp73* mRNA war in D05-Zellen nicht nachweisbar. In D14-Zellen konnte für die Expression von

Ergebnisse

apaf-1 eine leichte Verstärkung nachgewiesen werden. *TAp73* mRNA wurde nach Fotemustinbehandlung deutlich vermehrt exprimiert (Abb. 3-41 A). Das Expressionsmuster der p53-regulierten, N-terminal verkürzten Variante des p73-Genes ($\Delta Np73$) mit antiapoptotischen Eigenschaften wurde in Abbildung 3-41 B gezeigt. Eine starke Heraufregulation von $\Delta Np73$ bis 24 h nach Behandlung konnte in der p53-Wildtypzelllinie D05 nachgewiesen werden. In den p53-mutierten D14-Zellen war $\Delta Np73$ mRNA nicht nachweisbar. Um die in qRT-PCR gewonnenen Ergebnisse auf Proteinebene zu überprüfen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Es wurden D05- und D14-Zellen mit 10 μM O⁶BG und 32 μM Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten zu Gesamtzellextrakten aufbereitet und analysiert (Abb. 3-41 C). In D05-Zellen konnte keine Veränderung im Proteinniveau von Apaf-1 detektiert werden. Auch die leichte Heraufregulation der *apaf-1* mRNA in D14-Zellen konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Das detektierte Protein blieb über die Behandlungszeit gleich stark exprimiert. Die für die Produkte der Gene *TAp73* und $\Delta Np73$ zu Verfügung stehenden Antikörper lieferten keine verwertbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt); möglicherweise waren sie nicht spezifisch genug.

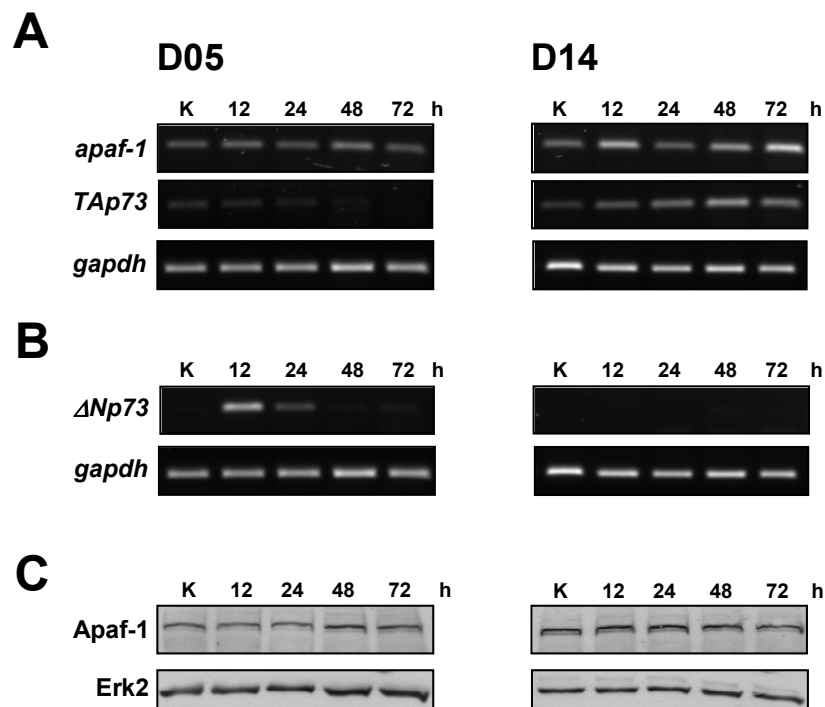


Abb. 3-41 Expression der Gene Apaf-1, TAp73 und $\Delta Np73$ nach Fotemustinexposition

(A + B) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurde cDNA von der isolierten mRNA hergestellt und mit spezifischen Primern in qRT-PCR eingesetzt. *gapdh* diente als Ladekontrolle. (C) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Apaf-1. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle.

3.13.3 Untersuchung von proapoptotischen Genen der Bcl-2 Familie

Es wurde gezeigt, dass Fotemustin den proapoptotischen Transkriptionsfaktor *TAp73* in der p53 mutierten Zelllinie D14 auf mRNA-Ebene heraufregulieren kann. Es sollte nun untersucht werden, ob die drei proapoptotischen Zielgene von *TAp73*, *bax* (Soond et al. 2007), *nox*a (Flinterman et al. 2005) und *puma* (Melino et al. 2004), in diesen Zellen ebenfalls eine erhöhte Expression nach Behandlung zeigen. D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten wurde mRNA isoliert. Nach Synthese der entsprechenden cDNA wurden qRT-PCRs durchgeführt. In der p53-Wildtypzelllinien D05 konnte keine Veränderung in den Expressionsniveaus von *bax* und *puma* beobachtet werden (Abb. 3-42 A). *nox*a mRNA wurde in den ersten 24 h leicht vermehrt exprimiert, das Niveau sank aber nach 48 h wieder deutlich ab. Im Gegensatz dazu konnte in D14-Zellen nach Behandlung eine leichte Zunahme der *bax* und *puma* mRNA und eine starke Zunahme der *nox*a mRNA detektiert werden. Die Daten wurden auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen überprüft. Es wurden D05- und D14-Zellen mit 10 μ M O⁶BG und 32 μ M Fotemustin behandelt und zu unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten zu Gesamtzellextrakten aufbereitet und analysiert (Abb. 3-42 B). In der p53-Wildtyp Zelllinie D05 wurde Bax heraufreguliert. Das *puma*-Gen codiert zwei Proteine: Puma- α und Puma- β (Nakano and Vousden 2001). In D05-Zellen wurde ausschließlich Puma- α heraufreguliert. Noxa war in D05-Zellen bis 12 h nach Behandlung schwach detektierbar. Die durch Western-Blot-Analyse gewonnenen Daten stehen in D05-Zellen im Widerspruch zu den korrespondierenden qRT-PCR Daten. Ebenfalls im Widerspruch zu den durch qRT-PCR gewonnenen Ergebnissen wurde Noxa und Puma in D14-Zellen nicht heraufreguliert. Noxa konnte nicht detektiert werden. Nur die Expression von Bax wurde leicht heraufreguliert. Die vermehrte Expression der Gene Bax, Noxa und Puma konnte in p53 mutierten D14-Zellen auf mRNA-Ebene, nicht aber auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die fehlende Induktion der Zielgene *nox*a und *puma* auf Proteinebene lassen Zweifel an der biologischen Relevanz der durch E2F-1/*TAp73* regulierten RNA-Synthese in D14-Zellen aufkommen.

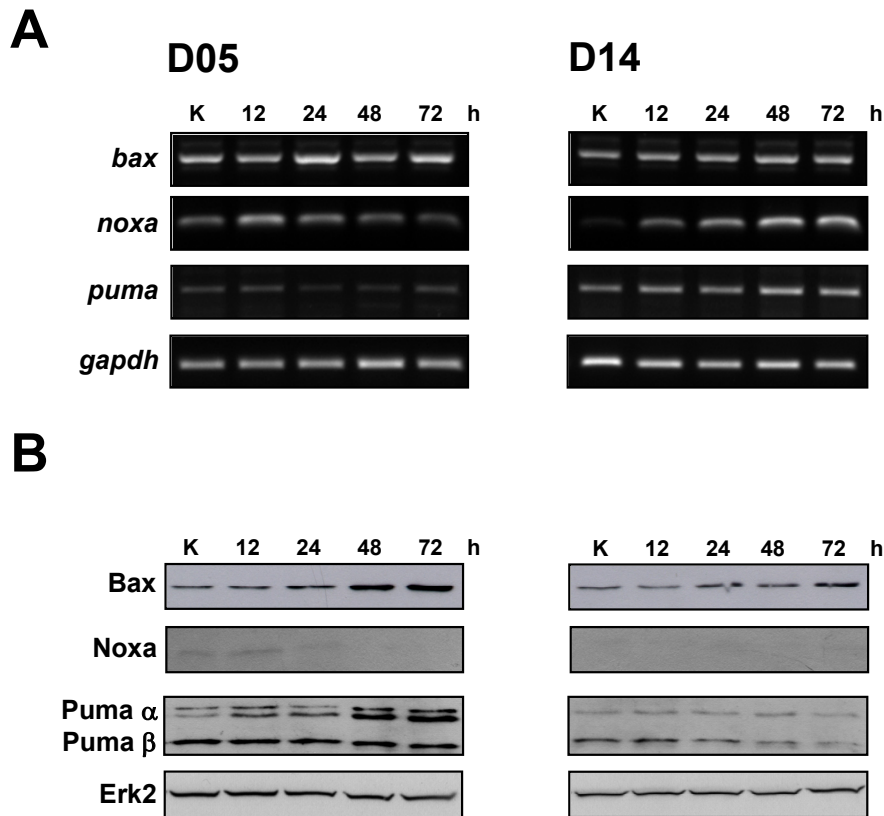


Abb. 3-42 Expression der Gene Bax, Noxa und Puma nach Fotemustininexposition

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurde cDNA von der isolierten mRNA hergestellt und mit spezifischen Primern in qRT-PCR eingesetzt. *gapdh* diente als Ladekontrolle. (B) D05- und D14-Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG und mit 32 μM Fotemustin inkubiert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Bax, Noxa und Puma. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle.

3.12.4 Einfluss von E2F-1 auf das Überleben nach Fotemustinbehandlung

Um funktionell zu untersuchen, ob Fotemustin im untersuchten Zellsystem E2F-1-vermittelte Apoptose induziert, wurden siRNA gestützte Depletionsversuche gegen E2F-1 durchgeführt. Wie in Abbildung 3-43 A gezeigt wird, konnte bereits eine Konzentration von 5 nM spezifischer E2F-1 siRNA das Proteinniveau nach 48 h in beiden Zelllinien um ca. 70% senken. Eine Verzehnfachung der siRNA-Menge führt zu keiner deutlichen Verbesserung der Reduktion. Alle folgenden Versuche wurden daher mit einer siRNA-Konzentration von 5 nM durchgeführt. Um den Zeitraum der siRNA gestützten E2F-1 Reduktion zu untersuchen, wurde nach Transfektion für fünf Tage alle 24 h eine untransfizierte Kontrolle und eine transfizierte Probe geerntet und mittels Western-Blot-Analyse auf E2F-1 Expression getestet (Abb. 3-43 B). Aus dem Durchschnittswert aus zwei Western-Blot-Analysen konnte für die Zelllinie D05 nach 72 h eine maximale Reduktion des Proteins um 81% gegenüber der Kontrolle beobachtet werden, die bis 120 h

Ergebnisse

nach Transfektion konstant blieb. Die maximale Reduktion für D14-Zellen wurde nach 48 h mit 72% gemessen. Sie fiel bis 120 h nach Transfektion auf 61% ab. Um den Effekt nach Fotemustinbehandlung zu testen, wurden nicht transfizierte Zellen, mit Kontroll-siRNA transfizierten sowie mit spezifischer E2F-1-siRNA transfizierten Zellen verglichen. Die Apoptoserate wurde 120 h nach Behandlung mittels Durchflusszytometrie durch Bestimmung der SubG1-Fraktion ermittelt (Abb. 3-43 C).

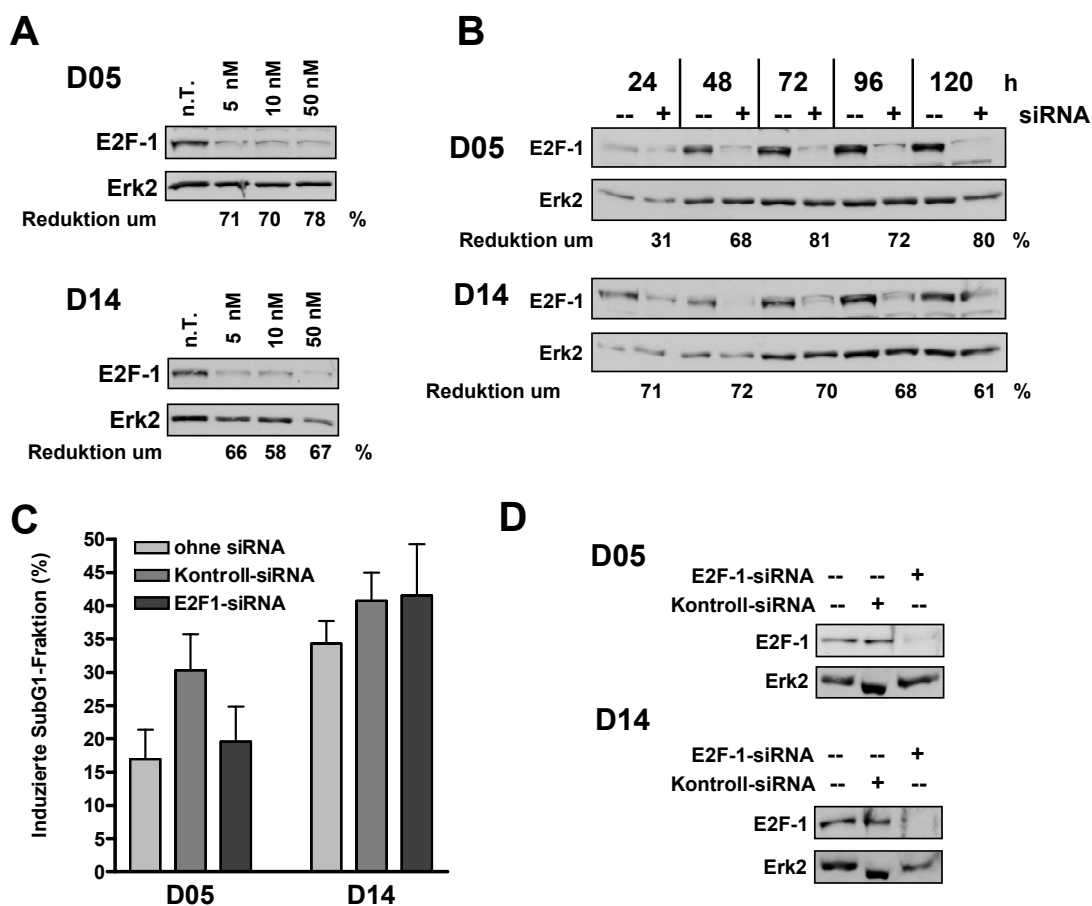


Abb. 3-43 Einfluss von E2F-1 auf die apoptotische Antwort nach Fotemustin

(A) D05- und D14-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von E2F-1-siRNA transfiziert und für 48 h inkubiert. Es wurden Gesamtzell-extrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion des Proteins erfolgte mittels einem E2F-1-Antikörper. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle. (B) D05- und D14-Zellen wurden nicht oder mit 5 nM E2F-1-siRNA transfiziert und zu unterschiedlichen Behandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtzell-extrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels einem E2F-1-Antikörper. Anti-Erk2 diente als interne Ladekontrolle. Die ermittelte Reduktion stellt den Mittelwert aus zwei Western-Blot-Analysen dar. (C) D05- und D14-Zellen wurden nicht, mit 5 nM Kontroll-siRNA oder 5 nM E2F-1-siRNA transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit 10 μ M O⁶BG und mit 32 μ M Fotemustin behandelt und für 120 h inkubiert. Die Bestimmung der SubG1-Fraktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie. (D) D05- und D14-Zellen wurden parallel mit einem Ansatz wie unter C beschrieben transfiziert und nach 72 h geerntet. Es wurden Gesamtzell-extrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels Antikörper gegen E2F-1. Anti-Erk2 diente als Ladekontrolle.

Ergebnisse

Der Vergleich zwischen nicht transfizierten und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zeigte, dass die Transfektion an sich einen leicht toxischen Effekt auf beide Zelllinien hatte. Die Herunterregulation von E2F-1 dagegen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate beider Zelllinien. Als Expressionskontrolle wurden D05- und D14 72 h nach siRNA-Transfektion geerntet und mittels Wester-Blot-Analyse auf E2F-1 Expression untersucht. Ausschließlich in der Kontrolle mit E2F-1-siRNA war das Protein nicht mehr nachweisbar, während die verwendete Kontroll-siRNA keinen Effekt auf die E2F-1 Expression hatte (Abb. 3-43 D). E2F-1 hat dementsprechend keinen Effekt auf die Fotemustin-vermittelte Apoptose.

4 Diskussion

4.1 Mechanismen der Alkylantien-vermittelten Zytotoxizität in malignen Melanomzellen

Die Mittel erster Wahl für die Behandlung metastasierender maligner Melanome sind u.a. monofunktional methylierende Agenzien wie Temozolomid, sowie ICLs-induzierende CENU-Derivate wie Fotemustin (Jacquillat et al. 1990; Bleehen et al. 1995; Middleton et al. 2000; Mornex et al. 2003). Beide Agenzien wirken antineoplastisch, können aber, abhängig vom zellulären System, zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen führen (Roos and Kaina 2006; Kaina et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Melanomzellsystem untersucht, das aus den Zelllinien D03, D05, D14, SK29, MeWo und MZ7 bestand, welche aus metastasierenden malignen Melanomen etabliert worden sind. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Fotemustin als auch Temozolomid zytotoxisch auf dieses Melanomzelllinien wirken. Die für die Untersuchungen gewählte Dosis beider Alkylantien lag im Bereich der klinischen Relevanz (Fety et al. 1992; Dhodapkar et al. 1997).

Die Verwendung des MGMT-Inhibitors O⁶BG erlaubte die Untersuchung der Zelllinien-spezifischen Sensitivität unabhängig vom MGMT-Status. Trotz einer Inaktivierung von MGMT reagierten die Zelllinien unterschiedlich sensitiv auf die Behandlung mit den beiden Zytostatika Temozolomid und Fotemustin. Maligne Melanome reagieren hoch resistent gegenüber chemotherapeutischen Behandlungen (Soengas and Lowe 2003). Unterschiede in der Sensitivität könnten somit auf vorhandenen Resistenzen der untersuchten Melanomzelllinien beruhen. Obwohl Fotemustin und Temozolomid unterschiedliche DNA-Schäden induzieren und diese verschieden prozessiert werden, reagierten die untersuchten Zelllinien auf beide Agenzien ähnlich sensitiv. So reagierten z.B. die Zelllinien D03 und SK29 auf Fotemustin und Temozolomid hoch sensitiv, während die Zelllinie D05 eine hohe Resistenz gegenüber beiden Agenzien zeigte. Dies lässt vermuten, dass nicht nur die Natur des DNA-Schadens, sondern auch tumorspezifische Resistenzmerkmale ausschlaggebend für eine erfolgreiche Behandlung mit alkylierenden Chemotherapeutika sind. Das gewählte Zellsystem bietet die Möglichkeit, die zytotoxischen Wirkmechanismen der zur Therapie verwendeten Alkylantien sowie die beteiligten Resistenzmechanismen an Melanomzellen zu untersuchen.

4.1.1 Alkylantien bedingter Zelltod wird in Melanomzellen durch Apoptose vermittelt

Apoptose und Nekrose sind die beiden Hauptmechanismen, durch die Zellen nach Schädigung der DNA zugrunde gehen (Gonzalez et al. 2001; Festjens et al. 2006; Roos and Kaina 2006). Der Mechanismus der durch Alkylantien induzierte Zytotoxizität ist in Melanomzellen bisher kaum beschrieben worden; er wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit ausführlich untersucht.

Temozolomid ist als potenter Initiator von Apoptose in verschiedenen Zellsystemen, wie Gliomzellen oder Lymphozyten beschrieben worden (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007). Obwohl Temozolomid wie auch das ähnlich wirkende Dacarbazin für die Therapie von Melanomen weit verbreitet ist, wurde Apoptoseinduktion nach Gabe dieser methylierenden Alkylanzien für Melanome bisher nicht berichtet. Mhaidat et al. beschreibt den nach Temozolomidbehandlung induzierten Zelltod in einem Melanomzellsystem als nicht apoptotisch (Mhaidat et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Zelllinien D03, D05, D14, MeWo und SK29 nach Temozolomidgabe eine Zunahme der SubG1-Fraktion beobachtet. Bei der Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz überwog in vier von fünf Zelllinien die apoptotische Fraktion deutlich (ca. 65-85%). In D14-Zellen wurde ein Verhältnis zwischen Apoptose und Nekrose von 1:1 ermittelt. Die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 sowie die Caspasen-vermittelte Spaltung von PARP-1 konnte in vier von fünf Zelllinien nachgewiesen werden. Das Aktivierungsniveau der Caspasen spiegelte hierbei die Sensitivität der einzelnen Zelllinien wider. Nur in der Zelllinie MeWo waren diese drei Parameter (Caspase-3 und -7 Aktivierung und PARP-1 Spaltung) nicht nachweisbar. Somit konnte durch den Einsatz von vier unabhängigen Methoden (Bestimmung der SubG1- und der Apoptose- / Nekrose-Frequenz sowie Aktivierung der Caspasen-3 und -7 und Spaltung von PARP-1) Apoptose zweifelsfrei als Hauptmechanismus für die Temozolomid-vermittelte Zytotoxizität charakterisiert werden.

Ein Grund für die Widersprüche zwischen den in dieser Arbeit gewonnenen Daten und denen von Mhaidat et al. kann in dem für die Untersuchung gewählten Zeitfenster nach Temozolomidbehandlung liegen. Mhaidat et al. untersuchte die apoptotischen Marker Caspase-3 und PARP-1 zwischen 24 und 72 h nach Behandlung. Nach einem akzeptierten Modell wird die Temozolomid-vermittelte Apoptose aber erst sehr spät, nach dem Durchlaufen von mindestens zwei Zellzyklen nach Gabe des Alkylanz, initiiert (Kaina et al. 2007). Durch den zusätzlich durch Temozolomid verursachten Zellzyklusblock kann in

Diskussion

Gliomzellen die Apoptoseinduktion erst 3-6 Tagen nach Behandlung einsetzen (Roos et al. 2007). In der vorliegenden Studie konnte 5 Tage nach Temozolomidbehandlung aktive Caspase-3 und gespaltenes PARP-1 nachgewiesen werden. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass in der Arbeit von Mhaidat et al. die apoptotischen Marker zu früh untersucht wurden (Mhaidat et al. 2007).

