

**Mechanismen der Resistenz
und Sensitivierung von menschlichen
malignen Melanomzellen gegenüber
DNA-alkylierenden Zytostatika**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Christina Barckhausen,
geb. in Frankenberg (Eder)

Mainz, 2012

In einem Zeitalter, wo man Früchte oft vor der Blüte erwartet und vieles darum zu verachten scheint, weil es nicht unmittelbar Wunden heilt, den Acker düngt, oder Mühlräder treibt, [...] vergisst man, dass Wissenschaften einen inneren Zweck haben und verliert das eigentlich literarische Interesse, das Streben nach Erkenntnis, als Erkenntnis, aus dem Auge.

***Alexander von Humboldt
(Naturforscher, Universalgelehrter, Menschenrechtler,
Weltreisender, 1769 – 1859)***

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Das maligne Melanom der Haut.....	3
2.1.1	Haupttypen von Melanomen.....	3
2.1.2	Stadieneinteilung.....	4
2.1.3	Therapie.....	5
2.1.4	Risikofaktoren.....	7
2.1.5	Genetische und epigenetische Merkmale des malignen Melanoms.....	8
2.1.6	Die Chemoresistenz von Melanomen.....	11
2.2	Alkylierende Agenzien.....	12
2.2.1	Methylierende Agenzien.....	13
2.2.2	Chlorethylierende Agenzien.....	15
2.3	DNA-Reparatur.....	17
2.3.1	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase.....	17
2.3.2	Nukleotid-Exzisions-Reparatur.....	19
2.3.3	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur.....	22
2.3.4	Interstrang- <i>Crosslink</i> -Reparatur.....	24
2.4	Histon-Desacetylasen.....	28
2.4.1	Epigenetische Regulation der Genexpression durch Histon- Acetyltransferasen und Histondesacetylasen.....	29
2.4.2	Regulation von Nicht-Histon-Proteinen durch HATs und HDACs	32
2.4.3	Desacetylierung, Histondesacetylase-Inhibitoren und Krebs....	33
2.4.4	Valproinsäure.....	34
2.5	Zelltod.....	36
2.5.1	Apoptose.....	37
2.5.2	Nekrose.....	41
2.6	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	42
3	Material.....	44
3.1	Geräte und Hilfsmittel.....	44
3.2	Chemikalien.....	45
3.3	Verbrauchsmaterialien.....	47
3.4	Kits, Assays und gebrauchsfertige Mixe.....	47
3.5	Inhibitoren, Aktivatoren und biologische Substanzen.....	48
3.6	Chemotherapeutika/Gentoxische Substanzen.....	48
3.7	Puffer und Lösungen.....	49
3.8	Zellen.....	51
3.8.1	Bakterien.....	51
3.8.2	Säugerzellen.....	51
3.9	Wachstumsmedien und Zellkulturlösungen.....	52
3.9.1	Wachstumsmedien, Zellkulturlösungen, Antibiotika und Selektionsantibiotika für Säugerzellen.....	52
3.9.2	Wachstumsmedien und Kulturlösungen für Bakterien.....	52
3.10	Nukleinsäuren und Nukleotide.....	53
3.10.1	DNA-Oligonukleotide (Primer).....	53
3.10.2	DNA-Marker – und Ladepuffer.....	56
3.10.3	Vektoren und rekombinante Plasmide.....	56
3.11	Proteine.....	56