Die zytotoxische und antineoplastische Wirkung von Fotemustin und anderen CENU-Derivaten ist seit langem bekannt (Tapiero et al. 1989; Fischel et al. 1990). Apoptoseinduktion nach BCNU- und ACNU-Gabe wurde erst kürzlich für Gliomzellen nachgewiesen (Batista et al. 2007). In Melanomzellen wirkt Fotemustin von allen CENU-Derivaten am effektivsten zytotoxisch (Tapiero et al. 1989) und ist folgerichtig das einzige Mittel dieser Stoffklasse, welches zur Zeit als Monotherapeutikum zur Behandlung des malignen Melanoms zum Einsatz kommt. Der Mechanismus der Fotemustin-vermittelten Zytotoxizität in Melanomen wurde bisher kaum untersucht. Passagne et al. beschreibt bisher als einziger die Fotemustin-induzierte Zytotoxizität für die Melanomzelllinie A375 als durch Apoptose bedingt (Passagne et al. 2003). Die Auswirkung von Fotemustin auf das untersuchte Melanomzellsystem wurde ebenfalls mit den vier Methoden, welche für den Apoptosenachweis nach Temozolomidgabe Verwendung fanden, untersucht. Die Zelllinien D03, D05, D14, SK29 und MeWo zeigten nach Fotemustinbehandlung eine Zunahme der SubG1-Fraktion. Die Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz ergab in vier von fünf Zelllinien ein deutliches Übergewicht der apoptotische Fraktion (ca. 70-80%). In D14-Zellen überwog die apoptotische Fraktion nur leicht gegenüber der nekrotischen Fraktion mit dem Verhältnis von 60% zu 40%. Die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 konnte für die drei sensitivsten Zelllinien D03, D14 und SK29 nachgewiesen werden. Die Spaltung von PARP-1 wurde in allen fünf Zelllinien nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte somit auch der durch Fotemustin ausgelöste Zelltod als Apoptose charakterisiert werden. Im Gegensatz zu Passagne et al. erfolgte der Apoptosenachweis mit einem aus fünf Zelllinien bestehenden Zellsystem und über vier unabhängige Methoden (Passagne et al. 2003).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der durch Temozolomid und Fotemustin in Melanomzellen hervorgerufene Zelltod durch die Induktion von Apoptose erfolgt. Die Einbeziehung von fünf Zelllinien in die Untersuchung und das Anwenden von vier unabhängigen Methoden belegen die Apoptoseinduktion in Melanomzellen zweifelsfrei.

4.1.2 Die Alkylierung der Position O⁶ des Guanins ist die wichtigste toxische Läsion, welche von Fotemustin und Temozolomid ausgeht, und MGMT ein entscheidender Resistenzmarker

Fotemustin und Temozolomid alkylieren die DNA an 13 verschiedenen Positionen (Kaina et al. 2007). Die Bedeutung der Alkylierungen an der Position O⁶ des Guanins (O⁶ClEtG und O⁶MeG) ist umfassend untersucht worden. Dass die Alkylierung der Position O⁶ des Guanins entscheidend für die Vermittlung von Zytotoxizität ist, wurde bereits für die Agenzien Fotemustin (Gonzaga et al. 1992; Vassal et al. 1998; Christmann et al. 2001; Passagne et al. 2003) und Temozolomid (Pepponi et al. 2003; Roos et al. 2004; Chinot et al. 2007; Roos et al. 2007) nachgewiesen. Die Bedeutung der Alkylierung an der O⁶-Position des Guanins für das untersuchte Melanomzellsystem wurde anhand MGMT positiver Zelllinien (MeWoF40 und D05) und durch Transfektionsexperimente mit einem MGMT-Expressionsvektor wie folgt geklärt:

Die Zelllinie MeWoF40 ist eine Subzelllinie von MeWo, welche durch kontinuierliche Fotemustinbehandlung gegen dieses Alkylanz resistent wurde (Christmann et al. 2001). Der Resistenzerwerb konnte auf einer verstärkten Expression des MGMT-Proteins zurückgeführt werden (MGMT-Aktivität von über 1100 fmol/mg Protein im Vergleich zu 12 fmol/mg Protein der Ausgangszelllinie). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des MGMT-Status gegenüber Alkylantienbehandlung mittels des MGMT-Inhibitors O⁶BG funktionell untersucht. O⁶BG wirkt als Pseudosubstrat für MGMT und inaktiviert dieses. Fotemustin- und Temozolomidbehandlung haben auf MeWoF40-Zellen keine zytotoxische Wirkung. Nach MGMT-Inhibition mittels O⁶BG reagierten MeWoF40-Zellen auf Fotemustin- und auf Temozolomidbehandlung sensitiv. Da MGMT spezifisch Alkylierungen von der O⁶-Position des Guanins entfernt (Daniels and Tainer 2000), spricht dieser Befund für O⁶-Alkylguanin als die entscheidende zytotoxische Läsion der beiden Alkylantien.

Die MGMT-Aktivität von D05-Zellen liegt um eine Zehnerpotenz niedriger als die von MeWoF40-Zellen (ca. 1100 versus 122 fmol/mg Protein). In D05-Zellen reichte die Menge an MGMT-Molekülen nicht aus, um nach Behandlung mit den Alkylantien alle Läsionen an der Position O⁶ des Guanins zu eliminieren. Nach Fotemustingabe lagern sich die nicht reparierten O⁶ClEtG-Läsionen zu hochtoxischen ICLs um (Tong et al. 1982), welche einen moderaten Anstieg der Apoptoserate erklären. Zusätzliche Depletierung von MGMT führt zu mehr ICLs und dadurch zu einer höheren Apoptoserate. Dieser Effekt trat nicht nach Temozolomidgabe auf. Die Menge der nicht reparierten O⁶MeG-Läsionen

Diskussion

schien nicht auszureichen, um zytotoxisch zu wirken. Dies zeigt, dass die vorhandene Menge an MGMT-Protein in den Melanomzellen entscheidend für die Reparatur von O⁶-Alkylguaninläsionen nach Fotemustin- und Temozolomidbehandlung ist.

In MGMT negativen Melanomzellen rief eine Zusätzliche Behandlung mit dem MGMT-Inhibitors O⁶BG keine Unterschiede in der Alkylantien-vermittelten Apoptoserate hervor (Daten nicht gezeigt). Umgekehrt konnte für die MGMT negative Zelllinie SK29 gezeigt werden, dass eine Erhöhung der MGMT-Expression, welche durch transiente Transfektion eines MGMT-Expressionsvektors erzielt wurde, die Apoptoserate nach Fotemustin- und Temozolomidbehandlung signifikant erniedrigte.

MGMT repariert spezifisch Alkylierungen an der O⁶-Position des Guanins (Daniels and Tainer 2000; Kaina et al. 2007) und an der O⁴-Position des Thymins (Kaina et al. 2007). Da auch Alkylierungen an der O⁴-Position des Thymins durch Temozolomid erzeugt werden (Beranek 1990; Kaina et al. 2007), wäre es prinzipiell möglich, dass O⁴MeT zur Zytotoxizität von Temozolomid beiträgt. Da jedoch diese Läsion in weit geringeren Mengen (<0,4% der Gesamtalkylierungen) als O⁶MeG (ca. 5% der Gesamtalkylierungen) induziert wird (Newlands et al. 1997; Kaina et al. 2007), ist es unwahrscheinlich, dass O⁴MeT einen signifikanten Einfluss auf die durch Temozolomid induzierte Zytotoxizität nimmt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im untersuchten Melanomzellsystem hauptsächlich die Läsionen am O⁶-Guanin für die Zytotoxizität verantwortlich sind. Die Höhe der MGMT-Expression spiegelt das Ausmaß der Apoptoseinduktion wider und spielt folglich als Resistenzmarker für Temozolomid und Fotemustin eine herausragende Rolle.

4.1.3 γ H2AX-Induktion korreliert in Melanomzellen mit der Sensitivität nach Temozolomid-, aber nicht nach Fotemustingabe

Die Bildung von γ H2AX ist ein sehr frühes Ereignis nach DNA-Schädigungen und ein häufig verwendeter und weitgehend akzeptierter Marker für DSBs (Ismail and Hendzel 2008). Dabei wird ein im Genom gebildeter DSB durch einen γ H2AX-Focus repräsentiert (Sedelnikova et al. 2002). Phosphoryliert wird H2AX durch die DNA-schadensabhängigen Proteinkinasen ATM, ATR und DNA-PK (Ismail and Hendzel 2008). Die Phosphorylierung durch ATM und DNA-PK konnte auf Induktion von DSBs nach ionisierender Strahlung zurückgeführt werden (Burma et al. 2001; Stiff et al. 2004), während ATR vermittelte γ H2AX-Induktion hauptsächlich auf replikationsvermittelten Stress zurückzuführen ist (Ward and Chen 2001). γ H2AX-Induktion ist somit auch ein

Diskussion

Marker für die zelluläre Stressantwort einer Zelle. Es ist bekannt das die Prozessierung von O⁶MeG und die von ICLs DSBs induziert (De Silva et al. 2000; Niedernhofer et al. 2004; Roos et al. 2004; Roos et al. 2008).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Temozolomid im untersuchten Zellsystem eine Phosphorylierung von Serin 139 des Histons H2AX induziert. Das Verhältnis von γ H2AX-Induktion und der Apoptoserate gemessen 120 h nach Temozolomidbehandlung korrelierte signifikant ($P = 0,035$), wenn man die Effekte in allen sechs Zelllinien gemeinsam betrachtet. Hierbei zeigten die sensitivsten Zelllinien die höchste Induktion an γ H2AX. Wie kommt es nach Temozolomidbehandlung zur γ H2AX-Induktion? Die Läsion O⁶MeG an sich bewirken keine DSBs und damit keine γ H2AX-Induktion. Erst sekundäre Prozesse führen dazu. Die beiden wichtigsten sind DNA-Replikation und MMR. Nach Alkylierung der DNA durch Temozolomid kommt es beim Durchlaufen der zweiten S-Phase nach O⁶MeG-Induktion zu einer Ansammlung von DSBs, die zum einen γ H2AX-Bildung bedingen und zum anderen als Stimulus der O⁶MeG-Läsion vermittelten Apoptose gelten. Die Umwandlung von O⁶MeG in DSBs ist abhängig von funktioneller MMR (Kaina et al. 2007). Das trifft auch auf Melanomzellen zu. So konnte die MMR-Aktivität in Melanomzellen direkt mit deren Sensitivität nach Behandlung mit Temozolomid in Verbindung gebracht werden (Dosch et al. 1998; Pepponi et al. 2003). Sind in dem vorliegenden Melanomzellsystem Unterschiede von MMR und DNA-Replikation für die unterschiedliche γ H2AX-Induktion verantwortlich? Eine Korrelation zwischen dem Expressionsniveau der MutS α -Komplexproteine MSH2 und MSH6 und der Sensitivität gegenüber Temozolomid konnte für das untersuchte Zellsystem nicht nachgewiesen werden. Eine fehlende Korrelation von MSH2 und MSH6 mit der Sensitivität gegenüber Temozolomid wurde auch für Gliomzellen gefunden (Hermisson et al. 2006).

Wie bereits erwähnt, ist die Generierung von DSBs nach O⁶MeG-Induktion replikationsabhängig (Roos et al. 2004), und die Zellteilungsrate nimmt daher Einfluss auf den Zelltod (Roos et al. 2007). Um zu untersuchen, ob die Zellteilungsraten der verwendeten Zelllinien einen Einfluss auf die Zytotoxizität nehmen, wurde das Verhältnis zwischen Verdopplungszeit der Zelllinien und der gemessenen Apoptoserate 120 h nach Temozolomidbehandlung untersucht. Es zeigte sich keine Korrelation. Somit kann die Zellteilungsrate als determinierender Faktor auf die beobachtete Apoptoserate ausgeschlossen werden.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Menge von DSBs, gemessen durch die γ H2AX-Bildung, mit der apoptotischen Antwort von Melanomzelllinien korreliert. DSBs können daher als entscheidende Apoptoseauslösende Größe nach Temozolomidgabe angesehen werden. Die beobachteten Unterschiede im Expressionsniveau des Mut α -Komplexes oder der Zellproliferation können dagegen nicht den Unterschied der DSB-Bildung und der Zytotoxizität der Zelllinien erklären.

Auch für Fotemustin konnte im untersuchten Zellsystem gezeigt werden, dass es γ H2AX induziert. Das Verhältnis zwischen der γ H2AX-Induktion 24, 48 und 120 h und der Apoptoserate 120 h nach Fotemustinbehandlung zeigte keine signifikante Korrelation. Die durch Fotemustin induzierte Läsion O⁶CIeTG lagert sich nach Alkylierung zu einem ICL um. Die ICL-Prozessierung ist deutlich komplexer als die Prozessierungen von Methylierungen an der DNA. ICL-Prozessierung führt unter Beteiligung von NER-Proteinen zur Induktion von DSBs, die allerdings nur transient auftreten und schnell wieder repariert werden (De Silva et al. 2000; Bessho 2003; Niedernhofer et al. 2004; Mogi and Oh 2006). Das lässt vermuten, dass DSBs, welche durch CENU-Derivate induziert werden, nicht oder nicht ausschließlich die Apoptose-vermittelnden Läsionen sind. Im Gegensatz zu O⁶MeG-Läsionen bewirken ICLs auch eine Hemmung von Transkription und Replikation. In verschiedenen Arbeiten konnte Transkriptionshemmung sowie die Blockierung der Replikation vermittelt durch ICL-induzierende Agenzien als Stimulus der Apoptose identifiziert werden (Ljungman et al. 1999; Arima et al. 2005; Goldstein et al. 2008). Ob diese beiden Faktoren eine Rolle in der Fotemustin-vermittelten Induktion von Apoptose in Melanomen spielen, bleibt zu untersuchen.

4.1.4 Alkylantien-induzierte Apoptose wird in Melanomzellen p53 unabhängig vermittelt

p53 ist eines der am besten untersuchten Tumorsuppressorgene. Seine Bedeutung manifestiert sich in der Regulation von Zellzyklus, Reparatur und Apoptose, sowie in seiner hohen Mutationsrate im Verlauf der Onkogenese humaner Tumore (siehe 1.5.4.2.). Da p53 eine so große regulatorische Bandbreite besitzt, können nicht alle Erkenntnisse verallgemeinert werden, sondern sind immer im Zusammenhang mit der untersuchten Tumorart zu betrachten. Die Feststellung des p53-Status und sein Einfluss auf die Alkylantien-vermittelte Apoptose waren für das bisher wenig gut charakterisierte Melanomzellsystem nicht zuletzt deshalb bedeutsam, da Melanome mit ihrer niedrigen

Diskussion

Mutationsrate von maximal 20% im *p53*-Gen (Zerp et al. 1999) und ihrer hohen Resistenz eine Sonderstellung im Vergleich zu anderen Tumorarten einnehmen.

Verschiedene DNA-schädigende Stimuli (UV-C, Temozolomid und Fotemustin) führten in D05-Zellen zur Stabilisierung von p53-Protein und zur Translokation in den Zellkern. Für die Stabilisierung des p53-Proteins ist u.a. eine Phosphorylierung am Serin 15 erforderlich (Banin et al. 1998). Diese Phosphorylierung wurde ebenfalls in D05-Zellen nach Behandlung mit UV-C und Fotemustin nachgewiesen. Temozolomid und Fotemustin initiierten in D05-Zellen nicht nur p53-Stabilisierung, sondern auch die Expression des klassischen p53-Transkriptionsprodukts p21 (el-Deiry et al. 1993). In dieser Arbeit konnte somit die Zelllinie D05 als p53-Wildtyp beschrieben werden. D14-Zellen besitzen im Vergleich zu D05-Zellen ein hohes Basisniveau an p53-Protein, welches ein Hinweis für eine Deregulierung des p53-Proteins in dieser Zelllinie ist. Nach Behandlung mit Fotemustin und Temozolomid, nicht aber nach UV-C Strahlung, wurde p53 in D14-Zellen stabilisiert. Eine Phosphorylierung am Serin 15 konnte nach UV-C- und Fotemustinbehandlung der Zellen dokumentiert werden. Eine verstärkte p21-Expression wurde allerdings weder durch Temozolomid noch durch Fotemustin induziert. Es kann somit von einer mutierten, transkriptionell inaktiven Form des *p53*-Gens in D14-Zellen ausgegangen werden. In den Zelllinien D03 und Sk29 konnte durch Behandlung mit UV-C, Temozolomid und Fotemustin p53 nicht detektiert bzw. stabilisiert werden, was darauf hinweist, dass diese Zelllinien p53 mutiert sind. Für die Zelllinie MeWo war dies bereits aus der Literatur bekannt (Albino et al. 1994; Zolzer et al. 1995).

Untersuchungen mit Temozolomid unter Einbeziehung des p53-Status wurden hauptsächlich an malignen Gliomzellen durchgeführt. Sie führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. So waren p53-Wildtypzellen im Vergleich zu korrespondierenden p53-mutierten Gliomzellen deutlich sensitiver gegenüber Temozolomid (Roos et al. 2007). Dies wurde auf die p53-bedingte Aktivierung des Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptosewegs zurückgeführt. Die Transfektion von RNA-Interferenz (RNAi) oder einer dominant negativen p53-Mutante, welche in p53-Wildtypzellen das Protein inhibierten, führte zur Resistenz gegenüber Temozolomid (Hermisson et al. 2006; Armstrong et al. 2007; Roos et al. 2007). Dem gegenüber stehen Daten von Xu et al., die zeigten, dass p53-Inaktivierung in Gliomzellen zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Temozolomid führt (Xu et al. 2005a; Xu et al. 2005b).

Nur in einer Veröffentlichung wurde der Zusammenhang zwischen p53-Status und der Sensitivität gegenüber Temozolomid in Melanomzelllinien untersucht (Mhaidat et al.

Diskussion

2007). Die untersuchten p53-Wildtypzelllinien waren deutlich sensitiver gegenüber Temozolomid (IC₅₀ nach 72 h von 16-89 µM) als die Zelllinien mit mutiertem *p53*-Gen (IC₅₀ nach 72 h von 187-194 µM). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten widersprechen diesen Ergebnissen. Nach einer klinisch relevanten Dosis von Temozolomid (50 µM) reagierten alle Zelllinien mit mutiertem p53 (D03, SK29 und MeWo) zum Teil deutlich sensitiver (bis 55 % Apoptose nach 144 h) als die p53-Wildtypzellen D05 oder die stabilisierbare, aber transkriptionell inaktive p53-Variante in D14-Zellen (15-20% Apoptose nach 144 h). Dosis und Zelltodrate der sensitiven bzw. resistenten Zelllinien sind vergleichbar zu Ergebnissen, welche in Gliomzellen gewonnen wurden (Roos et al. 2007), auch wenn in diesem Zellsystem die Zellen mit p53-Wildtypstatus sensitiv reagierten. Ein mutiertes *p53*-Gen scheint die Fähigkeit von Melanomzellen, Apoptose zu unterlaufen, daher nicht zu einzuschränken. Die Unterdrückung der p53-Proteinexpression in D05- und D14-Zellen mittels siRNA hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate nach Temozolomidbehandlung. Die verwendete p53-siRNA depletierte das p53-Protein hoch effektive, welches über dem Nachweis des p53-Proteins und seine Transkriptionsprodukte p21 und Bax mittels Western-Blot-Analyse belegt wurde. Eine Beteiligung von p53 bei der Temozolomid induzierten Apoptose in Melanomzellen kann somit ausgeschlossen werden. Der klassische, p53-regulierte Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg scheint nach Temozolomidbehandlung daher in Melanomzellen keine so große Bedeutung zu spielen wie in Gliomzellen oder Lymphozyten (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007).

Daten, welche den Einfluß der Stoffgruppe der CENU-Derivate in Verbindung mit dem p53-Status untersuchten, wurden bisher ausschließlich an Gliomzelllinien gewonnen. Auch hier widersprechen sich die Ergebnisse. Biroccio et al. sensitivierte eine p53 mutierte Gliomzelllinie gegenüber BCNU durch retrovirale Transformation mit dem *p53*-Wildtypgen (Biroccio et al. 1999). Dies gelang allerdings bei BCNU-Gabe vor der retrovirale Transformation mit dem *p53*-Gen. Mehrere Veröffentlichungen sprechen dagegen für eine erhöhte Sensitivität gegenüber CENU-Derivate von Zellen mit mutiertem oder inhibiertem p53 im Vergleich zu Zellen, welchen das Wildtypgen tragen (Xu et al. 2001; Xu et al. 2005a; Xu et al. 2005b; Batista et al. 2007). Wildtyp p53 scheint die Reparatur der CENU-vermittelten Schäden u.a. durch eine Heraufregulation der Reparaturgene *xpc* und *ddb2* zu unterstützen (Batista et al. 2007). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber dem CENU-Derivat Fotemustin bestätigten diese Beobachtungen in Melanomzellen. Zelllinien mit mutiertem *p53*-Gen reagieren deutlich sensitiver als die p53-Wildtypzelllinie D05. Untersuchungen

Diskussion

der Fotemustin-induzierten Apoptoserate nach Inhibierung des p53-Proteins mittels siRNA ergaben eine leichte Sensibilisierung der p53-Wildtyplinie D05. Diese war aber nicht signifikant. D14-Zellen, welche die stabilisierbare, doch nicht transkriptionell aktive p53-Variante tragen, zeigten keine Änderung der Apoptoserate durch Transfektion mit siRNA.

Dass die p53-Wildtypzelllinie D05 nach Transfektion von siRNA sensitiver reagiert, während die p53-mutierte und nicht transkriptionell aktive Zelllinie D14 keinen Effekt zeigt, spricht für die Theorie des p53-vermittelten Resistenzgewinns durch Heraufregulierung von Reparaturgenen (Batista et al. 2007). Nur die fehlende, p53-vermittelte Induktion von Reparaturgenen würden in diesem Fall einen Einfluss auf die Apoptoserate ausüben, nicht aber p53-regulierte proapoptotische Faktoren. Weitere Analysen der DNA-Schadensbildung und DNA-Reparatur sind aber zur Klärung dieses Sachverhalts unerlässlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die einzige p53-Wildtypzelllinie, die in der vorliegenden Arbeit untersucht worden ist, gleichzeitig die resistanteste Linie gegenüber Temozolomid und Fotemustin war. Die Zelllinien D03 und SK29, welche kein p53-Wildtypprotein exprimieren, reagierten hoch sensitiv gegenüber diesen Alkylantien. Die durch die Alkylantien induzierte Apoptose ist somit in Melanomzellen nicht p53 abhängig. Offenbar nimmt in Melanomen p53 nicht diese herausragende Stellung als proapoptotischer Faktor ein, wie dies für Gliome beschrieben worden ist. Im Gegensatz zu anderen Tumorarten ist die Mutationsrate von p53 in Melanomen ungewöhnlich niedrig und daher offenbar für die Onkogenese nicht zwingend notwendig (Zerp et al. 1999). Trotz diesem hohen Anteil von p53-Wildtyp Tumoren sind Melanome hochgradig zytostatikaresistent. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die beobachtete Resistenz trotz Expression der p53-Wildtypform in Melanomzellen auf einer Ebene ober- oder unterhalb der p53-vermittelten proapoptotischen Signaltransduktionskaskade befindet, wie dies schon für Apaf-1 beschrieben worden ist (Soengas et al. 2001; Soengas et al. 2006). In dem für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Zellsystem konnte nur eine p53-Wildtypzelllinie charakterisieren und untersuchen werden. Es ist daher dringend notwendig für weiterführende Untersuchungen mehrere Melanomzelllinien mit p53-Wildtypstatus einzubeziehen.

4.1.5 Resistenz gegenüber Temozolomid in der Zelllinie MZ7 beruht auf einem Defekt der Mismatch-Reparatur

Die Zelllinie MZ7 war als einzige Linie des untersuchten Melanomzellsystems gegenüber Temozolomid vollkommen resistent, während sie auf Behandlung mit Fotemustin hoch sensitiv reagierte. Die Fotemustin-vermittelte Zytotoxizität konnte durch die Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz und dem Nachweis des Spaltprodukts der Caspase-3 als apoptotisch identifiziert werden. Gegenüber Fotemustin reagierte die Zelllinie MZ7 somit vergleichbar zu den übrigen untersuchten Melanomzelllinien. Der abweichende Phänotyp der MZ7-Zellen gegenüber Temozolomid konnte nicht auf eine veränderte Aktivität der MGMT zurückgeführt werden, da MZ7-Zellen MGMT defizient sind (4 fmol/mg Protein, welches der Nachweisgrenze entspricht). Auch konnte die Induktion von γ H2AX, welches als Marker für DSBs fungiert, und die Aktivität der DNA-schadensabhängigen Proteinkinase ATM nach Fotemustinbehandlung, nicht aber nach Temozolomid nachgewiesen werden. Die Prozessierung von ICLs scheint daher in MZ7-Zellen nicht defizitär zu sein. Die durch MMR-vermittelte Prozessierung von O⁶MeG, welche zur Bildung von DSBs führt (Roos et al. 2004; Roos and Kaina 2006; Kaina et al. 2007), war dagegen nicht nachweisbar.

Kann in MZ7-Zellen die Resistenz gegenüber Temozolomid auf einen Defekt in der MMR beruhen? Von allen untersuchten Melanomzelllinien hatten MZ7-Zellen das niedrigste Expressionsniveau an MSH2- und MSH6-Protein. MSH2 und MSH6 bilden den MutS α -Komplex, der u.a. die O⁶MeG-Läsionen erkennt (Duckett et al. 1996; Yoshioka et al. 2006). Die Untersuchung des Bindungsverhaltens des MutS α -Komplexes an Oligonukleotide mit GT-Fehlpaarungen zeigte in MZ7-Zellen ein abweichendes Bindungsverhalten im Vergleich zu den übrigen Melanomzelllinien. Die Ergebnisse sprechen für einen Defekt in MMR der Zelllinie MZ7, welches für die Resistenz gegenüber Temozolomid Verantwortung trägt. Unterstützt wird diese Theorie von Daten, welche zeigen, dass der MMR-Status direkt mit der Sensitivität von Zellen nach Gabe von methylierenden Agenzien korreliert (Dosch et al. 1998; Pepponi et al. 2003) und der Verlust von MMR zur Resistenz führt (Fink et al. 1998).

Welche Gründe können für diesen Resistenzerwerb verantwortlich sein? Die Zelllinie MZ7 wurde aus einem Melanom von einem Patienten in Mainz (Deutschland) isoliert, welcher bereits mit dem Alkylanz Dacarbazin therapiert wurde. Dacarbazin gehört, wie Temozolomid, zu den Zytostatika, welche Methylgruppen auf die DNA übertragen. Eine Gefahr, welche beim Einsatz von Alkylantien und anderen Substanzen als

Diskussion

Chemotherapeutikum besteht, ist die Entwicklung von Resistenzen in einzelnen Tumorzellen während der Therapie. In Melanomzellen konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass ein Behandlungszyklus Temozolomid ausreicht, um eine hohe Resistenz zu erzeugen (Alvino et al. 2006). Der ausgeübte Selektionsdruck durch das Chemotherapeutikum und die daraus resultierende Resistenz machen eine weitere Behandlung mit derselben Substanz zwecklos und verlangen nach alternativen Behandlungsstrategien. Das MMR-System ist nicht nur bei der Prozessierung von O⁶MeG-Läsionen beteiligt, sondern scheint auch bei der Prozessierung von CENU-Derivaten vermittelten ICLs mitzuwirken. In Nagerzellen und humanen Tumorzellen konnte bei MMR-Defizienz eine Sensibilisierung nach CCNU-Gabe beobachtet werden (Aquilina et al. 1998; Aquilina et al. 2000). Auch in Melanomzellen wurde mit BCNU eine, wenn auch schwache Korrelation zwischen dem MMR-Status einzelnen Zelllinien und ihrem IC₅₀ für BCNU festgestellt (Pepponi et al. 2003). Bei CENU-Derivaten scheint also ein MMR-Defekt einen sensitivierenden und nicht einen protektiven Effekt zu haben. Die MZ7-Zelllinie gehört nach Fotemustinbehandlung mit ca. 60% Zelltod nach 144 h zu den hochsensitiven Zelllinien des untersuchten Zellsystems. Der MMR-Defekt in diesen Zellen könnte ein Grund dafür sein. Zur Überwindung einer durch methylierende Agenzien vermittelten Resistenz in Melanomen bietet sich somit eine Umstellung der Therapie auf Fotemustin oder anderer CENU-Derivate an, wenn sich die Resistenz durch einen Defekt in der MMR manifestiert. Die „Inaktivierung“ der MMR könnte in diesem Fall die Effektivität der CENU-Derivate sogar erhöhen.

4.2 Untersuchungen der Fotemustin-vermittelten Apoptose in Melanomzelllinien

Der Zytotoxizität-vermittelnde Mechanismus von monofunktionell methylierenden Agenzien wie Temozolomid, Dacarbazin oder MNNG wurde in verschiedenen Zellsystemen untersucht und weitgehend aufgeklärt. Im Gegensatz dazu ist das Wissen über die Mechanismen des durch CENU-Derivate vermittelten Zelltods, insbesondere verursacht durch die Bildung von ICLs, deutlich defizitärer. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten aus diesem Grund Untersuchungen der Fotemustin-vermittelten Apoptose in dem vorliegenden Melanomzellsystem vorgenommen werden. Um die Rolle des p53-Status genauer zu untersuchen, wurden hierzu zwei Zelllinien ausgewählt: die resistente und p53-Wildtypgen tragende Linie D05 und die sensitive, p53-Gen mutierte Zelllinie D14.

4.2.1 Fotemustin arretiert Melanomzellen im Behandlungszyklus in G2/M, benötigt aber das Durchlaufen der S-Phase, um Apoptose zu vermitteln

Auf eine Vielzahl von DNA-Schäden reagieren proliferierende Zellen mit einer transienten oder dauerhaften Arretierung im Zellzyklus. Hierdurch erhält die Zelle Zeit, um Reparatur zu betreiben oder akute Gefahren wie eine mitotische Katastrophe zu verhindern (Kaufmann and Paules 1996). DNA-schadensabhängige Zellzyklus-Kontrollpunkte (Checkpoints) sind für die G1- und S-Phase sowie für den Übergang von der G2-Phase zur Mitose (G2/M-Arrest) beschrieben worden.

Der Einfluss einer klinisch relevanten Dosis von methylierenden Alkylantien wie Temozolomid auf den Zellzyklus und die Apoptose ist gut untersucht worden. Temozolomid und MNNG induzieren ausschließlich in proliferierende Zellen Apoptose, nicht aber in ruhenden, wie am Beispiel von Lymphozyten gezeigt worden ist (Roos et al. 2004). In Gliomzellen schützte die Inhibierung des Zellwachstums vor Temozolomid-vermittelter Apoptose, während eine Steigerung der Proliferation zu einer erhöhten Apoptoserate nach MNNG führte (Roos et al. 2007). Der Einfluss von Zellproliferation auf die Fotemustin-induzierte Apoptose ist hingegen unklar. Daher wurden die Untersuchungen mit Fotemustin zum Vergleich denen mit Temozolomid gegenübergestellt. Die Behandlung der Zelllinien D05 und D14 mit Temozolomid verursachte in den untersuchten Zelllinien zwar eine Abnahme der Wachstumsrate im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, die Zellzahl nahm jedoch in den ersten zwei bis drei Behandlungstagen zu. Dies zeigt, dass Melanomzellen nach Temozolomidgabe weiter proliferieren. Zwischen dem zweiten und dritten Nachbehandlungstag konnte eine Reduzierung der G1-Fraktion und die Ausbildung eines G2/M-Arrests in beiden Zelllinien beobachtet werden. Die Wildtypzellen (D05) arretierten klar 48 h nach Behandlung, während Zellen mit mutiertem p53 (D14) noch zu späteren Zeitpunkten eingeschränkte Teilungsaktivität zeigten. Dies wird von Daten gestützt, welche zeigten, dass bei mutiertem p53, im Gegensatz zu Wildtypzellen, ein eher transientser Zellzyklusblock auftritt (Hirose et al. 2001). Daraus ist zu schließen, dass Zellen nach Gabe von Temozolomid auch weiter proliferieren können. Es bildet sich trotzdem zu späteren Nachbehandlungszeitpunkten ein G2/M-Block aus, wie in verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen wurde (Jean-Claude et al. 1999; Hirose et al. 2001; Beardsley et al. 2005). Dieser ist unabhängig vom p53-Status.

Die Behandlung mit Fotemustin erzeugte hingegen in Melanomzellen einen von Temozolomid verschiedenen Phänotyp. Fotemustingabe führte in beiden Zelllinien zu

Diskussion

einem Stopp des Zellwachstums. Die Zellen durchliefen in den ersten zwei bis drei Nachbehandlungstagen die S-Phase und sammelten sich anhaltend in der G2/M-Phase. Da dies in D05- und D14-Zellen zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass auch Fotemustin die Bildung eines G2/M-Phasenblocks p53-unabhängig induziert. Vergleichbare Daten wurden mit Dickdarmkarzinomzellen nach BCNU-Behandlung gewonnen (Yan et al. 2005). Wie in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, führte die Gabe einer klinisch relevanten Dosis von Fotemustin im Behandlungszyklus zu einem deutlichen G2/M-Arrest, der keine Zellteilung mehr zulässt.

Ist das Durchlaufen des Zellzyklus bis zur Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase für die Induktion von Zelltod zwingend oder wirkt Fotemustin auch in ruhenden, nicht proliferierenden Zellen zytotoxisch? Zur Klärung dieser Frage wurde die B-Lymphozytenzelllinie P493-6 untersucht, welche mittels Tetrazyklin regulierter c-Myc-Expression in der G1-Phase arretiert werden konnte (Kempkes et al. 1995; Pajic et al. 2000). Die Untersuchung G1-arretierter Zellen ergab im Vergleich zu proliferierenden Zellen eine hochsignifikante Reduktion der Zelltodrate gegenüber Temozolomid. Dies wurde bereits in humanen Lymphozyten und Gliomzellen nachgewiesen (Roos et al. 2004; Roos et al. 2007). Interessanterweise verhielten sich die P493-6-Zellen gegenüber Fotemustin vergleichbar. Das Durchlaufen des Zellzyklus bis in den G2/M-Arrest ist somit zur Entfaltung der Fotemustin-induzierten Zytotoxizität notwendig. Nicht proliferierende Zellen reagieren hochgradig resistent gegenüber Fotemustin. Können diese Resultate auch auf das untersuchte Melanomzellsystem übertragen werden? Die untersuchten Melanomzelllinien konnten nicht oder nur schlecht in der G1-Phase über einen längeren Zeitraum arretiert werden. Es wurde deshalb nicht die Apoptoserate als Messgröße gewählt, da sie erst spät (120 oder 144 h nach Alkylantiengabe) auftritt. Die Aktivierung der Caspase-7 wurde anhand ihrer Spaltprodukte 48 h nach Behandlung als eine indirekte Größe der Apoptoseinduktion herangezogen, da diese bereits zu einem frühen Zeitpunkt aktiviert wird (siehe Abb. 3-4). Ein Großteil konfluenter D14-Zellen konnte durch Inkubation in serumfreiem Medium 48 h lang in der G1-Phase arretiert werden (72% G1-Phasezellen nach 48 h). Dies galt auch für Zellen, welche in serumfreiem Medium inkubiert und zusätzlich mit Fotemustin behandelt wurden (69,4% G1-Phasezellen nach 48 h). Caspase-7 wurde dabei in proliferierenden Zellen über 7,5 Mal stärker aktiviert als in den G1-arretierten Zellen. In der Lymphozytenzelllinie P493-6 und in Melanomzellen, die sich in der G1-Phase befinden, wirkt demnach Fotemustin nicht toxisch. Unter Einbeziehung der Untersuchungen zum Zellzyklus nach Fotemustinbehandlung erfolgt das

Diskussion

initiierende Ereignis für die Fotemustin-induzierte Apoptose somit zwischen Eintritt der Zellen in die S-Phase und der Arretierung in G2/M im Behandlungszyklus.

Es existieren zwei nicht konkurrierende Mechanismen für ICL-Erkennung und Reparatur. Zum einen können in der G1-Phase ICLs über einen fehleranfälligen, ohne Beteiligung von HR vermittelten Weg repariert werden (Zheng et al. 2003; Sarkar et al. 2006; Shen et al. 2006) und zum anderen werden während der DNA-Replikation ICLs detektiert und unter Einbeziehung der HR repariert (siehe Abb. 4-1) (De Silva et al. 2000; Kuraoka et al. 2000; Niedernhofer et al. 2004). Die Detektion der ICLs ist ein indirekter Effekt, der durch ICL-bedingte Blockierung der DNA-Replikationsgabeln erfolgt und deren weitere Prozessierung stimuliert. In den proliferierenden D14-Zellen befand sich 48 h nach Behandlung die Mehrzahl der Zellen in der S-Phase und noch nicht im G2/M-Arrest. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch die Aktivierung der Caspase-7 detektiert werden, was dafür spricht, dass die ICL-Erkennung und die Induktion der Apoptose während der S-Phase erfolgen. Das Durchlaufen der S-Phase scheint in Melanomzellen das entscheidende Ereignis für die ICL-Detektion nach Fotemustinbehandlung darzustellen, welches G2/M-Arrest und Apoptoseinduktion initiiert. Für die Fotemustinbehandlung von Melanomzellen scheint somit der zweite Mechanismus wichtiger zu sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Fotemustin in einer klinisch relevanten Dosis in Melanomzellen einen Wachstumstopp erzeugt, welcher auf einem p53-unabhängigen G2/M-Block beruht und sich im Behandlungszyklus manifestiert. Ruhende Zellen in der G1-Phase waren resistent gegenüber Fotemustin. Das Durchlaufen der S-Phase bis in den G2/M-Arrest ist für die Induktion von Apoptose zwingend notwendig.

4.2.2 Fotemustin-induzierte ICL-Bildung und ihre initiale Prozessierung erfolgen in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien vergleichbar effektiv

Um auszuschließen, dass die Unterschiede in der Sensitivität beider Zelllinien auf einem variablen Schadensniveau basieren, wurde untersucht, ob die selbe Dosis an Fotemustin auch ein identisches Niveau an ICLs in der genomischen DNA beider Zelllinien generiert. Für diesen Versuch wurde, wie in allen bisherigen Versuchen, eine Dosis von 32 μ M Fotemustin verwendet.

Die Umlagerung einer O⁶ClEtG-Läsion zum N1-Guanin-N3-Cytosin-ICL erfolgt hauptsächlich 8-12 h nach Chlorethylierung der DNA, findet aber noch bis zu 24 h danach statt (Brent et al. 1987). Der Nachweis der durch Fotemustin induzierten ICLs wurde deshalb 16 h nach Behandlung durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte mit einer auf der

Diskussion

alkalischen Einzelzelektrophorese basierenden Methode. Die DNA-Fragmentierung erfolgte mittels ionisierender Strahlung als methodische Größe und deren Auftrennung unter alkalischen Bedingungen (d.h. als einzelsträngig vorliegende DNA). Auch wenn in D05-Zellen eine etwas stärkere Verknüpfung der DNA-Fragmente ermittelt wurde, war der Unterschied zwischen den Zelllinien nicht signifikant. 32 μ M Fotemustin generieren somit in den Zelllinien D05 und D14 ein vergleichbares Niveau an ICLs.

Untersuchungen späterer Nachbehandlungszeitpunkte mit Hilfe der gleichen Methode ermöglichten Aussagen zur Prozessierung von ICLs. Der initiale Prozessierungsabschnitt ist nach Blockierung einer Replikationsgabel durch ein ICL das durch Endonukleasenaktivität vermittelte Durchtrennen des Phosphodiester-Rückgrats nahe der Läsion unter Generierung von DSBs (siehe Abb. 4-1 A-C). Welche Endonuklease Verantwortung für die Generierung der DSBs trägt ist umstritten. Zum eine wird der XPF-ERCC1-Komplex als der initiiierende Faktor beschrieben (De Silva et al. 2000; Kuraoka et al. 2000). Andere Daten widersprechen dem und favorisieren die Endonuklease Mus81 (Boddy et al. 2001; Chen et al. 2001; Niedernhofer et al. 2004). Dieser, durch Endonukleasen vermittelte Prozessierungsschritt führt zur Abnahme der kovalent verbundenen, doppelsträngigen DNA in einer Probe und erhöht somit die Mobilität der DNA während der Einzelzelektrophorese. 48 h nach Behandlung mit Fotemustin wurde in D05- und D14-Zellen eine vergleichbare Menge an ICLs nachgewiesen, wie in unbehandelten Kontrollen. Daraus ist zu schließen, dass zwischen 24 und 48 h nach Fotemustingabe in beiden Zelllinien die gebildeten ICLs gleichermaßen prozessiert wurden.

Zusammenfassend konnte in beiden Zelllinien somit eine vergleichbare Bildung und initiale Prozessierung von ICLs nachgewiesen werden. Diese beiden Faktoren sind demnach nicht für die abweichende Sensitivität zwischen den Zelllinien verantwortlich.

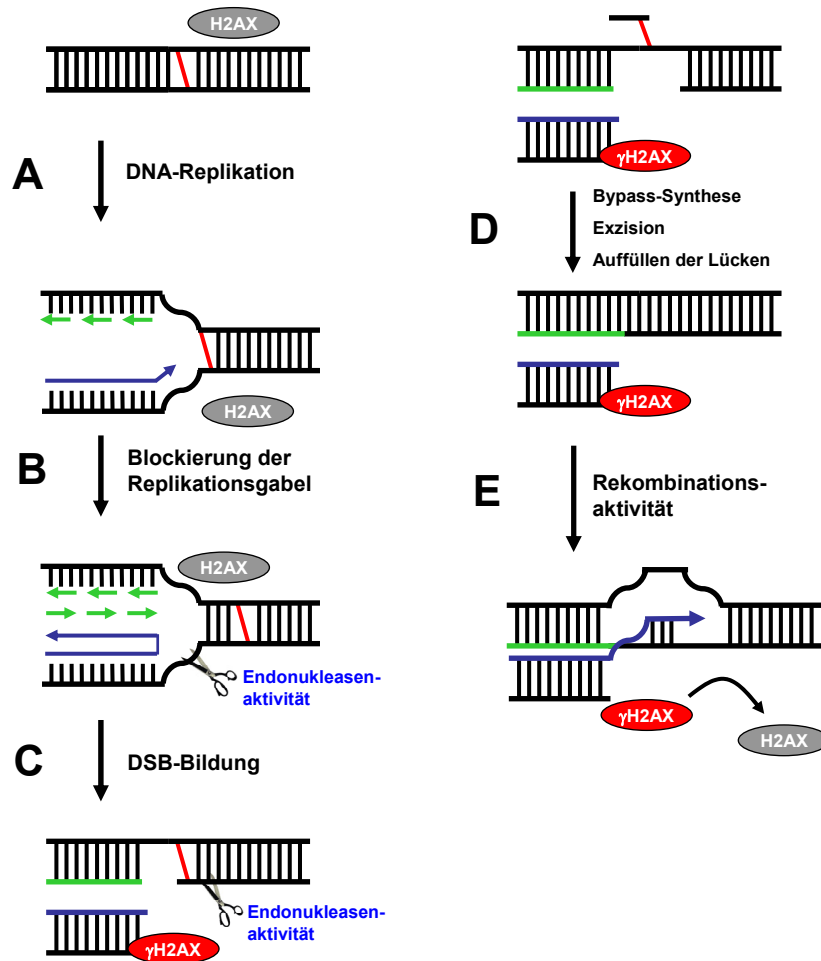


Abb. 4-1 Modell der ICL-Reparatur

ICLs werden während der DNA-Replikation (A) durch die Blockierung von Replikationsgabeln detektiert (B). Dies führt zu einer Rückwärtsbewegung der Gabel. Durch Endonukleasenaktivität kommt es zur initialen Prozessierung der ICLs unter Bildung von DSBs (C) und zur Induktion von γ H2AX. Endonukleasenaktivität ist ebenfalls für das komplette Ausschneiden der ICLs auf einer Strangseite verantwortlich. Über Prozesse der Bypass-Synthese, Exzisionsreparatur und dem Auffüllen der Lücken durch die Replikationsmaschinerie werden die ICLs entfernt und der Strang repariert (D). Durch Prozesse der homologen Rekombination wird der offene DNA-Strang wieder integriert (E).

4.2.3 Quantität und Reparaturreffektivität der von ICLs ausgehenden DSBs spiegeln die Sensitivität in Melanomzellen gegenüber Fotemustin wider

Wie unter 4.1.3. diskutiert, korreliert die Sensitivität verschiedener Melanomzelllinien nicht mit der γ H2AX-Induktion nach Fotemustingabe. Vorausgesetzt, dass die Menge an γ H2AX die Menge an DSBs widerspiegelt, so ist daraus zu schlussfolgern, dass die DSBs nicht ausschließlich für die Zytotoxizität ausschlaggebend sind. Trotzdem wurde in sensitiven Zelllinien eine verstärkte γ H2AX-Bildung beobachtet. Mittels vertiefter Studien zur H2AX Phosphorylierung sollte in den zwei unterschiedlich sensitiven Zelllinien D05 und D14 geklärt werden, ob sich die beobachtete Resistenz auf der Ebene

Diskussion

des DNA-Schadens bzw. der DNA-Reparatur oder auf der Ebene der Apoptoseexekution manifestiert.

Mittels Western-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass Fotemustin in den resistenten D05-Zellen ein niedrigeres Niveau an γ H2AX generiert, als in den sensitiven D14-Zellen. 48 h nach Behandlung erreichte die γ H2AX-Induktion in D05-Zellen ihr Maximum, fiel aber bereits 72 h nach Behandlung wieder deutlich ab. D14-Zellen induzierten im Vergleich dazu eine deutlich stärkere Bildung an γ H2AX nach Fotemustingabe. Auch in dieser Zelllinie ist ein maximales Niveau an γ H2AX nach 48 h erreicht, welches allerdings bis 120 h nach Behandlung konstant hoch nachzuweisen war. Das Erreichen der maximalen γ H2AX-Induktion 48 h nach Fotemustinbehandlung kann unter Einbeziehung der Daten zur ICL-Induktion und initialen ICL-Prozessierung erklärt werden. Wie unter 4.2.2. diskutiert, ist der erste Prozessierungsabschnitt der gebildeten ICLs in beiden Zelllinien bis 48 h nach Behandlung abgeschlossen (siehe Abb. 4-1 A-C). Die maximale γ H2AX-Induktion 48 h nach Behandlung entspricht dem maximalen Niveau an sekundären Läsionen, welche aus der initialen ICL-Prozessierung entstehen. Ausgehend davon ist die Abnahme an γ H2AX, welche in den resistenten D05-Zellen ab 72 h nach Behandlung zu beobachten ist, als Reparatur dieser sekundären Läsionen zu interpretieren (siehe Abb. 4-1 D-E).