3.11.1	Proteinmarker.....	56
3.11.2	und zugehörige Reaktionspuffer.....	56
3.11.3	Antikörper.....	57
3.12	Software und Datenbanken	58
4	Methoden.....	59
4.1	Zellbiologische Methoden	59
4.1.1	Zellkultur	59
4.1.2	Behandlung von Zellen	60
4.1.3	Wachstumskurven	62
4.1.4	Herstellung von stabilen Zellklonen	62
4.1.5	Zelltodmessung am Durchflusszytometer.....	63
4.1.6	Interstrang-Crosslink Comet Assay	64
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	65
4.2.1	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	65
4.2.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	66
4.2.3	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	66
4.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten	66
4.2.5	Transformation von Bakterien.....	67
4.2.6	Mini-Screen: Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke	67
4.2.7	Midi-Präparation: Isolierung von Plasmid-DNA.....	68
4.2.8	Herstellung des shRNA-Vektors gegen XPC.....	68
4.2.9	Untersuchung der Genexpression mittels Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	69
4.3	Biochemische Methoden.....	73
4.3.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten für Western Blots und MGMT-Assay.....	73
4.3.2	Herstellung von Phosphoprotein-Extrakten	73
4.3.3	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Tumorgewebe (Xenograft).....	74
4.3.4	Kern-Plasma-Fraktionierung von Zellen	74
4.3.5	Proteinbestimmung mit der Bradford-Methode	75
4.3.6	MGMT-Aktivitätstest	75
4.3.7	Western Blot.....	76
4.4	Tierversuch.....	78
4.5	Statistiken.....	78
5	Ergebnisse.....	80
5.1	Untersuchungen zur Resistenz menschlicher maligner Melanom-Zelllinien gegenüber dem ICL-induzierenden Zytostatikum Fotemustin	80
5.1.1	Untersuchung der Sensitivität menschlicher maligner Melanom- Zelllinien gegenüber FM.....	80
5.1.2	Untersuchung einer Verbindung zwischen dem p53-Status und einer Resistenz gegenüber FM	81
5.1.3	Analyse der basalen und FM-abhängigen Expression von DNA- Reparatur-Genen; Rolle von p53	84
5.1.4	Analyse der DDB2- und XPC-Induktion auf Proteinebene in weiteren p53wt und p53mt Zelllinien	86
5.1.5	Untersuchung der Rolle von XPC bei der Vermittlung der Resistenz gegenüber FM.....	87

5.1.6	Untersuchung der Dauer der durch FM ausgelösten Induktion von XPC und DDB2.....	90
5.1.7	Untersuchung der Expression von DNA-Reparatur-Genen <i>in vivo</i>	91
5.2	Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Sensitivität von menschlichen malignen Melanom-Zelllinien gegenüber alkylierenden Agenzien.....	92
5.2.1	Untersuchung des Einflusses von VPA auf p53	93
5.2.2	Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Sensitivität von D05-Zellen gegenüber TMZ und FM	94
5.2.3	Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Sensitivität von D14-Zellen gegenüber TMZ und FM	96
5.2.4	Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Induktion von Apoptose und Nekrose in D05-Zellen.....	97
5.2.5	Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Induktion von Apoptose und Nekrose in D14-Zellen.....	98
5.2.6	Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Sensitivität von A375- und RPMI-7951-Zellen gegenüber TMZ und FM	100
5.2.7	Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Proliferation und Zellzyklusverteilung von D05-, D14-, A375- und RPMI-7951-Zellen.....	101
5.2.8	Untersuchung der Rolle des extrinsischen Apoptose-Signalwegs bei der Sensitivierung von D05-Zellen gegenüber TMZ und FM	103
5.2.9	Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Gen-expression in D05-Zellen	105
6	Diskussion.....	108
6.1	Untersuchungen zur Resistenz von menschlichen malignen Melanomzellen gegenüber Fotemustin.....	108
6.1.1	p53 vermittelt in menschlichen malignen Melanom-Zelllinien Resistenz gegenüber Fotemustin	108
6.1.2	FM induziert die Expression der Gene <i>DDB2</i> , <i>XPC</i> und <i>BRCA1</i>	110
6.1.3	Die FM-vermittelte Induktion von <i>DDB2</i> und <i>XPC</i> ist p53-abhängig, persistierend und allgemein in Melanomzellen zu beobachten.....	111
6.1.4	Der <i>Knockdown</i> von XPC sensitiviert gegenüber hohen FM-Konzentrationen	112
6.1.5	Eine einzige FM-Behandlung provoziert auch <i>in vivo</i> eine Induktion von XPC und DDB2	113
6.1.6	Klinische Bedeutung der durch FM ausgelösten Induktion von XPC und DDB2.....	114
6.1.7	Ausblick	115
6.2	VPA sensitiviert menschliche maligne Melanom-Zelllinien gegenüber alkylierenden Agenzien.....	116
6.2.1	VPA hat im untersuchten Zellsystem einen Einfluss auf p53..	117
6.2.2	VPA hat keinen biologisch relevanten Effekt auf die Aktivität von MGMT	118
6.2.3	VPA hat auf die Sensitivität von Melanomzellen gegenüber TMZ und FM unterschiedliche Effekte	119