Im Gegensatz zu der mittels Western-Blot-Analyse detektierten Menge an γ H2AX ist die mittels Immunhistochemie nachgewiesene Bildung von γ H2AX-Foci zweifelsfrei ein Maß für DSBs und für DNA-Replikations-assoziierten Strangbrüche. Die Ermittlung der durchschnittlichen Focizahl pro Zelle zu verschiedenen Nachbehandlungszeiten unterstützt die bisher gewonnenen Ergebnisse und zeigt, dass es sich bei den sekundären Läsionen um DSBs handelt. Geht man davon aus, dass ein Focus mit einem DSB gleichzusetzen ist (Sedelnikova et al. 2002), so steigt das Niveau an DSBs bis 48 h nach Behandlung in beiden Zelllinien an. 48 h nach Behandlung ist mit durchschnittlich 130 Foci pro Zelle (D14-Zellen) und 115 Foci pro Zellen (D05-Zellen) die maximale Focianzahl in beiden Zelllinien erreicht und damit ein annähernd gleich hohes Schadensniveau. Die Abnahme an Foci, 96 h nach Behandlung, beschreibt somit den Reparaturprozess der sekundären Läsionen und der DSBs. Jeder nicht mehr vorhandene γ H2AX-Focus kann somit mit einem vollständig reparierten ICL gleichgesetzt werden. D05-Zellen besaßen 96 h nach Behandlung ca. 50% weniger Foci im Vergleich zum Maximum 48 h nach Behandlung. Die Reparaturrate war damit in diesen Zellen deutlich höher als in den sensitiven D14-Zellen. Welcher konkrete Prozessierungsschritt im späten

Diskussion

Abschnitt der ICL-Prozessierung für die ineffektive Reparatur in D14-Zellen ausschlaggebend ist, kann aus diesen Daten nicht geschlossen werden.

Die Unterschiede in der Focianzahl erklären aber nicht das vielfach höhere Gesamtniveau an phosphoryliertem H2AX in D14-Zellen, welches mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen wurde. Die Immunhistochemieaufnahmen zeigten deutlich, dass nicht nur das Gesamtniveau an γ H2AX, sondern auch die Intensität der einzelnen Foci in D14-Zellen stärker war. Vorstellbar wäre eine positive Rückkopplung zwischen den persistierenden, sekundären Schäden durch verminderte Reparatur und der Aktivierung übergeschalteter DNA-schadensabhängiger Proteinkinasen, welche Verantwortung für den Phosphorylierungsstatus von H2AX tragen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei der beobachteten γ H2AX-Bildung nach Fotemustingabe um Foci und damit zweifelsfrei um DSBs handelt. Die Reparatur der aus den ICLs gebildeten DSBs war in der resistenten Zelllinie D05 deutlich effektiver als in der sensitiven D14-Zelllinie. Zwischen den resistenten D05- und den sensitiven D14-Zellen waren keine Unterschiede in der Bildung von ICLs, ICL-Erkennung und initialer Prozessierung messbar (siehe 4.2.2). Die Effektivität in den Reparaturprozessen der ICL-bedingten, sekundären Läsionen könnte hingegen als ein möglicher Resistenzmarker in Melanomzellen nach Fotemustinbehandlung in Frage kommen.

4.2.4 Fotemustin-induzierte Apoptose wird in Melanomzellen über die Mitochondrien vermittelt

Fotemustin induziert in Melanomzellen Apoptose (siehe 4.1.1). Um zu ergründen, auf welchem Weg Fotemustin Apoptose induziert, wurden weitere apoptotische Parameter untersucht.

Mit Hilfe eines globalen Caspaseinhibitors wurde gezeigt, dass Fotemustin-induzierte Apoptose in Melanomzellen Caspasen-abhängig verläuft. Die Aktivierung von Caspasen stellt somit einen essentiellen Prozess in der Exekution der Apoptose nach Fotemustinbehandlung dar. Es konnte in den sensitiven D14-Zellen eine stärkere Enzymaktivität der Caspase-9 (Faktor 2), im Vergleich zur Caspase-8 (Faktor 1,5) festgestellt werden. Caspase-9 ist essentieller Bestandteil der mitochondrialen Apoptosekaskade (Wang 2001), während Caspase-8 als die Initiatorcaspase der Rezeptor-vermittelten Apoptosekaskade beschrieben ist (Muzio et al. 1996; Muzio et al. 1998). In D05-Zellen war keine Enzymaktivität der beiden Initiatorcaspasen nachweisbar. Verantwortlich dafür scheint die niedrige Apoptoserate in dieser resistenten Zelllinie zu

Diskussion

sein, welches sich auch im geringeren Aktivitätsniveau der Effektorcaspase-3 (Faktor 1,8), im Vergleich zur sensitiven Zelllinie D14 (Faktor 3) widerspiegelt. Mittels Western-Blot-Analyse gelang in D14-Zellen zusätzlich der Nachweis des durch proteolytische Spaltung vermittelten Spaltprodukts p35 der Caspase-9. Der Nachweis der Caspase-9 Aktivierung lässt vermuten, dass der mitochondrial vermittelte Apoptoseweg in D14-Zellen an der Exekution der Apoptose gegenüber Fotemustin beteiligt ist. Weitere Parameter für die Aktivierung des mitochondrial vermittelten Apoptosewegs sind u.a.: die (i) Abnahme des Cytochrom C-Niveaus in den Mitochondrien und die Anreicherung von Cytochrom C im Zytosol (Liu et al. 1996; Garrido et al. 2006), (ii) Verringerung der Bcl-2-Menge in der Mitochondrienfraktion (Krajewski et al. 1993; Nguyen et al. 1994; Cheng et al. 1997; Grandgirard et al. 1998; Dimmeler et al. 1999) und (iii) Abnahme der Bax-Proteinmenge im Zytosol (Hsu et al. 1997; Wolter et al. 1997). In D14-Zellen konnten nach Behandlung mit Fotemustin diese Parameter mittels Western-Blot-Analyse mit fraktionierten Zellextrakten nachgewiesen werden. Vor allem die starke Cytochrom C-Freisetzung spricht für die mitochondrial vermittelte Apoptose. Eine Anreicherung von Bax-Protein in der mitochondrialen Fraktion, welche durch eine Translokation von Bax aus dem Zytosol an die Mitochondrien beschrieben ist (Hsu et al. 1997; Wolter et al. 1997), war hingegen nicht zu beobachten.

In der resistente Zelllinie D05 ist im Verhältnis zu D14-Zellen nur eine leichte Cytochrom C-Freisetzung ins Zytosol festzustellen, allerdings keine nachweisbare Abnahme von Cytochrom C und Bcl-2 in der Mitochondrienfraktion. Die Menge an Bax-Protein nahm nach Behandlung in der zytosolischen und der mitochondrialen Fraktion zu. Die Verteilung des Bax-Proteins muss daher differenzierter betrachtet werden. Das *bax*-Gen wird über p53 transkriptionell reguliert (Miyashita and Reed 1995). In der p53-Wildtypzelllinie D05 kommt es zu einer starken, auf p53 zurückzuführenden Heraufregulierung an Bax-Protein (siehe Abb. 3-14 C und 3-42 B), welche die möglichen Effekte wahrscheinlich überlagert und die Zunahme von Bax in der mitochondrialen und in der zytosolischen Fraktion erklärt. Da die starke Zunahme an Bax-Protein in D05-Zellen im Vergleich zu D14-Zellen aber nicht zu einer hohen Cytochrom C-Freisetzung und nicht zu einer hohen Apoptoserate führt, scheint Bax in der Zelllinie D05 keinen oder nur einen geringen proapoptotischen Einfluss auszuüben. Die Aufrechterhaltung der Bcl-2-Menge oder der Menge von anderen antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie an den Mitochondrien könnte hierfür eine mögliche Erklärung sein.

Diskussion

Bezüglich der Rezeptor-vermittelten Apoptose konnte gezeigt werden, dass mittels durchflusszytometrisch gestützter Immunfluoreszenz keine Fas-Rezeptormoleküle auf der Oberfläche von D05- und D14-Zellen nachzuweisen waren. Die Inkubation der Zellen mit einem agonistisch wirkenden Fas-Antikörper hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität, und es war auch keine proteolytische Spaltung von Procaspase-8 zu detektieren. Diese Untersuchungen zeigten demnach in beide Zelllinien keinen Hinweis auf eine Beteiligung der Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptose.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die mitochondrial vermittelte Apoptosekaskade die entscheidende Route der Fotemustin-induzierten Apoptose in Melanomzellen darstellt. Dies geschieht Caspasen-abhängig. Einen Anhaltspunkt auf die Beteiligung des Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptoseweges konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2.5 Die Sensitivität in Melanomzellen gegenüber Fotemustin wird nicht durch Mitglieder der IAP-Familie beeinflusst

Mitglieder der IAP-Familie haben die Eigenschaft, Initiator- und Effektorcaspasen negativ zu regulieren und stellen damit eine spät in der Apoptosekaskade angesiedelte regulatorische Größe dar (Deveraux et al. 1997; Deveraux et al. 1998; Deveraux and Reed 1999; Sah et al. 2006). Die Untersuchungen von XIAP und Survivin sollte klären, ob diese beiden bereits gut charakterisierten IAP-Familienmitglieder einen Einfluss auf die Sensitivität von Melanomzellen gegenüber Fotemustin besitzen.

Wie unter 4.2.3. diskutiert, unterlaufen Melanomzellen nach Fotemustinbehandlung Apoptose über den mitochondrialen Weg. XIAP inhibiert direkt die Effektorcaspasen-3 und -7, sowie die für den mitochondrialen Apoptoseweg entscheidende Initiatorcaspase-9 (Deveraux et al. 1998). Zusätzlich wird das Expressionsniveau von XIAP als ein Indikator der Tumorentwicklung in Melanomen diskutiert (Emanuel et al. 2008). Im untersuchten Zellsystem konnten unterschiedlich hohe Basisniveaus an XIAP-Protein detektiert werden. Dabei zeigte die resistente Zelllinie D05 ein hohes Expressionsniveau an XIAP-Protein, welches auch nach Fotemustinbehandlung konstant hoch blieb. In der sensitiven D14-Zelllinie wurde hingegen das niedrigste Niveau an XIAP-Protein von allen Melanomzelllinien detektiert. Die basale Menge von XIAP-Protein in beiden Linien und das konstant hohe Expressionsniveau nach Behandlung der Zelllinie D05 mit Fotemustin korrespondiert somit mit der gemessenen Sensitivität beider Zelllinien gegenüber Fotemustin und könnte als Resistenzmarker in Frage kommen.

Diskussion

Der Einfluss des XIAP-Proteins auf die Apoptoserate nach Fotemustinbehandlung wurde anschließend untersucht, indem XIAP durch siRNA-Transfektion herunterreguliert wurde. Chawla-Sarkar et al. gelang es in einem vergleichbaren siRNA-Experiment, Melanomzellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose zu sensitivieren (Chawla-Sarkar et al. 2004). Die durch siRNA-Transfektion bewirkte Herunterregulierung des XIAP-Proteins führte im untersuchten Zellsystem zu keiner Sensibilisierung nach Fotemustingabe, weder in D05-Zellen noch in D14-Zellen. Wie im Vorversuch gezeigt, konnte das endogene Niveau an XIAP-Protein in D05-Zellen um bis zu 97% reduziert werden. Die für das Experiment verwendeten Konditionen eliminierten das XIAP-Protein somit sehr effektiv. Spaltprodukte der Caspase-3 und -7 wurde durch Einsatz von XIAP-siRNA nicht verändert. Dies steht im Gegensatz zu Daten, welche einen Effekt auf die Spaltung von Caspasen durch Modulation der XIAP-Expression in Zellkulturexperimenten zeigten (Datta et al. 2000). Dass XIAP in D05-Zellen trotz der hohen Expression keinen Effekt nach Fotemustingabe zeigte, könnte an posttranslationalen Faktoren sowie an Regulierung durch Protein-Proteininteraktionen liegen. So wurde nach Fotemustinbehandlung auch ein konstantes Niveau des direkten XIAP-Antagonisten XAF1 (Liston et al. 2001) nachgewiesen. Die Untersuchungen zeigten, dass XIAP keinen Einfluss auf die Sensitivität im untersuchten Melanomzellsystem nach Fotemustinbehandlung besitzt.

Survivin ist ebenfalls ein IAP, welches in Melanomzellen antiapoptotisch wirkt (Chawla-Sarkar et al. 2004). Interessanterweise scheint nicht alleinig das Expressionsniveau in Melanomen ausschlaggebend zu sein, sondern auch die Lokalisation im Kern (Ding et al. 2006; Piras et al. 2007). Nach Fotemustinbehandlung nahm die Menge von Survivin in D05- und D14-Zellen ab. Die Abnahme erfolgte zwischen 48 und 72 h nach Behandlung, also zu Nachbehandlungszeiten, an denen Effektorcaspasen aktiviert wurden (siehe Abb. 3-4) und bereits Zelltod messbar war (siehe Abb. 3-1). Aufgrund der Überschneidung zwischen Herabregulierung von Survivin und der Induktion von Apoptose scheint Survivin gegenüber der Fotemustin-vermittelten Toxizität in Melanomzellen keine Rolle zu spielen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die beiden IAPs XIAP und Survivin keinen Einfluss auf die Fotemustin-induzierte Apoptose im untersuchten Melanomsystem haben. Die Resistenz der D05-Zellen gegenüber Fotemustin kann daher nicht auf die Involvierung dieser IAPs in der apoptotischen Kaskade zurückgeführt werden.

4.2.6 DNA-schadensabhängige Signaltransduktion ist in der sensitiven Melanomzelllinie D14 stärker ausgeprägt

Alkylierungen und ICLs induzieren DNA-schadensabhängige Signaltransduktion (Caporali et al. 2004; Pichierri and Rosselli 2004; Arnould et al. 2006). In den unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien D05 und D14 wurden nach Fotemustinbehandlung mehrere Proteine der DNA-schadensabhängigen Signaltransduktion miteinander verglichen.

Die DNA-schadensabhängige Proteinkinase ATM vermittelt proapoptische Signale in erster Linie über p53 (Nur et al. 2003; Borges et al. 2004), E2F-1 (Lin et al. 2001) und über die Checkpoint Kinasen. ATM-Aktivität wurde durch Nachweis der Autophosphorylierungsstelle des Proteins am Serin 1981 (Bakkenist and Kastan 2003) sowie über die Phosphorylierung von Serin 15 des p53-Proteins beschrieben (Tibbetts et al. 1999; Saito et al. 2002). Beide Zelllinien aktivieren ATM nach Fotemustinbehandlung. In Zeit und Ausmaß ist die ATM-Aktivität in D14-Zellen im Vergleich zu D05-Zellen zweifelsfrei verstärkt nachzuweisen. In der Zelllinie D14 konnte bereits 12 h nach Behandlung aktiviertes ATM nachgewiesen werden, sowie der Beginn der Induktion von p-p53^(Ser15). In D05-Zellen war dagegen erst 48 h nach Behandlung aktives ATM nachweisbar. Trotzdem wurde p-p53^(Ser15) schon früh, vergleichbar zu D14-Zellen detektiert. Die Aktivierung von ATM und p53 korreliert demnach mit der beschriebenen Bildung der DSBs. Die frühe Aktivierung von ATM in D14-Zellen verlief parallel mit der Entstehung von DSBs, welche bereits 16 h nach Behandlung in D14-Zellen ein doppelt so hohes Schadensniveau wie in D05-Zellen aufwies (siehe 3-28). In D05-Zellen lag das Niveau an DSBs nach Behandlung niedriger und erreichte erst nach zwei Nachbehandlungstagen ein vergleichbar hohes Schadensniveau wie in D14-Zellen. Zu diesem Zeitpunkt konnte aktives ATM detektiert werden. Zusätzlich besaßen D14-Zellen ein höheres Niveau an ATM-Gesamtprotein. Somit können in D05-Zellen weniger ATM-Moleküle aktiviert werden. Dieses Signal scheint nicht stark genug zu sein, um es zu detektieren. Der gleiche Grund könnte auch die Ursache für das deutlich stärkere Signal an p-p53^(Ser15) in den p53-mutierten D14-Zellen sein, welche ein höheres Grundniveau an p53-Protein aufweisen (siehe 4.1.4).

Chk1 ist eine hoch konservierte Proteinkinase und spielt eine bedeutende Rolle in Vermittlung der DNA-schadensabhängigen Zellzykluskontrolle in der S- und G2-Phase durch den direkten Einfluss auf die Familie der Cdc25-Proteine (Zhao et al. 2002; Chen and Sanchez 2004; Inoue et al. 2007). Daneben vermittelt Chk1 proapoptische Signale, wie aktivierende und stabilisierende Phosphorylierungen im E2F-1/p73-vermittelten

Diskussion

Apoptoseweg (Gonzalez et al. 2003; Urist et al. 2004). Aktiviert wird Chk1 DNA-schadensabhängig von den Proteinkinasen ATM und ATR (Zhao and Piwnica-Worms 2001; Gatei et al. 2003). Der Nachweis für Chk1-Aktivität wurde über die zwei Phosphorylierungsstellen Serin 317 und Serin 345 innerhalb des Proteins geführt (Niida et al. 2007). In D14-Zellen konnte die Phosphorylierung von Chk1 an beiden Serinresten innerhalb der ersten 24 h nach Behandlung mit Fotemustin nachgewiesen werden. Das Aktivierungsniveau blieb anschließend konstant hoch. Im Gegensatz dazu wurde Chk1 in D05-Zellen schwächer aktiviert. Der Aktivierungszeitpunkt war in D05-Zellen vergleichbar zu dem in D14-Zellen, fiel aber bereits 48 h nach Behandlung wieder stark ab. Ein indirekter Nachweis für eine erhöhte Chk1-Aktivität in D14-Zellen konnte auch über die Phosphorylierung des Serin 37 im p53-Protein erbracht werden. Die Vermittlung dieser Phosphorylierung kann direkt und indirekt über Chk1 vermittelt werden (Shieh et al. 2000; GoudeLOCK et al. 2003). 48 h nach Fotemustinbehandlung konnte in D14-Zellen ein starkes Signal an p-p53^(Ser37) nachgewiesen werden, während in D05-Zellen ein nur sehr viel schwächerer Anstieg beobachtet wurde.

In D05-Zellen wurde neben dem Aktivierungsmuster eine starke Degradierung an Chk1-Gesamtprotein beobachtet. Zhang et al. zeigten, dass Chk1-Phosphorylierung am Serin 345 nicht nur zur enzymatischen Aktivierung der Kinase führt, sondern auch zu deren Degradation über den Proteasom-vermittelten Weg (Zhang et al. 2005). Dies wäre eine Erklärung für den Abfall des Chk1-Niveaus durch Aktivierung in D05-Zellen. Zhang et al. spekuliert in seiner Arbeit, dass die Kopplung des Signals für Aktivierung und Degradation einer übermäßigen Akkumulierung der Chk1-Aktivität entgegenwirkt und so einen permanenten Zellzyklusblock und Zelltod verhindert. Die Aufrechterhaltung der Chk1-Aktivität in der sensitiven Zelllinie D14 könnte so für die Vermittlung proapoptotischer Signale entscheidend sein.

Wie Chk1 wird auch Chk2 DNA-schadensabhängig aktiviert und führt ebenfalls zur Aktivierung der S- und G2-Phasenkontrollpunkte (Bartek and Lukas 2003). Auch Chk2 vermittelt neben dem Einfluss auf den Zellzyklus proapoptotische Signale. Diese wirken u.a. über p53 (Hirao et al. 2000; Takai et al. 2002), den E2F-1/p73-Weg (Stevens et al. 2003; Urist et al. 2004) und PML (Yang et al. 2002). Auch Chk2 wird in Folge von DNA-Schäden über die Proteinkinasen ATM und ATR aktiviert (Matsuoka et al. 1998; Pabla et al. 2008). Die Aktivität der Chk2-Kinase wurde zum einen über die Phosphorylierung des Threonin 68 innerhalb des Proteins (Ahn et al. 2002) und über das Chk2-Substrat p53 durch Phosphorylierung am Serinrest 20 nachgewiesen (Chehab et al. 2000; Hirao et al.

Diskussion

2000). In D14-Zellen gelang es nicht, eine schadensabhängige Phosphorylierung des Threonin 68 nach Fotemustinbehandlung nachzuweisen. Auch unbehandelte D14-Zellen zeigten ein Signal mit dem phospho-spezifischen Antikörper gegen Chk2. Die Phosphorylierung von p53 am Serin 20 konnte allerdings ausschließlich nach Behandlung mit Fotemustin nachgewiesen werden. In D05-Zellen konnte ein spezifisches Phosphorylierungssignal für p-Chk2^(Thr68) sowie die Phosphorylierung von p53 am Serin 20 nach Behandlung nachgewiesen werden. Anders als bei der Aktivierung von Chk1 konnte eine deutlich längere Aktivierungsphase von Chk2 in D05-Zellen detektiert werden. Die lange Aktivierung von Chk2 in D05-Zellen könnte für die Aufrechterhaltung des Fotemustin-vermittelten G2/M-Blocks verantwortlich sein, da sie nicht über die periphere Chk1-Aktivierung erklärt werden kann (siehe 4.2.1).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Fotemustin in beiden Zelllinien DNA-schadensbedingte Signalwege aktiviert. Eine stärkere Aktivierung der ATM- und Chk1-Kinasen konnte in der sensitiven Zelllinie D14 im Vergleich zu den resistenten D05-Zellen detektiert werden. Dies könnte durch die persistierenden DNA-Schäden in dieser Zelllinie erklärt werden. Die Auswirkung einer verstärkten und länger anhaltenden Kinasenaktivität könnte die Bereitschaft einer Zelle erhöhen, Apoptose zu unterlaufen.

4.2.7 Für p53-mutierte Melanomzellen könnte die Vermittlung von Apoptose über den Rb/E2F-1-Weg eine Alternative darstellen

Die Regulation einer Vielzahl proapoptotischer Gene teilt sich p53 mit dem Transkriptionsfaktor und Zellzyklusregulator E2F-1, einem Mitglied der E2F-Proteinfamilie (Bell and Ryan 2004). Die durch E2F-1 regulierte Transkription von Genen stellt in p53-mutierten Zellen somit einen alternativen Weg der Apoptoseinduktion dar. Die Hauptaufgabe der durch das Rb-Protein und Mitglieder der E2F-Familie regulierten Transkription ist die Steuerung des Zellzyklus am Übergang zwischen G1- bzw. G0- und S-Phase (Dyson 1998; Mittnacht 1998). Während unphosphoryliertes Rb-Protein mit E2F-Proteinen transkriptionell inaktive Komplexe bildet, bewirkt Rb-Proteinphosphorylierung die Auflösung des Komplexes und die Aktivierung der Transkription der E2F-Proteinfamilie (Dyson 1998; Lundberg and Weinberg 1998).