6.2.4	VPA hat in den untersuchten Melanom-Zelllinien keinen Einfluss auf den Zellzyklus und Populations-Verdopplungszeit.....	121
6.2.5	VPA aktiviert und reprimiert die Genexpression	122
6.2.6	HDACi beeinflussen die DNA-Reparatur	123
6.2.7	HDACi verursachen oxidativen Stress.....	124
6.2.8	Zusammenfassung und Ausblick	125
7	Literaturverzeichnis.....	129
8	Abkürzungsverzeichnis.....	177
9	Abbildungsverzeichnis.....	187
10	Tabellenverzeichnis.....	189
11	Anhang.....	190
11.1	Veröffentlichungen.....	190
11.2	Kongressteilnahmen.....	190

1 Zusammenfassung

Das metastasierende maligne Melanom ist durch eine geringe p53-Mutations-Rate und eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapie mit alkylierenden Agenzien wie Fotemustin (FM) und Temozolomid (TMZ) gekennzeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von p53 in der Resistenz von malignen Melanomzellen gegenüber FM untersucht und Möglichkeiten zur Sensitivierung von Melanomzellen gegenüber TMZ und FM aufgezeigt.

Ausgangspunkt war die Beobachtung, dass p53 Wildtyp (p53wt) Melanomzellen resistenter gegenüber FM sind als p53 mutierte (p53mt) Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine FM-Behandlung in p53wt Zellen eine Stabilisierung von p53 und eine Induktion des p53-Zielproteins p21 bewirkte. Mithilfe einer p53wt Zelllinie, welche einen p53 *Knockdown* trägt, konnte gezeigt werden, dass p53 für die geringe Apoptose-Rate nach FM-Behandlung verantwortlich ist. Eine Untersuchung der Interstrang-*Crosslink* (ICL)-Reparaturkapazität zeigte, dass p53mt Zellen im Gegensatz zu p53wt Zellen nicht in der Lage sind, FM-induzierte ICL zu reparieren. Dies ging mit einer im Vergleich zu p53wt Zellen starken DNA-Schadensantwort einher. Die Gene für die Proteine DDB2 und XPC wurden als durch FM regulierte DNA-Reparatur-Gene identifiziert, deren Induktion p53-abhängig und lang anhaltend (bis zu 144 h) erfolgt. Da XPC *Knockdown*-Zellen sensitiver als ihre Kontrollzellen gegenüber FM reagierten, konnte die biologische Relevanz von XPC bei der ICL-Reparatur bestätigt werden. Anhand von Xenograft-Tumoren wurde gezeigt, dass FM auch *in situ* eine Induktion von DDB2 und XPC auslöst. Die Beobachtung, dass DNA-Reparatur-Gene nach FM-Behandlung hochreguliert werden, liefert eine Erklärung für das schlechte Ansprechen von Melanomen auf eine Therapie mit ICL-induzierenden Chemotherapeutika.

Des Weiteren befasste sich die vorliegende Arbeit mit Möglichkeiten zur Sensitivierung von Melanomzellen gegenüber den Chemotherapeutika TMZ und FM. In diesem Zusammenhang wurde Valproinsäure (VPA), ein in der Epilepsie-Therapie verwendetes Medikament und Histondesacetylase (HDAC)-Hemmer, bezüglich der chemosensitivierenden Wirkung untersucht. Zunächst konnte der in der Literatur häufig beschriebene stabilisierende Effekt von VPA auf „wildtypisches“ p53-Protein und destabilisierende Effekt auf mutiertes p53-Protein bestätigt werden. Zwei der vier untersuchten Zelllinien konnten mithilfe von VPA gegenüber TMZ sensitiviert werden, während nur eine der vier untersuchten Zelllinien gegenüber FM sensitiviert werden konnte. VPA begünstigt die Induktion von Apoptose, während

der Effekt auf die Induktion von Nekrose nur gering ausfiel. Eine Wirkung von VPA auf die Aktivität des Resistenz-vermittelnden Enzyms O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) wurde nicht beobachtet. Zudem wurde ausgeschlossen, dass die Sensitivierung gegenüber TMZ und FM, welche S-Phase abhängige Gentoxine sind, auf einer VPA-induzierten Erhöhung der Proliferation beruht. Mithilfe einer Zelllinie, welche stabil dominant-negatives FADD (*Fas-associated death domain*) exprimiert, konnten keine Hinweise auf eine Beteiligung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs an der VPA-vermittelten Sensitivierung gewonnen werden. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass VPA keine Induktion der niedrig exprimierten Procaspase-8 verursachte. Mithilfe eines PCR-Arrays wurden transaktivierende und –reprimierende Effekte von VPA auf die Genexpression gezeigt, wobei das proapoptotische Protein BAX (*Breakpoint cluster-2-associated x protein*) als ein in der Sensitivierung involviertes Kandidatengen identifiziert wurde. Obwohl eine vollständige Aufklärung der dem Sensitivierungseffekt von VPA zu Grunde liegenden Mechanismen nicht erbracht werden konnte, zeigen die in dieser Arbeit erlangten Beobachtungen einen vielversprechenden Weg zur Überwindung der Resistenz von Melanomzellen gegenüber DNA-alkylierenden Zytostatika auf.