Kommt der Transkriptionsfaktor und Zellzyklusregulator E2F-1 im untersuchten Melanomzellensystem als ein proapoptotischer Faktor nach Fotemustinbehandlung in Frage? D05-Zellen bilden nach Fotemustinexposition einen G2/M-Block (siehe 4.2.1). Parallel zu der Induktion des G2/M-Blocks, zwei Tage nach Behandlung, konnte eine konstante Menge von E2F-1-Protein wie auch von phosphoryliertem Rb-Protein detektiert werden.

Diskussion

E2F-1 ist bis 48 h nach Fotemustinbehandlung auch dort lokalisiert, wo es transkriptionell wirkt: im Zellkern. 72 h nach Behandlung fiel die Menge von E2F-1-Gesamtprotein, phosphoryliertem Rb-Protein sowie dem Rb-Gesamtprotein deutlich ab. E2F-1-Protein war im Zellkern ebenfalls kaum mehr zu detektieren. Auf der Ebene der Transkription konnte eine Abnahme der Menge an *e2f-1*-mRNA schon 48 h nach Behandlung detektiert werden. Die Herunterregulierung dieser Faktoren nach Erreichen des G2/M-Blocks lassen vermuten, dass ihre Aufgabe in D05-Zellen in der Regulation des Zellzyklus und nicht im Prozess der Apoptoseinduktion zu suchen ist. D14-Zellen bilden einen vergleichbaren G2/M-Block nach Fotemustinbehandlung wie D05-Zellen. Im Gegensatz zu D05-Zellen regulieren D14-Zellen nach Fotemustingabe die Expression von E2F-1 auf mRNA- und Proteinebene herauf. Auch das Niveau an phosphoryliertem Rb-Protein und an Rb-Gesamtprotein blieb im Vergleich zu D05-Zellen konstant hoch. Dazu konnte bereits 12 h nach Behandlung eine deutliche Anreicherung an E2F-1-Protein im Zellkern beobachtet werden, die bis zu 72 h nach Behandlung konstant hoch blieb. Das hohe Niveau bzw. die Heraufregulierung dieser Faktoren in D14-Zellen nach Erreichen eines Fotemustin-induzierten G2/M-Blocks spricht für eine mögliche Beteiligung des Rb/E2F-1-Signalweges an Prozessen, die jenseits der Kontrolle des Zellzyklus angesiedelt sind.

Werden im untersuchten Zellsystem E2F-1 regulierte proapoptotische Gene vermehrt exprimiert? Zwei bedeutende proapoptotische Gene, welche direkt über E2F-1 reguliert werden, sind *apaf-1* und *TAp73* (Irwin et al. 2000; Moroni et al. 2001; Furukawa et al. 2002). Während Apaf-1 als Teil des Apoptosoms direkt in der apoptotischen Kaskade des mitochondrialen Weges integriert ist (Srinivasula et al. 1998), stellt das p53-Homolog TAp73 einen alternativen Transkriptionsfaktor für die Transkription der Gruppe der so genannten p53-regulierten, proapoptotischen Gene der Bcl-2 Familie dar (Ramadan et al. 2005). In D14-Zellen konnte eine leichte Erhöhung an *apaf-1* mRNA und eine deutliche Zunahme der *TAp73* mRNA nach Fotemustinbehandlung beobachtet werden. Dies traf in D05-Zellen nicht zu. Auf Proteinebene wurde Apaf-1 allerdings in beiden Zelllinien nicht beeinflusst. Der verfügbare Antikörper gegen TAp73 lieferte keine verwertbaren Ergebnisse. In der p53-mutierten Zelllinie D14 werden somit zwei klassische proapoptotische Transkriptionsprodukte von E2F-1 heraufreguliert. Es kann daher angenommen werden, dass in D14-Zellen E2F-1 die Transkription dieser proapoptotischen Gene gegenüber Fotemustin vermittelt, während in D05-Zellen E2F-1 nicht proapoptotisch wirkt. Die fehlende Zunahme von Apaf-1 und TAp73 auf Proteinebene lassen jedoch Zweifel an der biologischen Relevanz der E2F-1 vermittelten RNA-Induktion dieser Gene

Diskussion

aufkommen. Zusätzlich zeigten D14-Zellen, welche mit spezifischer siRNA gegen E2F-1 transfiziert wurden, keine Reduktion der apoptotischen Fraktion im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Allerdings wurde in der Zelllinie D14 nur eine maximale Reduktion des Proteins von 70% erreicht. In D05-Zellen hatte der Einsatz von siRNA gegen E2F-1 keinen Einfluss auf die Apoptoserate. Die Herunterregulierung des E2F-1 Proteins mittels siRNA hatte somit keinen funktionellen Einfluss auf die apoptotische Antwort gegenüber Fotemustin.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Rb/E2F-1-Signalweg nach Fotemustinbehandlung in der p53 mutierte Zelllinie D14 aktiviert wird. In D14-Zellen konnten auf Ebene der mRNA-Transkription Hinweise für die E2F-1-vermittelte Apoptose nachgewiesen werden. Damit könnte dieser Weg zu einer p53-unabhängig induzierten Apoptose beitragen. Ein funktioneller Nachweis konnte hierfür jedoch nicht erbracht werden.

4.3 Schematische Darstellung der Ergebnisse

Basierend auf den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Modelle für die Alkylantien-induzierte Zytotoxizität in malignen Melanomzellen erstellt. Die Wirkung des Alkylanz Temozolomid ist in Abbildung 4-2 dargestellt, die des CENU-Derivates Fotemustin in Abbildung 4-3.

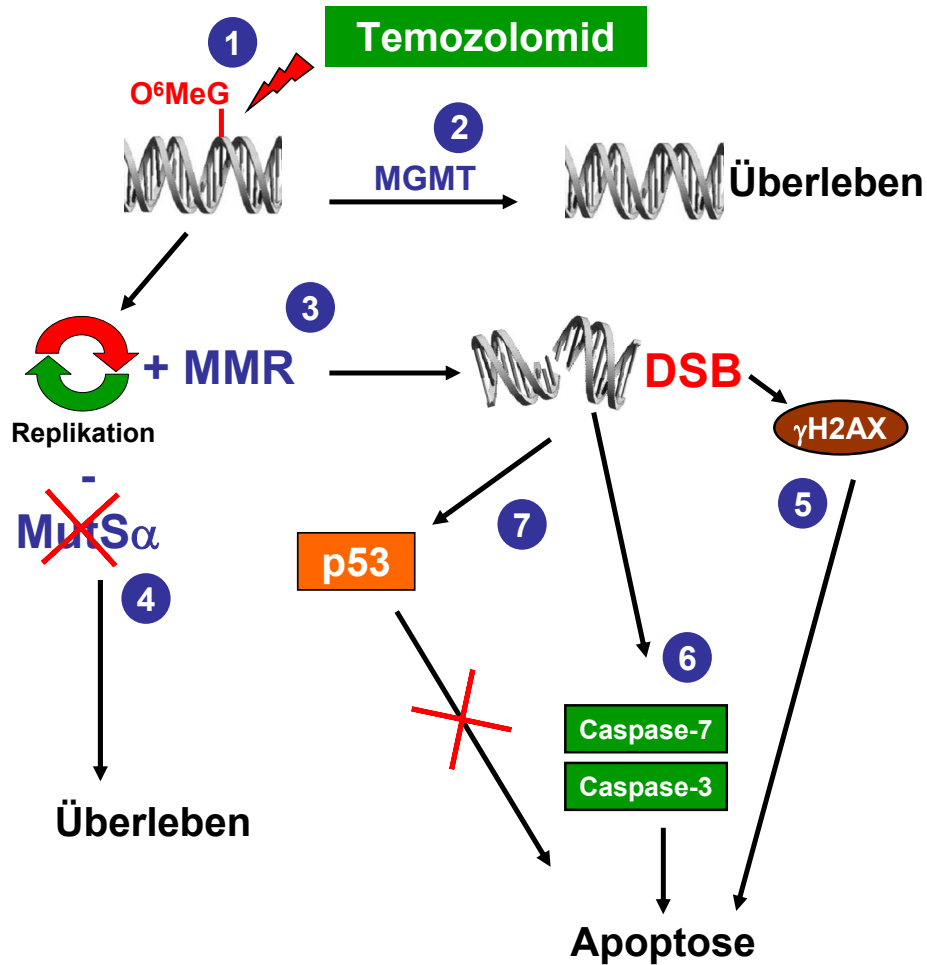


Abb. 4-2 Wirkung des Alkylanz Temozolomid auf Melanomzellen

Das Alkylanz Temozolomid induzieren u.a. die toxische Läsion O⁶MeG (1). Das Reparaturenzym MGMT entfernt spezifisch diese Läsion und bewahrt die Zelle so vor deren zytotoxischem Einfluss (2). Schlägt die Reparatur des O⁶MeG fehl, so werden in replizierenden Zellen mit profizienter MMR DSBs generiert (3). Die Ausbildung eines resistenten Phänotyps unter Einfluss dieser Alkyantiengruppe konnte in Melanomzellen auf ein Defizit in der MMR-Schadenserkennung (MutS α) zurückgeführt werden (4). Die Generierung von DSBs, repräsentiert durch γ H2AX-Induktion, korrelierte direkt mit der Sensitivität (5). Durch Apoptose wird die Temozolomid-bedingte Zytotoxizität in diesem Zellsystem induziert. Dies wurde u.a. durch die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 nachgewiesen (6). Temozolomid aktiviert p53-Protein in p53-Wildtypzellen, welches jedoch keinen Einfluss auf die Temozolomid-induzierte Apoptose ausübt (7).

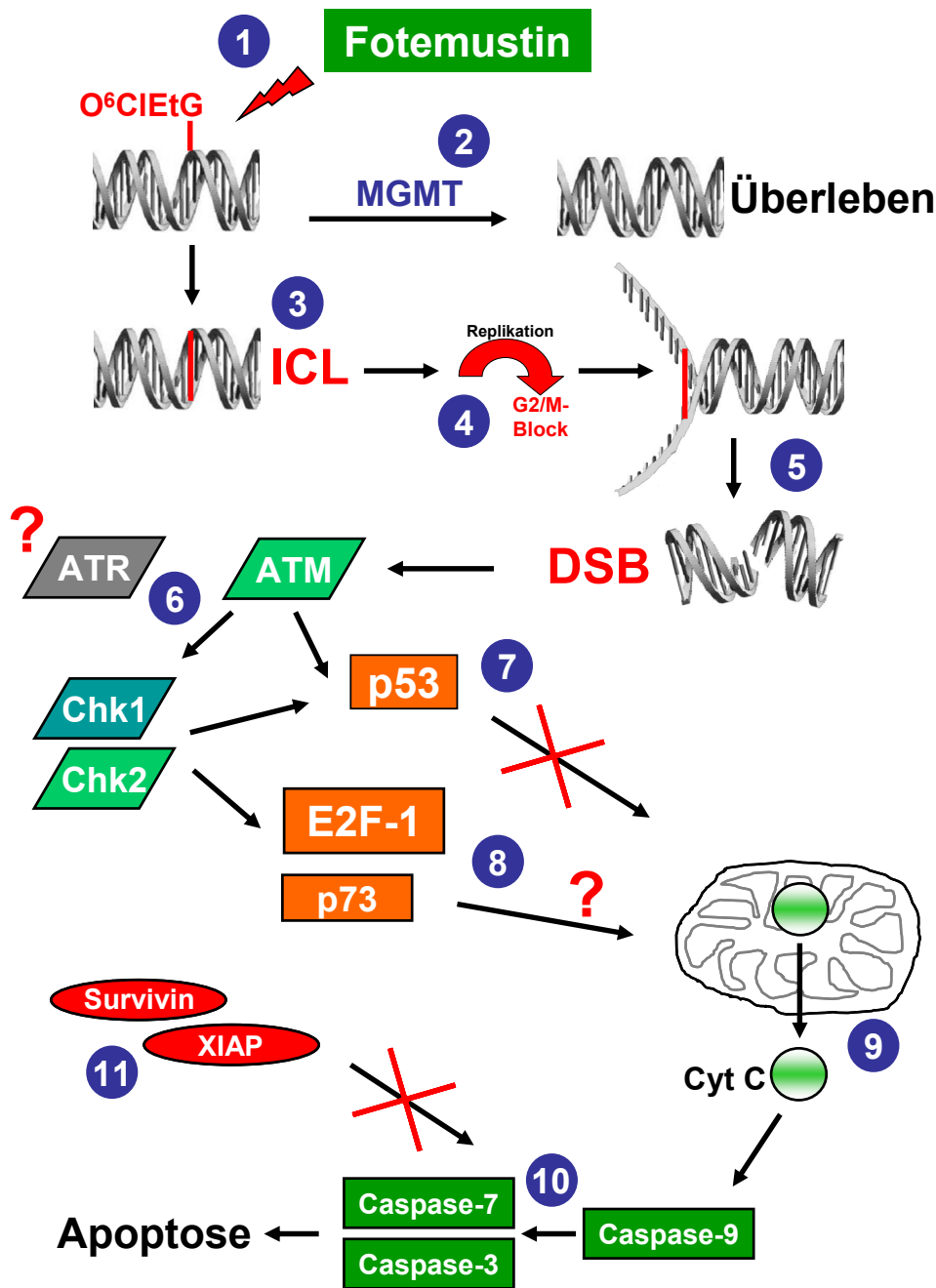


Abb. 4-3 Wirkung des Alkylanz Fotemustin auf Melanomzellen

Das Alkylanz Fotemustin induzieren u.a. die toxische Läsion O^6CIETG (1). Das Reparaturenzym MGMT entfernt spezifisch diese Läsion und bewahrt die Zelle so vor deren zytotoxischem Einfluss (2). Schlägt eine Reparatur durch MGMT fehl, so bildet sich aus der Läsion ein ICL (3). Die Detektion der ICLs findet beim Durchlaufen des Behandlungszellzyklus statt, bevor die Zelle in einem G2/M-Arrest verharrt (4). Der Kollaps von Replikationsgabeln und die initiale ICL-Prozessierung führen zur Bildung von DSBs (5). Die DNA-schadensabhängige Proteinkinase ATM (spekulativ auch ATR) vermitteln über die Checkpoint Kinasen 1 und 2 untergeordnete Signaltransduktionsprozesse (6). Fotemustin aktiviert p53-Protein in p53-Wildtypzellen, welches jedoch keinen Einfluss auf die Fotemustin-induzierte Zytotoxizität ausübt (7). Es konnten jedoch Hinweise auf eine Beteiligung des Rb/E2F-1/p73-Wegs gefunden werden (8). Fotemustin-bedingte Zytotoxizität wird über den mitochondrialen Apoptoseweg initiiert, welches u.a. durch Cytochrom C-Freigabe und Caspase-9 Aktivierung nachgewiesen werden konnte (9) und mündet in die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 (10). Die antiapoptotischen IAP-Mitglieder XIAP und Survivin stellen keine Resistenzmarker gegenüber Fotemustin in diesem Zellsystem dar (11).

5 Zusammenfassung

Maligne Melanome sind gegenüber Chemotherapeutika relativ resistent. Das methylierende Alkylanz Temozolomid sowie das chlorethylierende und ICL-bildende Alkylanz Fotemustin kommen bei der Behandlung des malignen Melanoms als Mittel erster Wahl zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit konnte das erste Mal nachgewiesen werden, dass die zytotoxische Wirkung von Temozolomid und Fotemustin in Melanomzellen durch Apoptose vermittelt wird. Unter Verwendung klinisch relevanter Dosen der beiden Alkylantien konnte die Induktion von Apoptose durch vier unabhängige Methoden (Bestimmung der SubG1-Fraktion und der Apoptose- / Nekrose-Frequenz, Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 sowie Spaltung von PARP-1) nachgewiesen werden. Die Alkylierungen an der O⁶-Position des Guanins, welche durch beide Agenzien induziert werden, sind auch in Melanomzellen die wichtigsten Zytotoxizität-bewirkenden Läsionen in der DNA, und MGMT ist folglich ein herausragender Resistenzmarker. Eine der verwendeten Zelllinien (D05) exprimiert p53-Wildtypprotein. Diese Zelllinie war resistenter als alle anderen Zelllinien gegenüber Temozolomid und Fotemustin. Dies weist darauf hin, dass p53 nicht die Apoptoseinduktion in Melanomzellen verstärkt.

Die Prozessierung des O⁶MeG erfolgt über die MMR unter Generierung von DSBs. Die Untersuchung der durch Temozolomid induzierten DSBs, nachgewiesen durch γ H2AX-Induktion, korrelierte direkt mit der apoptotischen Antwort von Melanomzelllinien und DSBs können somit als eine entscheidende apoptoseauslösende Größe angesehen werden. Eine Resistenz gegenüber methylierenden Alkylantien in der Zelllinie MZ7 konnte auf einen Defekt in der MMR-Schadenserkennung auf der Ebene des Mut α -Komplexes zurückgeführt werden. Dieser Defekt hatte keinen Einfluss auf die Fotemustin-vermittelte Apoptoseinduktion. Neben MGMT konnte somit MMR als Resistenzfaktor gegenüber methylierenden Agenzien in Melanomen identifiziert werden.

Die Fotemustin-induzierte Apoptose wurde in Melanomzelllinien im Detail untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass Fotemustin-bedingte ICLs in Zellen einen G2/M-Arrest im Behandlungszyklus induzieren. Wie anhand G1-arretierter Zellen nachgewiesen werden konnte, war das Durchlaufen der DNA-Replikation vor Erreichen des Arrests für die Induktion der Apoptose notwendig. Die Prozessierung von ICLs ist im Vergleich zu Methylierungen der DNA deutlich komplexer. Dies könnte erklären, warum in Melanomzellen die durch γ H2AX-Induktion repräsentierten DSBs nicht mit der Sensitivität der einzelnen Zelllinien korreliert. Die Untersuchung unterschiedlich sensitiver

Zusammenfassung

Zelllinien zeigte ein vergleichbares Schadensniveau an ICLs und eine ebenso vergleichbare initiale Prozessierung derselben unter Generierung von DSBs. Die Prozessierung dieser sekundären Läsionen, welche anhand der Abnahme von γ H2AX-Foci untersucht wurde, war hingegen in der sensitiveren Melanomzelllinie deutlich weniger effektiv. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass eine uneffektive Prozessierung der sekundären Läsionen einhergeht mit einer verstärkten und länger anhaltenden Aktivierung der in der DSB-Detektion beteiligten Kinase ATM und der Checkpoint Kinase 1. Es wäre daher denkbar, dass eine verstärkte Aktivität dieser Kinasen proapoptotische Signale vermittelt. Unterschiede in der Prozessierung der sekundären Läsionen könnten somit ein wichtiger Marker der ICL-induzierten Apoptose darstellen.

Des weitern konnte nachgewiesen werden, dass nach Fotemustingabe die mitochondrial-vermittelte Apoptose einen effektiven Exekutionsweg in Melanomen darstellt. Während Cytochrom C-Freigabe, Bcl-2-Abnahme an den Mitochondrien, Bax-Rekrutierung und Caspase-9 Aktivität nachgewiesen werden konnten, wurden keine Hinweise auf eine Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose gefunden. Die Unfähigkeit, Rezeptor-vermittelte Apoptose zu unterlaufen, könnte die Bedeutungslosigkeit des *p53*-Gens in Melanomen begründen, da gerade dieser Weg in der Alkylantien-induzierten Apoptose in anderen Zellsystemen eine große Relevanz besitzt. Bei der Suche nach einem alternativen proapoptotischen Signalweg konnten Hinweise für die Beteiligung des Rb/E2F-1-Wegs, welcher über p73 agiert, in einer p53-mutierten Melanomzelllinie gefunden werden. Einen Einfluss der IAPs Survivin und XIAP als Resistenzfaktoren auf die Fotemustin-induzierte Apoptose wurde hingegen nicht nachgewiesen.

6 Literatur

- Abbott, P.J. and Saffhill, R. 1979. DNA synthesis with methylated poly(dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O(6)-methylguanine. *Biochim Biophys Acta* **562**(1): 51-61.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., and Akey, C.W. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**(2): 423-432.
- Ahn, J.Y., Li, X., Davis, H.L., and Canman, C.E. 2002. Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *J Biol Chem* **277**(22): 19389-19395.
- Akkari, Y.M., Bateman, R.L., Reifsteck, C.A., Olson, S.B., and Grompe, M. 2000. DNA replication is required To elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links. *Mol Cell Biol* **20**(21): 8283-8289.
- Alanko, T., Rosenberg, M., and Saksela, O. 1999. FGF expression allows nevus cells to survive in three-dimensional collagen gel under conditions that induce apoptosis in normal human melanocytes. *J Invest Dermatol* **113**(1): 111-116.
- Albino, A.P., Vidal, M.J., McNutt, N.S., Shea, C.R., Prieto, V.G., Nanus, D.M., Palmer, J.M., and Hayward, N.K. 1994. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res* **4**(1): 35-45.
- Allen, R.T., Cluck, M.W., and Agrawal, D.K. 1998. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* **54**(5): 427-445.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**(2): 171.
- Alvino, E., Castiglia, D., Caporali, S., Peponi, R., Caporaso, P., Lacal, P.M., Marra, G., Fischer, F., Zambruno, G., Bonmassar, E., Jiricny, J., and D'Atri, S. 2006. 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* **29**(4): 785-797.
- Appella, E. and Anderson, C.W. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* **268**(10): 2764-2772.
- Aquilina, G., Ceccotti, S., Martinelli, S., Hampson, R., and Bignami, M. 1998. N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosourea sensitivity in mismatch repair-defective human cells. *Cancer Res* **58**(1): 135-141.
- Aquilina, G., Ceccotti, S., Martinelli, S., Soddu, S., Crescenzi, M., Branch, P., Karran, P., and Bignami, M. 2000. Mismatch repair and p53 independently affect sensitivity to N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosourea. *Clin Cancer Res* **6**(2): 671-680.
- Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M., and Saya, H. 2005. Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J Biol Chem* **280**(19): 19166-19176.
- Armstrong, B.K. and Krickler, A. 1994. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv* **19-20**: 219-240.
- Armstrong, J.L., Veal, G.J., Redfern, C.P., and Lovat, P.E. 2007. Role of Noxa in p53-independent fenretinide-induced apoptosis of neuroectodermal tumours. *Apoptosis* **12**(3): 613-622.
- Arnould, S., Spanswick, V.J., Macpherson, J.S., Hartley, J.A., Thurston, D.E., Jodrell, D.I., and Guichard, S.M. 2006. Time-dependent cytotoxicity induced by SJG-136 (NSC 694501): influence of the rate of interstrand cross-link formation on DNA damage signaling. *Mol Cancer Ther* **5**(6): 1602-1609.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**(6922): 499-506.
- Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J.M., McMasters, K.M., Mihm, M.F., Morton, D.L., Reintgen, D.S., Ross, M.I., Sober, A., Thompson, J.A., and Thompson, J.F. 2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **19**(16): 3635-3648.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**(5383): 1674-1677.
- Banks, D.P., Plescia, J., Altieri, D.C., Chen, J., Rosenberg, S.H., Zhang, H., and Ng, S.C. 2000. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood* **96**(12): 4002-4003.
- Bartek, J. and Lukas, J. 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* **3**(5): 421-429.