2 Einleitung

2.1 Das maligne Melanom der Haut

Das maligne Melanom, auch schwarzer Hautkrebs genannt, ist eine Neoplasie der Melanozyten, die in der Kutis auftritt und damit zu den Hautkrebserkrankungen zählt. Diese Hautkrebserkrankung ist durch steigende Inzidenz, hohe Chemoresistenz und frühe Metastasierung gekennzeichnet.

Die Inzidenz des kutanen malignen Melanoms hat besonders bei der weißen, sonnenlichtexponierten Bevölkerung stark zugenommen. Die Zunahme der Erkrankungsfälle hat sich in den letzten Jahrzehnten weltweit vervielfacht, wobei hier - im Gegensatz zu anderen soliden Krebserkrankungen - relativ häufig junge Menschen und Menschen mittleren Alters betroffen sind (Markovic et al., 2007a; Tsao et al., 2004). Laut Robert-Koch-Institut erkrankten in Deutschland im Jahr 2006 knapp 16.000 Menschen am malignen Melanom; die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen stieg im Vergleich zu 1980 auf das Vierfache (Krebs in Deutschland 2005/06. Robert-Koch Institut, 2010).

Charakteristisch für das Melanom sind die guten Heilungschancen bei chirurgischer Entfernung des Primärtumors. Demgegenüber steht das häufig auch in der Terminologie abgegrenzte *metastasierende* maligne Melanom, welches durch hohe Aggressivität und eine äußerst schlechte Prognose für den Patienten gekennzeichnet ist. Je nach Lokalisation der Fernmetastasen überleben nur 3 – 15% der Patienten die folgenden 10 Jahre (Balch et al., 2009). Die mediane Überlebenszeit beträgt trotz Chemotherapie nur etwa 6 Monate (Balch et al., 2001; Li and McClay, 2002).

2.1.1 Haupttypen von Melanomen

Melanome können aus Melanozyten der Uvea, Retina, Leptomeningen und der Mukosa der Mundhöhle und des Magen-Darm-Trakts hervorgehen, jedoch über 90% aller Melanome entstehen in der Haut. Hier hat sich die Einteilung in vier Haupttypen etabliert:

- 1) Superfiziell spreitendes Melanom (ca. 55%)
- 2) Noduläres Melanom (ca. 22%)
- 3) Lentigo-maligna-Melanom (ca. 10%)
- 4) Akrolentiginöses Melanom (ca. 5%).

2.1.2 Stadieneinteilung

Patienten mit malignem Melanom werden in 5 verschiedene Stadien eingeteilt, die anhand des TNM (Tumor-Nodulae-Metastasen)-Systems genauer klassifiziert und auf deren Grundlage Therapie und Prognose festgelegt werden. Für Melanome repräsentiert die Stadieneinteilung folgende Merkmale (Balch et al., 2009):

Die Klassen T1 bis T4 beschreiben die Tumordicke von < 1 mm bis > 4 mm, wobei die Buchstaben a oder b das Auftreten (a) bzw. (b) Fehlen von Ulzerationen indizieren. Die Klassen N0 bis N3 beschreiben das Vorhandensein von *lokalen* Lymphknotenmetastasen, wobei im Falle von N0 keine, im Stadium N3 mindestens 4 Lymphknotenmetastasen vorhanden sind. Die Anhängsel a, b oder c stehen stellvertretend für gefundene Mikrometastasen ((a), entdeckt durch Biopsie) oder Makrometastasen ((b), klinisch detektierbar) oder Satelliten- und *in-Transit*-Metastasen ((c), bis 2 cm vom Primärtumor entfernt bzw. (sub-)kutane Metastasen bis zum ersten Lymphknotenstadium).

Stadium	T	N	M	10-JÜR (%)
0	Tis	N0	M0	ca. 100
IA	T1a	N0	M0	88 – 95
IB	T1b, T2a	N0	M0	79 - 83
IIA	T2b, T3a	N0	M0	63 – 64
IIB	T3b, T4a	N0	M0	50 – 54
IIC	T4b	N0	M0	32
IIIA	T1a - T4a	N1a, N2a	M0	57 - 63
IIIB	jedes T oder T1b - T4b	N1a, N2a N1b, N2b, N2c	M0	36 – 38 39 - 47
IIIC	T1b - T4b jedes T	N1b, N2b N3	M0	15 – 24 18
IV	jedes T	jedes N	M1a M1b M1c	15 3 6

Tab. 1: Stadieneinteilung des malignen Melanoms und 10-Jahres-Überlebensraten (10-JÜR).

Die Klassen M0, M1a, M1b und M1c beschreiben das Vorkommen von *hämatogenen* Fernmetastasen: Im Falle von M0 konnten keine Fernmetastasen entdeckt werden, M1a beschreibt den Nachweis von fernen Haut-, Subkutan oder Lymphknotenmetastasen, M1b von Lungenmetastasen, M1c von viszeralen und Fernmetastasen aller anderen Arten. Sobald hämatogene Fernmetastasen diagnostiziert wurden, beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate trotz Therapie maximal 5%.

2.1.3 Therapie

Die Therapie des malignen Melanoms richtet sich nach dem Schweregrad der Erkrankung bzw. dem Stadium, in das der Patient eingeteilt wurde.

2.1.3.1 Chirurgische Therapie

Der Primärtumor selbst sowie gut zugängliche Haut-Metastasen werden durch Totalexzision entfernt, wobei – je nach Dicke des Primärtumors- das umliegende Gewebe bis zu einem Radius von 2 cm vorsorglich mitentfernt wird (Balch et al., 2009; Skalicky et al., 2008).

2.1.3.2 Adjuvante Therapie mit Interferonen

Bei Patienten ohne Lymphknoten- und Organmetastasen wird nach Entfernung des Primärtumors eine systemische Therapie mit Interferon- α (IFN- α) eingeleitet. Hohe Dosen von Interferon- α konnten in verschiedenen Studien die Gesamtüberlebenszeit und/oder das rezidivfreie Intervall erhöhen. Dies wurde allerdings von starken Nebenwirkungen begleitet (Creagan et al., 1995; Kirkwood et al., 2000; Kirkwood et al., 2004; Kirkwood et al., 1996). Die Verabreichung von niedrigeren Dosen ging allerdings mit einer Reduktion der Effektivität der Interferon- α -Therapie einher und ein positiver Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Metastasen konnte gar nicht beobachtet werden (Eggermont et al., 2005; Grob et al., 1998; Hansson et al., 2011; Hauschild et al., 2003; Kirkwood et al., 2000; Kleeberg et al., 2004; Pehamberger et al., 1998; Rusciani et al., 1997).

2.1.3.3 Radiotherapie

Eine Radiotherapie des malignen Melanoms wird vor allem bei der Therapie des Lentigo-maligna-Melanoms und des Uveamelanoms durchgeführt (Markovic et al., 2007b). Zur Erzielung palliativer Effekte werden Knochenmetastasen und chirurgisch schlecht zu entfernende Tumore bestrahlt (Shuff et al., 2010).