Literatur

- Bartsch, H. and Montesano, R. 1984. Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis* **5**(11): 1381-1393.
- Baskaran, R., Wood, L.D., Whitaker, L.L., Canman, C.E., Morgan, S.E., Xu, Y., Barlow, C., Baltimore, D., Wynshaw-Boris, A., Kastan, M.B., and Wang, J.Y. 1997. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* **387**(6632): 516-519.
- Batista, L.F., Roos, W.P., Christmann, M., Menck, C.F., and Kaina, B. 2007. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **67**(24): 11886-11895.
- Baumann, P. and West, S.C. 1997. The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *Embo J* **16**(17): 5198-5206.
- Beardsley, D.I., Kim, W.J., and Brown, K.D. 2005. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine activates cell-cycle arrest through distinct mechanisms activated in a dose-dependent manner. *Mol Pharmacol* **68**(4): 1049-1060.
- Becker, K., Dosch, J., Gregel, C.M., Martin, B.A., and Kaina, B. 1996. Targeted expression of human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res* **56**(14): 3244-3249.
- Bell, L.A. and Ryan, K.M. 2004. Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death Differ* **11**(2): 137-142.
- Benson, F.E., Stasiak, A., and West, S.C. 1994. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *Embo J* **13**(23): 5764-5771.
- Beranek, D.T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* **231**(1): 11-30.
- Berardini, M., Foster, P.L., and Loechler, E.L. 1999. DNA polymerase II (polB) is involved in a new DNA repair pathway for DNA interstrand cross-links in Escherichia coli. *J Bacteriol* **181**(9): 2878-2882.
- Bessho, T. 2003. Induction of DNA replication-mediated double strand breaks by psoralen DNA interstrand cross-links. *J Biol Chem* **278**(7): 5250-5254.
- Biroccio, A., Bufalo, D.D., Ricca, A., D'Angelo, C., D'Orazi, G., Sacchi, A., Soddu, S., and Zupi, G. 1999. Increase of BCNU sensitivity by wt-p53 gene therapy in glioblastoma lines depends on the administration schedule. *Gene Ther* **6**(6): 1064-1072.
- Blackwell, L.J., Bjornson, K.P., Allen, D.J., and Modrich, P. 2001. Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis. *J Biol Chem* **276**(36): 34339-34347.
- Blackwell, L.J., Bjornson, K.P., and Modrich, P. 1998a. DNA-dependent activation of the hMutSalpha ATPase. *J Biol Chem* **273**(48): 32049-32054.
- Blackwell, L.J., Martik, D., Bjornson, K.P., Bjornson, E.S., and Modrich, P. 1998b. Nucleotide-promoted release of hMutSalpha from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J Biol Chem* **273**(48): 32055-32062.
- Bleehen, N.M., Newlands, E.S., Lee, S.M., Thatcher, N., Selby, P., Calvert, A.H., Rustin, G.J., Brampton, M., and Stevens, M.F. 1995. Cancer Research Campaign phase II trial of temozolomide in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **13**(4): 910-913.
- Boddy, M.N., Gaillard, P.H., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., 3rd, and Russell, P. 2001. Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* **107**(4): 537-548.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**(6): 803-815.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., and Wallach, D. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* **270**(14): 7795-7798.
- Bolzan, A.D. and Bianchi, M.S. 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* **512**(2-3): 121-134.
- Borges, H.L., Chao, C., Xu, Y., Linden, R., and Wang, J.Y. 2004. Radiation-induced apoptosis in developing mouse retina exhibits dose-dependent requirement for ATM phosphorylation of p53. *Cell Death Differ* **11**(5): 494-502.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., and Shore, G.C. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **22**(53): 8608-8618.
- Brent, T.P., Lestrud, S.O., Smith, D.G., and Remack, J.S. 1987. Formation of DNA interstrand cross-links by the novel chloroethylating agent 2-chloroethyl(methylsulfonyl)methanesulfonate: suppression by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase purified from human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res* **47**(13): 3384-3387.
- Briegert, M. and Kaina, B. 2007. Human monocytes, but not dendritic cells derived from them, are defective in base excision repair and hypersensitive to methylating agents. *Cancer Res* **67**(1): 26-31.
- Broker, L.E., Kruyt, F.A., and Giaccone, G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* **11**(9): 3155-3162.

Literatur

- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**(45): 42462-42467.
- Busch, D.B., van Vuuren, H., de Wit, J., Collins, A., Zdzienicka, M.Z., Mitchell, D.L., Brookman, K.W., Stefanini, M., Riboni, R., Thompson, L.H., Albert, R.B., van Gool, A.J., and Hoeijmakers, J. 1997. Phenotypic heterogeneity in nucleotide excision repair mutants of rodent complementation groups 1 and 4. *Mutat Res* **383**(2): 91-106.
- Campbell, C., Quinn, A.G., Angus, B., Farr, P.M., and Rees, J.L. 1993. Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Res* **53**(12): 2697-2699.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. 1998. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**(5383): 1677-1679.
- Caporali, S., Falcinelli, S., Starace, G., Russo, M.T., Bonmassar, E., Jiricny, J., and D'Atri, S. 2004. DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol Pharmacol* **66**(3): 478-491.
- Carson, C.T., Schwartz, R.A., Stracker, T.H., Lilley, C.E., Lee, D.V., and Weitzman, M.D. 2003. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *Embo J* **22**(24): 6610-6620.
- Cary, R.B., Chen, F., Shen, Z., and Chen, D.J. 1998. A central region of Ku80 mediates interaction with Ku70 in vivo. *Nucleic Acids Res* **26**(4): 974-979.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**(6798): 855-862.
- Chakravarti, D., Ibeanu, G.C., Tano, K., and Mitra, S. 1991. Cloning and expression in Escherichia coli of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* **266**(24): 15710-15715.
- Chang, H.Y. and Yang, X. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 821-846.
- Chawla-Sarkar, M., Bae, S.I., Reu, F.J., Jacobs, B.S., Lindner, D.J., and Borden, E.C. 2004. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **11**(8): 915-923.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T.D. 2000. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* **14**(3): 278-288.
- Chen, J.M., Zhang, Y.P., Wang, C., Sun, Y., Fujimoto, J., and Ikenaga, M. 1992. O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in human tumors. *Carcinogenesis* **13**(9): 1503-1507.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* **17**(3): 393-403.
- Chen, M., Guerrero, A.D., Huang, L., Shabier, Z., Pan, M., Tan, T.H., and Wang, J. 2007. Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic BCL-2 family members. *J Biol Chem* **282**(46): 33888-33895.
- Chen, X.B., Melchionna, R., Denis, C.M., Gaillard, P.H., Blasina, A., Van de Weyer, I., Boddy, M.N., Russell, P., Vialard, J., and McGowan, C.H. 2001. Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro. *Mol Cell* **8**(5): 1117-1127.
- Chen, Y. and Sanchez, Y. 2004. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1025-1032.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J.M. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**(5345): 1966-1968.
- Chiang, C.W., Harris, G., Ellig, C., Masters, S.C., Subramanian, R., Shenolikar, S., Wadzinski, B.E., and Yang, E. 2001. Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood* **97**(5): 1289-1297.
- Chiang, C.W., Kanies, C., Kim, K.W., Fang, W.B., Parkhurst, C., Xie, M., Henry, T., and Yang, E. 2003. Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **23**(18): 6350-6362.
- Chiarion Sileni, V., Nortilli, R., Aversa, S.M., Paccagnella, A., Medici, M., Corti, L., Favaretto, A.G., Cetto, G.L., and Monfardini, S. 2001. Phase II randomized study of dacarbazine, carmustine, cisplatin and tamoxifen versus dacarbazine alone in advanced melanoma patients. *Melanoma Res* **11**(2): 189-196.
- Chin, L., Pomerantz, J., Polsky, D., Jacobson, M., Cohen, C., Cordon-Cardo, C., Horner, J.W., 2nd, and DePinho, R.A. 1997. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev* **11**(21): 2822-2834.
- Chinnaiyan, A.M. and Dixit, V.M. 1996. The cell-death machine. *Curr Biol* **6**(5): 555-562.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**(4): 505-512.

Literatur

- Chinot, O.L., Barrie, M., Fuentes, S., Eudes, N., Lancelot, S., Metellus, P., Muracciole, X., Braguer, D., Ouafik, L., Martin, P.M., Dufour, H., and Figarella-Branger, D. 2007. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* **25**(12): 1470-1475.
- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., and Green, D.R. 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* **13**(8): 1396-1402.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**(5660): 1010-1014.
- Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., and Wagner, G. 1999. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* **96**(5): 615-624.
- Christmann, M., Pick, M., Lage, H., Schadendorf, D., and Kaina, B. 2001. Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer* **92**(1): 123-129.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., and Kaina, B. 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**(1-2): 3-34.
- Cohen, G.M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326** (Pt 1): 1-16.
- Colussi, C., Parlanti, E., Degan, P., Aquilina, G., Barnes, D., Macpherson, P., Karran, P., Crescenzi, M., Dogliotti, E., and Bignami, M. 2002. The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* **12**(11): 912-918.
- Constantinou, A., Davies, A.A., and West, S.C. 2001. Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells. *Cell* **104**(2): 259-268.
- Cregan, S.P., Dawson, V.L., and Slack, R.S. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* **23**(16): 2785-2796.
- Critchlow, S.E., Bowater, R.P., and Jackson, S.P. 1997. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* **7**(8): 588-598.
- Curry, C.L., Reed, L.L., Broude, E., Golde, T.E., Miele, L., and Foreman, K.E. 2007. Notch inhibition in Kaposi's sarcoma tumor cells leads to mitotic catastrophe through nuclear factor-kappaB signaling. *Mol Cancer Ther* **6**(7): 1983-1992.
- Daniels, D.S. and Tainer, J.A. 2000. Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Mutat Res* **460**(3-4): 151-163.
- Dart, D.A., Adams, K.E., Akerman, I., and Lakin, N.D. 2004. Recruitment of the cell cycle checkpoint kinase ATR to chromatin during S-phase. *J Biol Chem* **279**(16): 16433-16440.
- Datta, R., Oki, E., Endo, K., Biedermann, V., Ren, J., and Kufe, D. 2000. XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage. *J Biol Chem* **275**(41): 31733-31738.
- Day, R.S., 3rd, Ziolkowski, C.H., Scudiero, D.A., Meyer, S.A., Lubiniecki, A.S., Girardi, A.J., Galloway, S.M., and Bynum, G.D. 1980. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains. *Nature* **288**(5792): 724-727.
- De Silva, I.U., McHugh, P.J., Clingen, P.H., and Hartley, J.A. 2000. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **20**(21): 7980-7990.
- Delaney, J.C. and Essigmann, J.M. 2004. Mutagenesis, genotoxicity, and repair of 1-methyladenine, 3-alkylcytosines, 1-methylguanine, and 3-methylthymine in alkB *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(39): 14051-14056.
- DeMarini, D.M. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res* **567**(2-3): 447-474.
- Deveraux, Q.L. and Reed, J.C. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**(3): 239-252.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* **17**(8): 2215-2223.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**(6639): 300-304.
- Dhodapkar, M., Rubin, J., Reid, J.M., Burch, P.A., Pitot, H.C., Buckner, J.C., Ames, M.M., and Suman, V.J. 1997. Phase I trial of temozolomide (NSC 362856) in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **3**(7): 1093-1100.
- Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J., and Zeiher, A.M. 1999. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* **189**(11): 1815-1822.
- Ding, Q., Reddy, Y.V., Wang, W., Woods, T., Douglas, P., Ramsden, D.A., Lees-Miller, S.P., and Meek, K. 2003. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required

Literatur

- for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **23**(16): 5836-5848.
- Ding, Y., Prieto, V.G., Zhang, P.S., Rosenthal, S., Smith, K.J., Skelton, H.G., and Diwan, A.H. 2006. Nuclear expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Cancer* **106**(5): 1123-1129.
- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C.E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong, R., Matsuzawa, S., Salvesen, G.S., Reed, J.C., and Altieri, D.C. 2004. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* **279**(33): 34087-34090.
- Dosch, J., Christmann, M., and Kaina, B. 1998. Mismatch G-T binding activity and MSH2 expression is quantitatively related to sensitivity of cells to methylating agents. *Carcinogenesis* **19**(4): 567-573.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**(1): 33-42.
- Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Poirier, G.G., Froelich, C.J., He, W.W., and Dixit, V.M. 1996. ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biol Chem* **271**(28): 16720-16724.
- Duckett, D.R., Drummond, J.T., Murchie, A.I., Reardon, J.T., Sancar, A., Lilley, D.M., and Modrich, P. 1996. Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6443-6447.
- Dumenco, L.L., Allay, E., Norton, K., and Gerson, S.L. 1993. The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science* **259**(5092): 219-222.
- Duncan, T., Trewick, S.C., Koivisto, P., Bates, P.A., Lindahl, T., and Sedgwick, B. 2002. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16660-16665.
- Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**(15): 2245-2262.
- Eadie, J.S., Conrad, M., Toorchen, D., and Topal, M.D. 1984. Mechanism of mutagenesis by O6-methylguanine. *Nature* **308**(5955): 201-203.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**(10): 988-994.
- Egerer, G., Lehnert, T., Max, R., Naehrer, H., Keilholz, U., and Ho, A.D. 2001. Pilot study of hepatic intraarterial fotemustine chemotherapy for liver metastases from uveal melanoma: a single-center experience with seven patients. *Int J Clin Oncol* **6**(1): 25-28.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**(4): 817-825.
- Emanuel, P.O., Phelps, R.G., Mudgil, A., Shafir, M., and Burstein, D.E. 2008. Immunohistochemical detection of XIAP in melanoma. *J Cutan Pathol* **35**(3): 292-297.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Evrard, A., Passagne, I., Bibeau, F., Raynaud, P., Capdetrey, H., Depeille, P., Macari, F., Cuq, P., Vian, L., and Cupissol, D. 2003. Real-time PCR quantification of O6-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in human melanoma. *Proc Am Assoc Cancer Res* **94**: 4658.
- Fang, W.H. and Modrich, P. 1993. Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. *J Biol Chem* **268**(16): 11838-11844.
- Faris, M., Latinis, K.M., Kempiak, S.J., Koretzky, G.A., and Nel, A. 1998. Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol Cell Biol* **18**(9): 5414-5424.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1371-1387.
- Fety, R., Lucas, C., Solere, P., Cour, V., and Vignoud, J. 1992. Hepatic intra-arterial infusion of fotemustine: pharmacokinetics. *Cancer Chemother Pharmacol* **31**(2): 118-122.
- Fink, D., Aebi, S., and Howell, S.B. 1998. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* **4**(1): 1-6.
- Fischel, J.L., Formento, P., Etienne, M.C., Gioanni, J., Frenay, M., Deloffre, P., Bizzari, J.P., and Milano, G. 1990. In vitro chemosensitivity testing of Fotemustine (S 10036), a new antitumor nitrosourea. *Cancer Chemother Pharmacol* **25**(5): 337-341.
- Fishel, R. 1998. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes Dev* **12**(14): 2096-2101.
- Flinterman, M., Guelen, L., Ezzati-Nik, S., Killick, R., Melino, G., Tominaga, K., Mymryk, J.S., Gaken, J., and Tavassoli, M. 2005. E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *J Biol Chem* **280**(7): 5945-5959.
- Florenes, V.A., Oyjord, T., Holm, R., Skrede, M., Borresen, A.L., Nesland, J.M., and Fodstad, O. 1994. TP53 allele loss, mutations and expression in malignant melanoma. *Br J Cancer* **69**(2): 253-259.

Literatur

- Fong, W.G., Liston, P., Rajcan-Separovic, E., St Jean, M., Craig, C., and Korneluk, R.G. 2000. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* **70**(1): 113-122.
- Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., Ashworth, A., and Jeggo, P. 2003. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J* **22**(11): 2860-2871.
- Fraker, P.J., King, L.E., Lill-Elghanian, D., and Telford, W.G. 1995. Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer. *Methods Cell Biol* **46**: 57-76.
- Frick, S., Lischner, S., Rosien, F., Haacke, T.C., Schafer, F., Christophers, E., and Hauschild, A. 2002. [Temozolomide as therapeutic option for patients with metastatic melanoma and poor prognosis]. *Hautarzt* **53**(10): 659-665.
- Furukawa, Y., Nishimura, N., Furukawa, Y., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y., and Nakamura, M. 2002. Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**(42): 39760-39768.
- Garbe, C. and Blum, A. 2001. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14**(5): 280-290.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., and Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* **13**(9): 1423-1433.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.B., Bartek, J., and Khanna, K.K. 2003. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* **278**(17): 14806-14811.
- Genschel, J., Bazemore, L.R., and Modrich, P. 2002. Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J Biol Chem* **277**(15): 13302-13311.
- Gillissen, B., Essmann, F., Graupner, V., Starck, L., Radetzki, S., Dorken, B., Schulze-Osthoff, K., and Daniel, P.T. 2003. Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *Embo J* **22**(14): 3580-3590.
- Glinisky, G.V., Glinisky, V.V., Ivanova, A.B., and Hueser, C.J. 1997. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett* **115**(2): 185-193.
- Goldmacher, V.S., Cuzick, R.A., Jr., and Thilly, W.G. 1986. Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation by methylnitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Biol Chem* **261**(27): 12462-12471.
- Goldstein, M., Roos, W.P., and Kaina, B. 2008. Apoptotic death induced by the cyclophosphamide analogue mafosfamide in human lymphoblastoid cells: Contribution of DNA replication, transcription inhibition and Chk/p53 signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Gonzaga, P.E., Potter, P.M., Niu, T.Q., Yu, D., Ludlum, D.B., Rafferty, J.A., Margison, G.P., and Brent, T.P. 1992. Identification of the cross-link between human O6-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea-treated DNA. *Cancer Res* **52**(21): 6052-6058.
- Gonzalez, S., Prives, C., and Cordon-Cardo, C. 2003. p73alpha regulation by Chk1 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **23**(22): 8161-8171.
- Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., and Perez, J.M. 2001. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* **59**(4): 657-663.
- Goria-Gatti, L., Iannone, A., Tomasi, A., Poli, G., and Albano, E. 1992. In vitro and in vivo evidence for the formation of methyl radical from procarbazine: a spin-trapping study. *Carcinogenesis* **13**(5): 799-805.
- Goudelock, D.M., Jiang, K., Pereira, E., Russell, B., and Sanchez, Y. 2003. Regulatory interactions between the checkpoint kinase Chk1 and the proteins of the DNA-dependent protein kinase complex. *J Biol Chem* **278**(32): 29940-29947.
- Gradia, S., Acharya, S., and Fishel, R. 1997. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* **91**(7): 995-1005.
- Grandgirard, D., Studer, E., Monney, L., Belser, T., Fellay, I., Borner, C., and Michel, M.R. 1998. Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *Embo J* **17**(5): 1268-1278.
- Greene, M.H., Clark, W.H., Jr., Tucker, M.A., Kraemer, K.H., Elder, D.E., and Fraser, M.C. 1985. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med* **102**(4): 458-465.
- Grob, T.J., Novak, U., Maise, C., Barcaroli, D., Luthi, A.U., Pirnia, F., Hugli, B., Graber, H.U., De Laurenzi, V., Fey, M.F., Melino, G., and Tobler, A. 2001. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ* **8**(12): 1213-1223.