2.1.3.4 Chemotherapie

Sobald Metastasen oder inoperable Rezidivtumoren aufgetreten sind, ist eine Chemotherapie des Patienten indiziert. Da die Ansprechrate der Tumore generell sehr schlecht ist, hat sich bisher kein einheitliches Chemotherapie-Schema durchgesetzt. So kann sie entweder als Mono- oder als Polychemotherapie erfolgen. Beispiele für Polychemotherapien sind das BOLD (Bleomycin, Vincristin, Lomustin und Dacarbazin)- und das DVP- (Dacarbazin, Vindesin und Cisplatin)-Schema. Zur Monotherapie werden häufig DNA-alkylierende Agenzien eingesetzt, bei denen man zwischen methylierenden und chlorethylierenden Agenzien unterscheidet. Das Medikament erster Wahl bei der Chemotherapie von Melanomen ist das methylierende Agenz Dacarbazin (DTIC). Allerdings liegt die Ansprechrate je nach Studie bei nur ca. 12 - 20% und die durchschnittliche Überlebenszeit bei etwa 6,4 Monaten (Li and McClay, 2002; Middleton et al., 2000; Quirt et al., 2007). Das neuartige methylierende Agenz Temozolomid (TMZ) hat einige Vorteile gegenüber DTIC und wird daher zunehmend eingesetzt. Es ist oral verabreichbar, benötigt keine metabolische Aktivierung und ist aufgrund seiner Liquorgängigkeit auch für die Behandlung von Hirnmetastasen geeignet (Newlands et al., 1997; Ostermann et al., 2004). TMZ erreicht vergleichbare Ansprechraten und Überlebensdauern wie DTIC (Bleehen et al., 1995; Kaufmann et al., 2005; Middleton et al., 2000; Newlands et al., 1992; Quirt et al., 2007). Das chlorethylierende Agenz Fotemustin (FM) gehört zur Gruppe der Nitrosoharnstoff-Derivate und wird ebenfalls zur (Mono)-Therapie des malignen Melanoms, besonders des Uveamelanoms und dessen Lebermetastasen, verwendet (Khayat et al., 1991; Li and McClay, 2002; Schuster et al., 2010; Voelter et al., 2008). Es ist mit einer Ansprechrate von 20 – 25% das in Melanomen aktivste Nitrosoharnstoff-Derivat (Jacquillat et al., 1990). Aufgrund seiner Liquorgängigkeit ist es auch zur Behandlung von Hirnmetastasen geeignet (Khayat et al., 1992; Khayat et al., 1994; Mornex et al., 2003; Mouawad et al., 2010).

Um das Ansprechen der Patienten auf die Alkylanzien zu verbessern, kann eine kombinierte Chemoimmuntherapie durchgeführt werden, die allerdings auch mit

stärkerer Toxizität für den Patienten einhergeht. Hierbei werden oben genannte Chemotherapeutika mit Zytokinen wie IFN- α und Interleukin-2 (IL-2) kombiniert (Atkins, 1997; Buzaid and Legha, 1994; Eton et al., 2002; Hauschild et al., 2008; Kaufmann et al., 2005; Legha et al., 1996; Legha et al., 1998; Legha et al., 1997; Quirt et al., 2007).

2.1.3.5 Zielgerichtete Therapie

Vemurafenib ist ein potenter, im Jahr 2011 von der FDA zugelassener BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*)-Inhibitor, welcher nur die mutierte BRAFV600E-Form angreift (Bollag et al., 2010) und daher selektiv auf Tumorzellen wirkt (Bollag et al., 2010; Joseph et al., 2010; Tsai et al., 2008). Durch Inhibition dieser konstitutiv aktiven BRAF-Form wird die proliferative ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*)-Signalkaskade unterbrochen und somit die Zellproliferation gehemmt (Joseph et al., 2010). Vemurafenib wird nur zusammen mit einem diagnostischen, Polymerasekettenreaktion (PCR)-basierten Test angewendet, welcher die V600E-Mutation spezifisch nachweist. Die Zulassung von Vemurafenib zur Therapie des metastasierenden malignen Melanoms ist daher ein bedeutender Schritt auf dem Weg zu einer personalisierten, zielgerichteten Krebstherapie.

Die Zulassung erfolgte nach erfolgreichem Abschluss einer internationalen klinischen Studie, welche 675 Patienten mit metastasierendem malignen Melanom einschloss (Chapman et al., 2011). Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie war, dass der Patient noch nicht behandelt wurde und dass die Tumore die BRAFV600E-Mutation aufwiesen. Vemurafenib senkte die Sterberate im Vergleich mit der Dacarbazin-behandelten Gruppe um 63%. In der Vemurafenib-Gruppe erlitten 74% weniger Patienten ein Fortschreiten der Erkrankung im Vergleich mit der Dacarbazin-Gruppe. Die Ansprechrate der Vemurafenib-Gruppe lag bei 48,4%, wohingegen sie im Falle der Dacarbazin-Gruppe nur 5,5% betrug. Die Nebenwirkungen waren sehr mild und umfassten Gelenkschmerzen, Plattenzellkarzinome der Haut, Photosensitivität, Hautausschlag und eine Erhöhung der Leberwerte.

2.1.4 Risikofaktoren

In der Literatur werden verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung und die starke Erhöhung der Neuerkrankungsraten des malignen Melanoms diskutiert.

Hierbei spielen sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Faktoren eine Rolle. Im Folgenden wird nur auf evidenzgesicherte Risikofaktoren eingegangen.

Die Anzahl, Morphologie, Lokalisation und Größe von so genannten benignen Nävi - kongenitale oder erworbene Akkumulationen von Melanozyten oder Nävuszellen - korreliert stark mit der Wahrscheinlichkeit, an schwarzem Hautkrebs zu erkranken (Garbe et al., 1994; Holly et al., 1987; Watt et al., 2004).

Ein bedeutender Risikofaktor, der zur Erhöhung der Melanominzidenz beiträgt, ist die Exposition der Haut gegenüber Sonnenlicht. Hierbei kommt den in der Kindheit erlittenen Sonnenbränden eine besondere Bedeutung zu (Elwood and Jopson, 1997; Markovic et al., 2007a; Veierod et al., 2003). Vor allem durch die Verdünnung der Ozonschicht und ein verändertes Freizeitverhalten (Schönheitsideal gebräunte Haut, Fernreisen) gewinnt dieser Risikofaktor mehr und mehr an Bedeutung. In diesem Zusammenhang sind Menschen mit hellem Hauttyp, blauen oder grünen Augen und blonden oder roten Haaren besonders betroffen (Duffy et al., 2004; Markovic et al., 2007a). Ein in diesem Kontext für die Melanogenese bedeutender Polymorphismus mit niedriger Penetranz findet sich im *MC1R* (*Melanocortin 1 receptor*)-Gen, welches für den Melanokortin-Rezeptor kodiert und die Synthese von Melanin induziert. Hier konnte gezeigt werden, dass so genannte „R“-Allele, welche für den RHC (*red hair colour*)-Phänotyp verantwortlich sind, Risikofaktoren für die Erkrankung an einem Melanom darstellen (Duffy et al., 2004).

Die Gene *ASIP* (*Agouti signaling protein*), *TYR* (*Tyrosinase*) und *TYRP1* (*Tyrosinase related protein 1*) spielen ebenfalls eine Rolle in der Pigmentierung von Haut, Augen und Haaren und wurden in einer isländischen Studie ebenfalls als Kandidatengene für die Melanom-Suszeptibilität entdeckt (Gudbjartsson et al., 2008).

Des Weiteren haben immunsupprimierte Patienten ein höheres Risiko, ein malignes Melanom zu entwickeln. Hierzu gehören Personen mit Organtransplantaten, AIDS (*Acquired immunodeficiency syndrome*) und Leukämien (Euvrard et al., 2003; Euvrard et al., 2004; Hollenbeak et al., 2005; Markovic et al., 2007a; Smith et al., 1993).

2.1.5 Genetische und epigenetische Merkmale des malignen Melanoms

Heutzutage sind einige charakteristische genetische und epigenetische Veränderungen des malignen Melanoms bekannt. Diese können sowohl hereditär

(ca. 10%) als auch im Laufe des Lebens erworben worden sein (Meyer and Zone, 1994). Die hiervon betroffenen Gene übernehmen wichtige Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus und der Induktion von Seneszenz und Apoptose.

2.1.5.1 Aufhebung der Seneszenz-Induktion und Förderung der G1-S-Transition

Beim familiären malignen Melanom zählt das p53-Zielgen *CDKN2A* (*Cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) zu den Suszeptibilitätsgenen mit hoher Penetranz. So wurde in einer groß angelegten Studie in 40% der Familien, deren Mitglieder überdurchschnittlich oft an malignem Melanom erkrankten, eine *CDKN2A*-Mutation gefunden (Goldstein et al., 2006). Zudem wurden im Laufe des Lebens erworbene Veränderungen dieses Gens beobachtet. In den meisten Fällen ist dieses Gen durch Deletion, Funktionsverlust-Mutation oder Promoter-Hypermethylierung inaktiviert (Alonso et al., 2004; Bennett, 2008; Dahl and Gulberg, 2007; Ghiorzo et al., 2004; Hayward, 2003). Es kodiert die Zellzyklus-regulierenden Proteine p16^{INK4A} (*p16 inhibitor of kinase 4A*) und p14^{ARF} (*p14 alternative reading frame*), wobei in Melanomen die p16^{INK4A}-kodierende Region häufiger betroffen ist. p16^{INK4A} ist ein wichtiger Inhibitor von Cyclin D-CDK4/6-Komplexen und damit an der Induktion von Seneszenz beteiligt. Eine verstärkte Aktivität der Cyclin D-CDK4/6-Komplexe führt zur Phosphorylierung des Tumorsuppressors RB und bewirkt damit eine Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. Dies resultiert in einer Induktion von *early response genes*, welche die G1-S-Transition induzieren (*Point of no return*). Die Keimzell-Mutation des *CDK4*-Gens gehört ebenfalls zu den hochpenetranten Suszeptibilitätsfaktoren (Zuo et al., 1996), und auch hier wurden häufig somatische Mutationen in Form von Gen-Amplifikationen oder Punktmutationen nachgewiesen. Sie führen zu einer verringerten Bindung der Kinase an ihren Inhibitor p16^{INK4A}. Beides resultiert über ähnliche Mechanismen wie im Falle der *CDKN2A*-Mutation zum Verlust der Kontrolle über die G1-S-Transition.