- Grombacher, T., Eichhorn, U., and Kaina, B. 1998. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene* **17**(7): 845-851.
- Grossman, D. and Altieri, D.C. 2001. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev* **20**(1-2): 3-11.
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* **277**(16): 13430-13437.
- Hacker, G. and Weber, A. 2007. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch Biochem Biophys* **462**(2): 150-155.
- Harris, L.C., Remack, J.S., Houghton, P.J., and Brent, T.P. 1996. Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* **56**(9): 2029-2032.
- Hayes, M.T., Bartley, J., Parsons, P.G., Eaglesham, G.K., and Prakash, A.S. 1997. Mechanism of action of fotemustine, a new chloroethylnitrosourea anticancer agent: evidence for the formation of two DNA-reactive intermediates contributing to cytotoxicity. *Biochemistry* **36**(35): 10646-10654.
- Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., Kaina, B., and Weller, M. 2006. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem* **96**(3): 766-776.
- Hershko, T. and Ginsberg, D. 2004. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **279**(10): 8627-8634.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. 2000. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**(5459): 1824-1827.
- Hirose, Y., Berger, M.S., and Pieper, R.O. 2001. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* **61**(5): 1957-1963.
- Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., Chen, J., and Murphy, M. 2002. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* **277**(5): 3247-3257.
- Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res* **5**: 282-304.
- Hoy, C.A., Thompson, L.H., Mooney, C.L., and Salazar, E.P. 1985. Defective DNA cross-link removal in Chinese hamster cell mutants hypersensitive to bifunctional alkylating agents. *Cancer Res* **45**(4): 1737-1743.
- Hsu, H.L., Yannone, S.M., and Chen, D.J. 2002. Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA Repair (Amst)* **1**(3): 225-235.
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3668-3672.
- Inga, A., Chen, F.X., Monti, P., Aprile, A., Campomenosi, P., Menichini, P., Ottaggio, L., Viaggi, S., Abbondandolo, A., Gold, B., and Fronza, G. 1999. N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea tethered to lexitropsin induces minor groove lesions at the p53 cDNA that are more cytotoxic than mutagenic. *Cancer Res* **59**(3): 689-695.
- Inoue, Y., Kitagawa, M., and Taya, Y. 2007. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *Embo J* **26**(8): 2083-2093.
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., and Kaelin, W.G., Jr. 2000. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**(6804): 645-648.
- Ismail, I.H. and Hendzel, M.J. 2008. The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen* **49**(1): 73-82.
- Ismail, I.H., Nystrom, S., Nygren, J., and Hammarsten, O. 2005. Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **280**(6): 4649-4655.
- Jacquillat, C., Khayat, D., Banzet, P., Weil, M., Avril, M.F., Fumoleau, P., Namer, M., Bonnetterre, J., Kerbrat, P., Bonerandi, J.J., and et al. 1990. Chemotherapy by fotemustine in cerebral metastases of disseminated malignant melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **25**(4): 263-266.
- Jagerstad, M. and Skog, K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res* **574**(1-2): 156-172.
- Jean-Claude, B.J., Mustafa, A., Watson, A.J., Damian, Z., Vasilescu, D., Chan, T.H., and Leyland-Jones, B. 1999. Tetrazepinones are equally cytotoxic to Mer+ and Mer- human tumor cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* **288**(2): 484-489.
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., and Roos, W.P. 2007. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* **6**(8): 1079-1099.
- Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S., and Coquerelle, T. 1991. Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of

Literatur

- MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* **12**(10): 1857-1867.
- Kaina, B., Muhlhausen, U., Piee-Staffa, A., Christmann, M., Garcia Boy, R., Rosch, F., and Schirmacher, R. 2004. Inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by glucose-conjugated inhibitors: comparison with nonconjugated inhibitors and effect on fotemustine and temozolomide-induced cell death. *J Pharmacol Exp Ther* **311**(2): 585-593.
- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K., and Coquerelle, T. 1997. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* **381**(2): 227-241.
- Karran, P. and Bignami, M. 1994. DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* **16**(11): 833-839.
- Kartasheva, N.N., Contente, A., Lenz-Stoppler, C., Roth, J., and Dobbstein, M. 2002. p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* **21**(31): 4715-4727.
- Kaufmann, W.K. and Paules, R.S. 1996. DNA damage and cell cycle checkpoints. *Faseb J* **10**(2): 238-247.
- Kawabata, M., Kawabata, T., and Nishibori, M. 2005. Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama* **59**(1): 1-9.
- Kempkes, B., Spitzkovsky, D., Jansen-Durr, P., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Delecluse, H.J., Rottenberger, C., Bornkamm, G.W., and Hammerschmidt, W. 1995. B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J* **14**(1): 88-96.
- Kepp, O., Rajalingam, K., Kimmig, S., and Rudel, T. 2007. Bak and Bax are non-redundant during infection- and DNA damage-induced apoptosis. *Embo J* **26**(3): 825-834.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.
- Khayat, D., Avril, M.F., Gerard, B., Bertrand, P., Bizzari, J.P., and Cour, V. 1992. Fotemustine: an overview of its clinical activity in disseminated malignant melanoma. *Melanoma Res* **2**(3): 147-151.
- Kisby, G.E., Lesselroth, H., Olivas, A., Samson, L., Gold, B., Tanaka, K., and Turker, M.S. 2004. Role of nucleotide- and base-excision repair in genotoxin-induced neuronal cell death. *DNA Repair (Amst)* **3**(6): 617-627.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., and Ahnstrom, G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* **363**(2): 89-96.
- Koivisto, P., Robins, P., Lindahl, T., and Sedgwick, B. 2004. Demethylation of 3-methylthymine in DNA by bacterial and human DNA dioxygenases. *J Biol Chem* **279**(39): 40470-40474.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and Reed, J.C. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* **53**(19): 4701-4714.
- Kuraoka, I., Kobertz, W.R., Ariza, R.R., Biggerstaff, M., Essigmann, J.M., and Wood, R.D. 2000. Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease. *J Biol Chem* **275**(34): 26632-26636.
- Kurz, E.U., Douglas, P., and Lees-Miller, S.P. 2004. Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **279**(51): 53272-53281.
- Kurz, E.U. and Lees-Miller, S.P. 2004. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 889-900.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., and Lazebnik, Y. 2002. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* **297**(5585): 1352-1354.
- Lavin, M.F. and Gueven, N. 2006. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* **13**(6): 941-950.
- Lawley, P.D. and Phillips, D.H. 1996. DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res* **355**(1-2): 13-40.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., and Earnshaw, W.C. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**(6495): 346-347.
- Leber, R., Wise, T.W., Mizuta, R., and Meek, K. 1998. The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **273**(3): 1794-1801.
- Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R.A., Lifke, A., Ferel, D., Wolfel, C., Huber, C., and Wolfel, T. 2005. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 16013-16018.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* **6**(5): 443-450.

Literatur

- Leyvraz, S., Spataro, V., Bauer, J., Pampallona, S., Salmon, R., Dorval, T., Meuli, R., Gillet, M., Lejeune, F., and Zografos, L. 1997. Treatment of ocular melanoma metastatic to the liver by hepatic arterial chemotherapy. *J Clin Oncol* **15**(7): 2589-2595.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**(4): 479-489.
- Li, X. and Heyer, W.D. 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**(1): 99-113.
- Liao, H., Winkfein, R.J., Mack, G., Rattner, J.B., and Yen, T.J. 1995. CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol* **130**(3): 507-518.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. 2001. Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* **15**(14): 1833-1844.
- Lindahl, T. 1976. New class of enzymes acting on damaged DNA. *Nature* **259**(5538): 64-66.
- Liston, P., Fong, W.G., Kelly, N.L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C.G., McBurney, M.W., and Korneluk, R.G. 2001. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* **3**(2): 128-133.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**(1): 147-157.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**(2): 175-184.
- Ljungman, M., Zhang, F., Chen, F., Rainbow, A.J., and McKay, B.C. 1999. Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene* **18**(3): 583-592.
- Longley, M.J., Pierce, A.J., and Modrich, P. 1997. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem* **272**(16): 10917-10921.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Lubbe, J., Reichel, M., Burg, G., and Kleihues, P. 1994. Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* **102**(5): 819-821.
- Ludlum, D.B. 1990. DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal. *Mutat Res* **233**(1-2): 117-126.
- Lundberg, A.S. and Weinberg, R.A. 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**(2): 753-761.
- Magana-Schwencke, N., Henriques, J.A., Chanet, R., and Moustacchi, E. 1982. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(6): 1722-1726.
- Mantovani, F., Piazza, S., Gostissa, M., Strano, S., Zacchi, P., Mantovani, R., Blandino, G., and Del Sal, G. 2004. Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol Cell* **14**(5): 625-636.
- Margison, G.P., Povey, A.C., Kaina, B., and Santibanez Koref, M.F. 2003. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* **24**(4): 625-635.
- Mari, P.O., Florea, B.I., Persengiev, S.P., Verkaik, N.S., Bruggenwirth, H.T., Modesti, M., Giglia-Mari, G., Bezstarosti, K., Demmers, J.A., Luider, T.M., Houtsmuller, A.B., and van Gent, D.C. 2006. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(49): 18597-18602.
- Martin, S.J. and Green, D.R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* **82**(3): 349-352.
- Marusawa, H., Matsuzawa, S., Welsh, K., Zou, H., Armstrong, R., Tamm, I., and Reed, J.C. 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *Embo J* **22**(11): 2729-2740.
- Maser, R.S., Monsen, K.J., Nelms, B.E., and Petrini, J.H. 1997. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **17**(10): 6087-6096.
- Matsumura, Y. and Ananthaswamy, H.N. 2002. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci* **7**: d765-783.
- Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S.J. 1998. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**(5395): 1893-1897.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M.B., Katzir, E., and Oren, M. 2001. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* **15**(9): 1067-1077.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* **16**(10): 2794-2804.

Literatur

- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W.X., Corazzari, M., Knight, R.A., Green, D.R., Thompson, C., and Vousden, K.H. 2004. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* **279**(9): 8076-8083.
- Mhaidat, N.M., Zhang, X.D., Allen, J., Avery-Kiejda, K.A., Scott, R.J., and Hersey, P. 2007. Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. *Br J Cancer* **97**(9): 1225-1233.
- Middleton, M.R., Grob, J.J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., Gore, M., Aamdal, S., Cebon, J., Coates, A., Dreno, B., Henz, M., Schadendorf, D., Kapp, A., Weiss, J., Fraass, U., Statkevich, P., Muller, M., and Thatcher, N. 2000. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* **18**(1): 158-166.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**(3): 577-590.
- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., and Thompson, C.B. 1997. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**(6614): 353-357.
- Mittnacht, S. 1998. Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev* **8**(1): 21-27.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**(2): 293-299.
- Mogi, S. and Oh, D.H. 2006. gamma-H2AX formation in response to interstrand crosslinks requires XPF in human cells. *DNA Repair (Amst)* **5**(6): 731-740.
- Mornex, F., Thomas, L., Mohr, P., Hauschild, A., Delaunay, M.M., Lesimple, T., Tilgen, W., Bui, B.N., Guillot, B., Ulrich, J., Bourdin, S., Mousseau, M., Cupissol, D., Bonnetterre, M.E., De Gislain, C., Bensadoun, R.J., and Clavel, M. 2003. A prospective randomized multicentre phase III trial of fotemustine plus whole brain irradiation versus fotemustine alone in cerebral metastases of malignant melanoma. *Melanoma Res* **13**(1): 97-103.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzarini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H., and Helin, K. 2001. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* **3**(6): 552-558.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer, P.H. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* **188**(11): 2033-2045.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Murphy, K.M., Streips, U.N., and Lock, R.B. 2000. Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* **275**(23): 17225-17228.
- Murphy, M.E., Leu, J.I., and George, D.L. 2004. p53 moves to mitochondria: a turn on the path to apoptosis. *Cell Cycle* **3**(7): 836-839.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P., and Bourdon, J.C. 2006. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* **13**(6): 962-972.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**(6): 817-827.
- Muzio, M., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. 1997. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* **272**(5): 2952-2956.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**(5): 2926-2930.
- Nakano, K. and Vousden, K.H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3): 683-694.
- Nakatsuru, Y., Matsukuma, S., Nemoto, N., Sugano, H., Sekiguchi, M., and Ishikawa, T. 1993. O6-methylguanine-DNA methyltransferase protects against nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14): 6468-6472.
- Nelms, B.E., Maser, R.S., MacKay, J.F., Lagally, M.G., and Petrini, J.H. 1998. In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* **280**(5363): 590-592.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C. 1998. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* **391**(6665): 407-410.
- Newlands, E.S., Stevens, M.F., Wedge, S.R., Wheelhouse, R.T., and Brock, C. 1997. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* **23**(1): 35-61.
- Ng, K.C., Campos, E.I., Martinka, M., and Li, G. 2004. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma. *J Invest Dermatol* **123**(6): 1127-1134.

Literatur

- Nguyen, M., Branton, P.E., Walton, P.A., Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. 1994. Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J Biol Chem* **269**(24): 16521-16524.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., and et al. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**(6535): 37-43.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., and Riccardi, C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**(2): 271-279.
- Niculescu, A.B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S.I. 1998. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* **18**(1): 629-643.
- Niedernhofer, L.J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A.F., de Wit, J., Jaspers, N.G., Beverloo, H.B., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. 2004. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **24**(13): 5776-5787.
- Niida, H., Katsuno, Y., Banerjee, B., Hande, M.P., and Nakanishi, M. 2007. Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol* **27**(7): 2572-2581.
- Niida, H. and Nakanishi, M. 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**(1): 3-9.
- Nomura, M., Shimizu, S., Ito, T., Narita, M., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. 1999. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res* **59**(21): 5542-5548.
- Nur, E.K.A., Li, T.K., Zhang, A., Qi, H., Hars, E.S., and Liu, L.F. 2003. Single-stranded DNA induces ataxia telangiectasia mutant (ATM)/p53-dependent DNA damage and apoptotic signals. *J Biol Chem* **278**(14): 12475-12481.
- O'Rourke, M.G., Johnson, M., Lanagan, C., See, J., Yang, J., Bell, J.R., Slater, G.J., Kerr, B.M., Crowe, B., Purdie, D.M., Elliott, S.L., Ellem, K.A., and Schmidt, C.W. 2003. Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* **52**(6): 387-395.
- Ochs, K. and Kaina, B. 2000. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* **60**(20): 5815-5824.
- Ogryzko, V.V., Wong, P., and Howard, B.H. 1997. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* **17**(8): 4877-4882.
- Olive, P.L., Wlodek, D., and Banath, J.P. 1991. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res* **51**(17): 4671-4676.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**(4): 609-619.
- Ostermann, S., Csajka, C., Buclin, T., Leyvraz, S., Lejeune, F., Decosterd, L.A., and Stupp, R. 2004. Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res* **10**(11): 3728-3736.
- Ozaki, T. and Nakagawara, A. 2005. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci* **96**(11): 729-737.
- Pabla, N., Huang, S., Mi, Q.S., Daniel, R., and Dong, Z. 2008. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* **283**(10): 6572-6583.
- Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G.W., Polack, A., and Eick, D. 2000. Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* **87**(6): 787-793.
- Palombo, F., Gallinari, P., Iaccarino, I., Lettieri, T., Hughes, M., D'Arrigo, A., Truong, O., Hsuan, J.J., and Jiricny, J. 1995. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* **268**(5219): 1912-1914.
- Papp, T., Jafari, M., and Schiffmann, D. 1996. Lack of p53 mutations and loss of heterozygosity in non-cultured human melanocytic lesions. *J Cancer Res Clin Oncol* **122**(9): 541-548.
- Pardee, A.B., Li, C.J., and Reddy, G.P. 2004. Regulation in S phase by E2F. *Cell Cycle* **3**(9): 1091-1094.
- Park, M.S., Ludwig, D.L., Stigger, E., and Lee, S.H. 1996. Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J Biol Chem* **271**(31): 18996-19000.
- Passagne, I., Evrard, A., Winum, J.Y., Depeille, P., Cuq, P., Montero, J.L., Cupissol, D., and Vian, L. 2003. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by new fotemustine analogs on human melanoma cells in relation to O6-methylguanine DNA-methyltransferase expression. *J Pharmacol Exp Ther* **307**(2): 816-823.

Literatur

- Pegg, A.E., Boosalis, M., Samson, L., Moschel, R.C., Byers, T.L., Swenn, K., and Dolan, M.E. 1993. Mechanism of inactivation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase by O6-benzylguanine. *Biochemistry* **32**(45): 11998-12006.
- Pegg, A.E., Dolan, M.E., and Moschel, R.C. 1995. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **51**: 167-223.
- Pepponi, R., Marra, G., Fuggetta, M.P., Falcinelli, S., Pagani, E., Bonmassar, E., Jiricny, J., and D'Atri, S. 2003. The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther* **304**(2): 661-668.
- Pichierri, P. and Rosselli, F. 2004. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *Embo J* **23**(5): 1178-1187.
- Piras, F., Murtas, D., Minerba, L., Ugalde, J., Floris, C., Maxia, C., Colombari, R., Perra, M.T., and Sirigu, P. 2007. Nuclear survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Histopathology* **50**(7): 835-842.
- Podlutzky, A.J., Dianova, II, Wilson, S.H., Bohr, V.A., and Dianov, G.L. 2001. DNA synthesis and dRPase activities of polymerase beta are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry* **40**(3): 809-813.
- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., and Salvesen, G.S. 2006. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* **22**(2): 269-275.
- Preuss, I., Eberhagen, I., Haas, S., Eibl, R.H., Kaufmann, M., von Minckwitz, G., and Kaina, B. 1995. O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in breast and brain tumors. *Int J Cancer* **61**(3): 321-326.
- Preuss, I., Haas, S., Eichhorn, U., Eberhagen, I., Kaufmann, M., Beck, T., Eibl, R.H., Dall, P., Bauknecht, T., Hengstler, J., Wittig, B.M., Dippold, W., and Kaina, B. 1996. Activity of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. *Cancer Detect Prev* **20**(2): 130-136.
- Ramadan, S., Terrinoni, A., Catani, M.V., Sayan, A.E., Knight, R.A., Mueller, M., Krammer, P.H., Melino, G., and Candi, E. 2005. p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3): 713-717.
- Rao, R.V., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* **11**(4): 372-380.
- Rattray, A.J. and Symington, L.S. 1994. Use of a chromosomal inverted repeat to demonstrate that the RAD51 and RAD52 genes of *Saccharomyces cerevisiae* have different roles in mitotic recombination. *Genetics* **138**(3): 587-595.
- Reid, J.M., Kuffel, M.J., Miller, J.K., Rios, R., and Ames, M.M. 1999. Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. *Clin Cancer Res* **5**(8): 2192-2197.
- Robertson, J.D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. 2002. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**(33): 29803-29809.
- Robertson, J.D., Gogvadze, V., Kropotov, A., Vakifahmetoglu, H., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. 2004. Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep* **5**(6): 643-648.
- Robles, A.I., Bemmels, N.A., Foraker, A.B., and Harris, C.C. 2001. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* **61**(18): 6660-6664.
- Roos, W., Baumgartner, M., and Kaina, B. 2004. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* **23**(2): 359-367.
- Roos, W.P., Batista, L.F., Naumann, S.C., Wick, W., Weller, M., Menck, C.F., and Kaina, B. 2007. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* **26**(2): 186-197.
- Roos, W.P. and Kaina, B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**(9): 440-450.
- Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Naumann, S.C., Kiedron, O., Zdzienicka, M.Z., and Kaina, B. 2008. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst)*.
- Ruiter, D., Bogenrieder, T., Elder, D., and Herlyn, M. 2002. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* **3**(1): 35-43.
- Sah, N.K., Khan, Z., Khan, G.J., and Bisen, P.S. 2006. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* **244**(2): 164-171.

Literatur

- Saito, S., Goodarzi, A.A., Higashimoto, Y., Noda, Y., Lees-Miller, S.P., Appella, E., and Anderson, C.W. 2002. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* **277**(15): 12491-12494.
- Sarkar, S., Davies, A.A., Ulrich, H.D., and McHugh, P.J. 2006. DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta. *Embo J* **25**(6): 1285-1294.
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M., and Reed, J.C. 1997. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5113-5118.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., and Bonner, W.M. 2002. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* **158**(4): 486-492.
- Sedgwick, B. 2004. Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(2): 148-157.
- Shen, X., Jun, S., O'Neal, L.E., Sonoda, E., Bemark, M., Sale, J.E., and Li, L. 2006. REV3 and REV1 play major roles in recombination-independent repair of DNA interstrand cross-links mediated by monoubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J Biol Chem* **281**(20): 13869-13872.
- Shen, Z., Cloud, K.G., Chen, D.J., and Park, M.S. 1996. Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *J Biol Chem* **271**(1): 148-152.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. 2000. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* **14**(3): 289-300.
- Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y., and Okamoto, K. 2003. Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene* **22**(55): 8870-8880.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18**(1): 134-147.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**(1): 184-191.
- Sionov, R.V. and Haupt, Y. 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**(45): 6145-6157.
- Skalka, M., Matyasova, J., and Cejkova, M. 1976. Dna in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS Lett* **72**(2): 271-274.
- Sobol, R.W., Horton, J.K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewsky, K., and Wilson, S.H. 1996. Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature* **379**(6561): 183-186.
- Soengas, M.S., Capodieci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**(6817): 207-211.
- Soengas, M.S., Gerald, W.L., Cordon-Cardo, C., Lazebnik, Y., and Lowe, S.W. 2006. Apaf-1 expression in malignant melanoma. *Cell Death Differ* **13**(2): 352-353.
- Soengas, M.S. and Lowe, S.W. 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**(20): 3138-3151.
- Soond, S.M., Carroll, C., Townsend, P.A., Sayan, E., Melino, G., Behrmann, I., Knight, R.A., Latchman, D.S., and Stephanou, A. 2007. STAT1 regulates p73-mediated Bax gene expression. *FEBS Lett* **581**(6): 1217-1226.
- Southern, P.J. and Berg, P. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* **1**(4): 327-341.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* **1**(7): 949-957.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E.S. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14486-14491.
- Srivenugopal, K.S., Yuan, X.H., Friedman, H.S., and Ali-Osman, F. 1996. 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* **35**(4): 1328-1334.
- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. 2003. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **5**(5): 401-409.
- Stiewe, T., Zimmermann, S., Frilling, A., Esche, H., and Putzer, B.M. 2002. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res* **62**(13): 3598-3602.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Loblrich, M., and Jeggo, P.A. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* **64**(7): 2390-2396.

Literatur

- Takai, H., Naka, K., Okada, Y., Watanabe, M., Harada, N., Saito, S., Anderson, C.W., Appella, E., Nakanishi, M., Suzuki, H., Nagashima, K., Sawa, H., Ikeda, K., and Motoyama, N. 2002. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *Embo J* **21**(19): 5195-5205.
- Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R.S., and Mitra, S. 1990. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2): 686-690.
- Tapiero, H., Yin, M.B., Catalin, J., Paraire, M., Deloffre, P., Rustum, Y., Bizzari, J.P., and Tew, K.D. 1989. Cytotoxicity and DNA damaging effects of a new nitrosourea, fotemustine, diethyl- 1-(3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido) ethylphosphonate-S10036. *Anticancer Res* **9**(6): 1617-1622.
- Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**(5203): 1456-1462.
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R.T. 1999. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* **13**(2): 152-157.
- Tomicic, M.T. and Kaina, B. 2001. Hamster Bcl-2 protein is cleaved in vitro and in cells by caspase-9 and caspase-3. *Biochem Biophys Res Commun* **281**(2): 404-408.
- Tomimatsu, N., Tahimic, C.G., Otsuki, A., Burma, S., Fukuhara, A., Sato, K., Shiota, G., Oshimura, M., Chen, D.J., and Kurimasa, A. 2007. Ku70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **282**(14): 10138-10145.
- Tong, W.P., Kirk, M.C., and Ludlum, D.B. 1982. Formation of the cross-link 1-[N3-deoxycytidyl],2-[N1-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res* **42**(8): 3102-3105.
- Toorchen, D. and Topal, M.D. 1983. Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: effects on DNA replication of methylation at the O6-guanine position of dGTP. *Carcinogenesis* **4**(12): 1591-1597.
- Tsai, K.K. and Yuan, Z.M. 2003. c-Abl stabilizes p73 by a phosphorylation-augmented interaction. *Cancer Res* **63**(12): 3418-3424.
- Tsuzuki, T., Sakumi, K., Shiraishi, A., Kawate, H., Igarashi, H., Iwakuma, T., Tominaga, Y., Zhang, S., Shimizu, S., Ishikawa, T., and et al. 1996. Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis* **17**(6): 1215-1220.
- Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V., and Prives, C. 2004. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev* **18**(24): 3041-3054.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. 2003. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J* **22**(20): 5612-5621.
- Van Dyck, E., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. 1999. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* **401**(6751): 403.
- Vassal, G., Boland, I., Terrier-Lacombe, M.J., Watson, A.J., Margison, G.P., Venuat, A.M., Morizet, J., Parker, F., Lacroix, C., Lellouch-Tubiana, A., Pierre-Kahn, A., Poullain, M.G., and Gouyette, A. 1998. Activity of fotemustine in medulloblastoma and malignant glioma xenografts in relation to O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and alkylpurine-DNA N-glycosylase activity. *Clin Cancer Res* **4**(2): 463-468.
- Vaux, D.L. and Strasser, A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6): 2239-2244.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**(1): 39-51.
- Vousden, K.H. and Lu, X. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**(8): 594-604.
- Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**(6847): 607-614.
- Wang, H., Lawrence, C.W., Li, G.M., and Hays, J.B. 1999. Specific binding of human MSH2.MSH6 mismatch-repair protein heterodimers to DNA incorporating thymine- or uracil-containing UV light photoproducts opposite mismatched bases. *J Biol Chem* **274**(24): 16894-16900.
- Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**(22): 2922-2933.
- Ward, I.M. and Chen, J. 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**(51): 47759-47762.
- Warren, J.J., Forsberg, L.J., and Beese, L.S. 2006. The structural basis for the mutagenicity of O(6)-methylguanine lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(52): 19701-19706.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**(5517): 727-730.

Literatur

- Wiecker, T.S., Luther, H., Buettner, P., Bauer, J., and Garbe, C. 2003. 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* **97**(3): 628-638.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* **19**(11): 1294-1305.
- Wilson, D.M., 3rd and Barsky, D. 2001. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res* **485**(4): 283-307.
- Wolfel, T., Klehmann, E., Muller, C., Schutt, K.H., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Knuth, A. 1989. Lysis of human melanoma cells by autologous cytolytic T cell clones. Identification of human histocompatibility leukocyte antigen A2 as a restriction element for three different antigens. *J Exp Med* **170**(3): 797-810.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**(5): 1281-1292.
- Wu, X. and Deng, Y. 2002. Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci* **7**: d151-156.
- Wu, Y., Mehew, J.W., Heckman, C.A., Arcinas, M., and Boxer, L.M. 2001. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* **20**(2): 240-251.
- Wulf, G.M., Liou, Y.C., Ryo, A., Lee, S.W., and Lu, K.P. 2002. Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J Biol Chem* **277**(50): 47976-47979.
- Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**(5756): 555-556.
- Xu-Welliver, M. and Pegg, A.E. 2002. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* **23**(5): 823-830.
- Xu, G.W., Mymryk, J.S., and Cairncross, J.G. 2005a. Inactivation of p53 sensitizes astrocytic glioma cells to BCNU and temozolomide, but not cisplatin. *J Neurooncol* **74**(2): 141-149.
- . 2005b. Pharmaceutical-mediated inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to BCNU and temozolomide. *Int J Cancer* **116**(2): 187-192.
- Xu, G.W., Nutt, C.L., Zlatescu, M.C., Keeney, M., Chin-Yee, I., and Cairncross, J.G. 2001. Inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* **61**(10): 4155-4159.
- Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R., and Karran, P. 1997. Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res* **25**(3): 491-496.
- Yamaguchi, H. and Wang, H.G. 2001. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* **20**(53): 7779-7786.
- Yan, L., Donze, J.R., and Liu, L. 2005. Inactivated MGMT by O6-benzylguanine is associated with prolonged G2/M arrest in cancer cells treated with BCNU. *Oncogene* **24**(13): 2175-2183.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**(2): 285-291.
- Yang, S., Kuo, C., Bisi, J.E., and Kim, M.K. 2002. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol* **4**(11): 865-870.
- Yarosh, D.B., Foote, R.S., Mitra, S., and Day, R.S., 3rd. 1983. Repair of O6-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer- human tumor cell strains. *Carcinogenesis* **4**(2): 199-205.
- Yoshioka, K., Yoshioka, Y., and Hsieh, P. 2006. ATR kinase activation mediated by MutSalph α and MutL α in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell* **22**(4): 501-510.
- Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C., and Moll, U.M. 2001. Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem* **276**(14): 11310-11316.
- Zaika, A.I., Slade, N., Erster, S.H., Sansome, C., Joseph, T.W., Pearl, M., Chalas, E., and Moll, U.M. 2002. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* **196**(6): 765-780.
- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* **183**(4): 1533-1544.
- Zerp, S.F., van Elsas, A., Peltenburg, L.T., and Schrier, P.I. 1999. p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *Br J Cancer* **79**(5-6): 921-926.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**(4): 619-628.
- Zhai, S., Yaar, M., Doyle, S.M., and Gilchrist, B.A. 1996. Nerve growth factor rescues pigment cells from ultraviolet-induced apoptosis by upregulating BCL-2 levels. *Exp Cell Res* **224**(2): 335-343.

Literatur

- Zhang, Y.W., Otterness, D.M., Chiang, G.G., Xie, W., Liu, Y.C., Mercurio, F., and Abraham, R.T. 2005. Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell* **19**(5): 607-618.
- Zhao, H. and Piwnica-Worms, H. 2001. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**(13): 4129-4139.
- Zhao, H., Watkins, J.L., and Piwnica-Worms, H. 2002. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14795-14800.
- Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H., and Levine, A.J. 2000. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* **14**(8): 981-993.
- Zheng, H., Wang, X., Warren, A.J., Legerski, R.J., Nairn, R.S., Hamilton, J.W., and Li, L. 2003. Nucleotide excision repair- and polymerase eta-mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links. *Mol Cell Biol* **23**(2): 754-761.
- Zhou, Z.Q., Manguino, D., Kewitt, K., Intano, G.W., McMahan, C.A., Herbert, D.C., Hanes, M., Reddick, R., Ikeno, Y., and Walter, C.A. 2001. Spontaneous hepatocellular carcinoma is reduced in transgenic mice overexpressing human O6- methylguanine-DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12566-12571.
- Zolzer, F., Hillebrandt, S., and Streffer, C. 1995. Radiation induced G1-block and p53 status in six human cell lines. *Radiother Oncol* **37**(1): 20-28.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABH2	“alkylation repair homolog 2”
ABH3	“alkylation repair homolog 3”
<i>A.bidest</i>	<i>aqua bidestillata</i> (zweifach destilliertes Wasser)
abs.	absolut
ACNU	1-(4-Amino-2-Methyl-5-Pyrimidinyl)Methyl-3-(2-Chlorethyl)-3-Nitrosoharnstoff (Nimustin)
ACV	Aciclovir
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AIF	“apoptosis-inducing factor”
Akt	“v-akt murine thymoma viral oncogene homolog”
Apaf-1	“apoptotic protease-activating factor 1”
APE	AP-Endonuklease
APNG	Alkylpurin-DNA N-Glycosylase
APS	Ammoniumpersulfat
AP-	aprimidine Stelle
ATM	“ataxia-telangiectasia mutated”
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATR	“ATM- und Rad3-related”
As	Aminosäure(n)
Bad	“Bcl2-antagonist of cell death”
Bak	“Bcl2-antagonist/killer”
Bax	“Bcl-2 associated protein X”
Bcl-2	“B cell lymphoma 2 / B cell leukemia 2”
Bcl-X _L (Bcl2L1)	“Bcl2-like 1”
BCNU	1-(2-Chlorethyl)-L-Nitrosoharnstoff (Carmustin)
BER	“base excision repair” (Basenexzisionsreparatur)
Bid	“BH3 interacting domain death agonist”
tBid	“truncated Bid”
Bik	“Bcl2-interacting killer (apoptosis-inducing)”
Bim (Bcl2L11)	“Bcl2-like 11”
Bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BRCA1	“breast cancer 1, early onset”
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
BVDU	Brivudin
C	Cytosin
ca.	circa
c-Abl	“v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog”
Chk1	Checkpoint Kinase 1
Chk2	Checkpoint Kinase 2
Ci	Curie
Cyt C	Cytochrom C
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
CAD	„caspase-activated DNase“
CARD	„caspase recruitment domain”
Caspase	„cysteine-aspartic acid proteases“
CCNU	N-(2-Chlorethyl)-N'-Zykohehexyl-N-Nitrosoharnstoff (Lomustin)
CENU	N-chlorethyl-N-nitrosourea (N-Chlorethyl-N-Nitrosoharnstoff)
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DISC	“death-inducing signaling complex“
DMSO	Dimethylsulfoxid

Anhang

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
$\Delta Np73$	N-terminal verkürzte Form ohne Transaktivierungsdomäne des p73
DTIC	Dimethyl-trizeno-imidazol-Carboxamid (Dacarbazin)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DSB(s)	DNA-Doppelstrangbru(ü)ch(e)
DTT	Dithiothreitol
ECL	“enhanced chemoluminescence”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	“electrophoretic mobility shift assay” (Gelretardationsexperiment)
ENU	<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -nitrosoarea (<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -Nitrosoharnstoff)
ERCC1	“excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1”
Erk2	“extracellular signal receptor regulated kinase 2”
f	femto
FACS	“fluorescence activated cell sorter”
FADD	“Fas-associated death domain”
FasL	Fas-(CD95-) Lignad
Fas-R	Fas-(CD95-) Rezeptor
Fen1	“flap structure-specific endonuclease 1”
FCS	„fetal calve serum“ (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein
FM	Diethyl (1-{(2-chloroethyl)(nitroso)carbamoyl}amino)ethyl)phosphonate (Fotemustin)
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCV	Ganciclovir
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
Gy	Gray
h	Stunde(n) oder human
HAP	humane apurine/apyrimidine Endonuklease
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N</i> -2-Ethansulfonsäure
HNPCC	hereditary nonpolyposis colon cancer
HBXIP	“hepatitis B virus x interacting protein”
HR	homologe Rekombination
HRP	“horseradish peroxidase” (Meeretich Peroxidase)
H2AX	“H2A histone family, member X”
γ H2AX	gamma H2AX
IAP	“inhibitor of apoptosis proteins“
ICL(s)	DNA-Interstrand Crosslink(s)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN- α	Interferon- α
IgG	Immunoglobulin G
IL-2	Interleukin-2
IPTG	Isopropylthiogalactosid
I S	Ionisierende Strahlung
J	Joule
k	kilo
K	Kontrolle
kBp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
Ku70 (XRCC6)	“X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6”
Ku80 (XRCC5)	“X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5”
L	Liter
LMP-Agarose	“low melting point Agarose” (Agarose mit niederem Schmelzpunkt)

Anhang

mA	Miliamper
mAb	monoklonaler Antikörper
Mcl-1	“myeloid cell leukemia sequence 1 (Bcl2-related)”
ml	Mililiter
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
m	milli
M	molar
Mdm2	„transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein”
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MLH1	“mutL homolog 1”
MMR	Mismatch-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MOMP	“mitochondrial outer membrane permeabilisation“
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glycosydase
Mre11	“meiotic recombination 11 homolog”
MSH2	„mutS homolog 2“
MSH6	„mutS homolog 6“
MTIC	5-(3-methyltriazin-1-yl)imidazole-4-carboxamide
mRNA	„messenger RNA“
n	nano
Nbs1	„Nijmegen breakage syndrome 1“
NER	„nucleotide excision repair“ (Nukleotidexzisionsreparatur)
NHEJ	„nonhomologous end-joining“
Noxa	Latein für Schaden (Bcl2-related)
O ⁴ MeT	O ⁴ -Methylthymidin
O ⁶ BG	O ⁶ -Benzylguanin
O ⁶ ClEtG	O ⁶ -Chlorethylguanin
O ⁶ MeG	O ⁶ -Methylguanin
PAA	Polyacrylamid (38%) / Bispolyacrylamid (2%)
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	“proliferating cell nuclear antigen“
PCV	Penciclovir
PCZ	N-Isopropyl-4-(2-methylhydrazin omethyl)benzamid (Procarbazin)
PI	Propidium Jodid
Pin1	„protein (peptidylprolyl <i>cis/trans</i> isomerase) NIMA-interacting 1”
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinasen
PMS2	“postmeiotic segregation increased 2”
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	T4-Polynukleotid-Kinase
Pol	DNA-Polymerase
PP2A	Protein-Phosphatase 2 α
p14ARF (CDKN2A)	“cyclin-dependent kinase inhibitor 2A”
Puma	“p53 up-regulated modulator of apoptosis”
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Rad50	“DNA repair protein Rad50 homolog”
Rad51	“DNA repair protein Rad51 homolog”
Rad52	“DNA repair protein Rad52 homolog”
Rb-Protein	“retinoblastoma protein”
RF-C	“replication factor C”
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RPA	“replication protein A, 32 kDa”
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin
SCE	Schwesterchromatidenaustausch

Anhang

SCGE	Einzelzellgelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
siRNA	“small interfering RNA”
Smac/DIABLO	“second mitochondria-derived activator of caspase”
STZ	2-Desoxy-2-(3-methyl-3-nitroso-ureido)-D-glucopyranose (Streptozotocin)
Survivin (BIRC5)	“baculoviral IAP repeat-containing 5”
T	Thymin
TAp73	p73 mit N-terminaler Transaktivierungsdomäne
TCA	Trichloressigsäure
TS	Thymidylatsynthetase
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tim44	“translocase of inner mitochondrial membrane 44”
TMZ	4-methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-triene-9- carboxamide (Temozolomid)
TNF	“tumor necrosis factor”
TRAIL	“TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor”
Tris	Tris - (Hydroxymethyl)-Aminoethan
U	Units (Einheiten)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
Vol	Volumen
z.B.	zum Beispiel
XAF1	“XIAP-associated factor 1”
XIAP	“X-linked IAP”
XPF (ERCC4)	“excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4”
XRCC1	“X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1”
°C	Grad Celcius
5'dRP	5'-Deoxyribose-5-Phosphat

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1-1** Mechanismen der DSB-Reparatur: homologe Rekombination (A) und „nonhomologous end-joining“ (NHEJ) (B) aus (Christmann et al. 2003)
- Abb. 1-2** Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Apoptose
- Abb. 1-3** Mechanismus der Rezeptor-unabhängigen, mitochondrial vermittelten Apoptose
- Abb. 1-4** Repressiver Einfluss der IAPs Survivin und XIAP
- Abb. 1-5** p53-abhängige (A) und p53-unabhängige (B) Vermittlung von Apoptose nach DSBs
- Abb. 1-6** Splicevarianten des p73-Gens aus (Stiewe et al. 2002) (A) und repressiver Einfluss von Δ Np73 auf p53 und TAp73 (B)
- Abb. 3-1** Zytotoxizität nach Fotemustin- oder Temozolomidbehandlung in fünf Melanom-Zelllinien
- Abb. 3-2** Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz nach Fotemustinbehandlung
- Abb. 3-3** Bestimmung der Apoptose- / Nekrose-Frequenz nach Temozolomidbehandlung
- Abb. 3-4** Untersuchung der Caspasenaktivierung und PARP-1 Spaltung nach Fotemustinexposition
- Abb. 3-5** Untersuchung der Caspasenaktivierung und PARP-1 Spaltung nach Temozolomidexposition
- Abb. 3-6** MGMT-Aktivitätsbestimmung
- Abb. 3-7** Einfluss von MGMT auf die Apoptoserate
- Abb. 3-8** Resistenzerwerb gegen Fotemustin und Temozolomid durch Transfektion des MGMT-Gens
- Abb. 3-9** γ H2AX-Induktion im Verhältnis zur Apoptoserate nach Fotemustinexposition
- Abb. 3-10** γ H2AX-Induktion im Verhältnis zur Apoptoserate nach Temozolomidexposition
- Abb. 3-11** Untersuchung des p53-Status in vier Melanomzelllinien
- Abb. 3-12** Untersuchung der p53-Aktivierung in den Melanomzelllinien D05 und D14
- Abb. 3-13** Nachweis p53-abhängiger Transkription in den Melanomzelllinien D05 und D14
- Abb. 3-14** Einfluss von p53 auf die apoptotische Antwort
- Abb. 3-15** Untersuchung der Zytotoxizität in MZ7-Zellen nach Fotemustin- und Temozolomidexposition
- Abb. 3-16** γ H2AX-Bildung und ATM-Aktivierung in MZ7-Zellen nach Fotemustin- und Temozolomidexposition
- Abb. 3-17** Basale Expression der Proteinen MSH2 und MSH6
- Abb. 3-18** Bindungseigenschaften des Mut α -Komplex an GT-Fehlpaarungen in sieben Melanomze
- Abb. 3-19** Zellwachstum nach Fotemustin- und Temozolomidexposition
- Abb. 3-20** Zellzyklusverteilung nach Alkylantienbehandlung
- Abb. 3-21** Exemplarische Abbildung von DAPI gefärbten Zellkernen nach Alkylantienbehandlung
- Abb. 3-22** Untersuchung der Proliferation nach Fotemustin- und Temozolomidexposition
- Abb. 3-23** Proliferationsabhängigkeit der Apoptoseinduktion nach Fotemustin- und Temozolomidexposition in P493-6-Zellen
- Abb. 3-24** Proliferationsabhängigkeit der Caspase-7-Aktivierung nach Fotemustinexposition in D14-Melanomzellen
- Abb. 3-25** ICL-Bildung und ICL-Prozessierung in zwei Melanomzelllinien nach Fotemustinexposition

Anhang

Abb. 3-26	γ H2AX-Induktion in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien nach Fotemustinexposition
Abb. 3-27	γ H2AX-Focibildung in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien nach Fotemustinexposition
Abb. 3-28	Untersuchung der γ H2AX-Focianzahl pro Zelle in unterschiedlich sensitiven Melanomzelllinien nach Fotemustinexposition
Abb. 3-29	Einfluss des Caspaseinhibitors Boc-D-FMK auf Fotemustin induzierte Apoptose
Abb. 3-30	Aktivierung von Caspasen nach Fotemustinexposition
Abb. 3-31	Einfluss des Fas-Rezeptors und Aktivierung der Caspase-8 nach Fotemustinexposition
Abb. 3-32	Translokation von mitochondrialen Apoptosefaktoren und Aktivierung der Caspase-9 nach Fotemustinexposition
Abb. 3-33	Basale Expression der Proteine XIAP, Survivin und XAF1
Abb. 3-34	Expression der Proteine XIAP, Survivin und XAF1 nach Fotemustinexposition
Abb. 3-35	Einfluss von XIAP auf die apoptotische Antwort nach Fotemustin
Abb. 3-36	Aktivierung der Stresskinase ATM nach Fotemustinexposition
Abb. 3-37	Aktivierung der Checkpoint Kinase 1 nach Fotemustinexposition
Abb. 3-38	Aktivierung der Checkpoint Kinase 2 nach Fotemustinexposition
Abb. 3-39	Phosphorylierungsstudien am p53-Protein nach Fotemustinexposition
Abb. 3-40	Expression der Gene E2F-1 und Rb nach Fotemustinexposition
Abb. 3-41	Expression der Gene Apaf-1, TAp73 und Δ Np73 nach Fotemustinexposition
Abb. 3-42	Expression der Gene Bax, Noxa und Puma nach Fotemustinexposition
Abb. 3-43	Einfluss von E2F-1 auf die apoptotische Antwort nach Fotemustin
Abb. 4-1	Modell der ICL-Reparatur
Abb. 4-2	Wirkung des Alkylanz Temozolomid auf Melanomzellen
Abb. 4-3	Wirkung des Alkylanz Fotemustin auf Melanomzellen

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Stadieneinteilung des malignen Melanoms (Balch et al. 2001)
Tabelle 1-2:	Übersicht der durch alkylierende Agenzien angegriffenen Positionen in der DNA
Tabelle 1-3:	Mitglieder der Bcl-2 Familie
Tabelle 3-1:	Verdopplungszeit und Grundniveau an Zelltod in Kultur im untersuchten Zellsystem

7.4 Veröffentlichungen

Naumann, S.C., Roos, W.P. and Kaina, B. Characterization of apoptosis triggered by the anti-cancer drug fotemustine in malignant melanoma cells.
in Vorbereitung

Naumann, S.C., Roos, W.P., Christmann, M. and Kaina, B. Apoptosis induced by temozolomide and fotemustine in melanoma cells: role of MGMT, MMR and DSBs as determinants of sensitivity.
zur Publikation eingereicht

Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., **Naumann, S.C.**, Kiedron, O., Zdzienicka, M.Z. and Kaina, B. 2008. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, causes resistance to O⁶-methylguanine triggered Apoptosis, DSBs and aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst) im Druck*

Kaina, B., Christmann, M., **Naumann, S.** and Roos, W.P. 2007. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* **6**(8): 1079-1099.

Roos, W.P., Batista, L.F., **Naumann, S.C.**, Wick, W., Weller, M., Menck, C.F. and Kaina, B. 2007. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O⁶-methylguanine. *Oncogene* **26**, 186–197.

Eckerdt, F., Yuan, J., Saxena, K., Martin, B., Kappel, S., Lindenau, C., Kramer, A., **Naumann, S.**, Daum, S., Fischer, G., Dikic, I., Kaufmann, M. and Strebhardt, K. 2005. Polo-like Kinase 1-mediated Phosphorylation Stabilizes Pin1 by Inhibiting Its Ubiquitination in Human Cells. *J. Biol. Chem.*, **280** (44), 36575-36583

Pfenninger, M., **Naumann, S.**, Steinke, D. and Seidendorf, B. 2003. Taxonomic recognition approach by morphometric and molecular genetic methods of conchologically similar Helicellinae species (Helicoidea, Gastropoda). *Malakologische Abhandlungen Dresden* **21**,123–130; ISSN 0070-7260

Sonstiges:

Teilnahmen an einer Beta-Studie des Produkts NucleoSpin[®] RNA/Protein-Kit (Macherey-Nagel, #740933). Veröffentlichung eigener Daten in der Produktbeschreibung.
<http://www.mn-net.com/tabid/1467/default.aspx>

7.5 Kongressteilnahmen mit Posterpräsentation

- Naumann, S.,** Roos, W.P. and Kaina, B. 2006. Mechanism of apoptosis triggered by the anti-cancer drug fotemustine in human peripheral blood lymphocytes. *Archives of Pharmacology*, **372**, Nr. 418 [47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 2006, Mainz]
- Naumann, S.,** Roos, W.P., Christmann, M. and Kaina, B. 2006. Apoptosis in malignant melanoma cells induced by the anticancer drugs temozolomide and fotemustine: role of MGMT and DNA-mismatch repair. [9th Biennial Meeting of the DGDR (German Society for Research on DNA Repair), September 2006, Hamburg]
- Naumann, S.,** Roos, W.P., Christmann, M. and Kaina, B. 2006. Apoptosis in malignant melanoma cells induced by the anticancer drugs temozolomide and fotemustine: Role of MGMT and DNA-mismatch repair. [14th International AEK Cancer Congress, Februar, 2007, Frankfurt am Main]
- Naumann, S.C.,** Roos, W.P., Christmann, M. and Kaina, B. 2007. Role of E2F-1/p73 apoptotic signalling in fotemustine treated malignant melanoma cells. *Archives of Pharmacology*, **375**, Nr. 401 [48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 2007, Mainz]
- Naumann, S.,** Roos, W.P., Christmann, M. and Kaina, B. 2007. Mechanism of cell death induced by temozolomide and fotemustine in malignant melanoma. [2th International Conference on MGMT, Juni 2007, Mainz]
- Naumann, S.C.,** Roos, W.P., Christmann, M. and Kaina, B. 2008. Death and repair induced by the anticancer drugs temozolomide and fotemustine in malignant melanoma cells. *Archives of Pharmacology*, **377**, Nr. 391 [49. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 2008, Mainz]
- Naumann, S.C.,** Roos, W.P., Christmann, M. and Kaina, B. 2008. Death and repair induced by the anticancer drugs temozolomide and fotemustine in malignant melanoma cells. [5th DNA Repair Workshop, May 2008, Smolenice, Slowakei]

7.6 Lebenslauf

Name: Steffen Naumann

Geburtsort: Frankfurt am Main