2.1.5.2 Stimulation von Wachstumsfaktor-Signalwegen

Zu den Genen, die häufig im Laufe des Lebens (epi-)genetische Veränderungen erfahren und mit der Melanomentstehung assoziiert sind, gehören beispielsweise die Onkogene *BRAF*, *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*), und *KIT* (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) (Hocker et al., 2008; Zaidi et al., 2008). Mutationen dieser Gene führen zu einer Aktivierung

des MAPK (*Mitogen activated protein kinase*)-Signalwegs und fördern damit die Proliferation und das Überleben der Zellen (Platz et al., 2008; Wan et al., 2004; Wellbrock et al., 2004). Die somatische V600E Mutation von *BRAF* wurde in 60 - 70% aller Melanome gefunden. Jedoch wurde diese Mutation auch häufig in benignen Nävi nachgewiesen: verschiedene Arbeiten zeigten, dass die Mutation von *BRAF* allein keinen transformierenden Charakter hat (Pollock et al., 2003; Yazdi et al., 2003).

Die GTPase (Guanosintriphosphat-spaltende Hydrolase) NRAS weist in Melanomen häufig eine Funktionsgewinnmutation auf, welche ebenfalls zu einer Hyperaktivierung der MAPK-Signaltransduktion führt.

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase KIT steht am Anfang der MAPK-Signalkaskade und spielt eine entscheidende Rolle für das Überleben von Melanozyten. Vor allem in Melanomen der Mukosa und akrolentiginösen Melanomen wurden aktivierende Punktmutationen und Amplifikationen des Gens nachgewiesen (Beadling et al., 2008; Curtin et al., 2006; Pollock et al., 2003).

2.1.5.3 Deregulation der Apoptose

Beispiele für in der Melanom-Entwicklung bedeutende Gene, die durch Promotor-Methylierung und Hypoacetylierung von Histon-Proteinen stillgelegt werden (*epigenetic silencing*), sind die Gene für BAX (*Bcl-2 associated x protein*), BAK (*Bcl2-antagonist/killer*), BID (*BH3 interacting domain death agonist*), PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), APAF1 (*Apoptotic protease-activating factor 1*) und Caspase-8 (Bandyopadhyay et al., 2004; Gillespie et al., 2006; Kurbanov et al., 2007; Soengas et al., 2001; Zhang et al., 2003a, 2004a).

BAX und BAK sind p53-Zielgene, proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie und kooperieren bei der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (Green and Kroemer, 2004) (s. auch 2.5.1.2). Bei Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs erfolgt die Spaltung von BID, welches nun als Verbindungsglied fungiert und den mitochondrialen Apoptose-Signalweg aktiviert (Green and Kroemer, 2004). APAF-1 ist ebenfalls ein proapoptotisches Protein und p53-Zielgen (s. 2.5.1.2). APAF-1 ist eine Schlüsselkomponente bei der Apoptosombildung und damit bei der Aktivierung der Caspase-9 (Green and Kroemer, 2004).

Die Caspase-8 ist eine Initiator-Caspase des Rezeptor-Apoptose-Signalwegs und somit für die Aktivierung der Effektor-Caspasen verantwortlich (Muzio et al., 1996) (s. 2.5.1.1). Eine epigenetische Stilllegung dieser Gene geht mit verminderter Anfälligkeit gegenüber Apoptose einher und begünstigt damit die Tumorentstehung.

Die Phosphatase PTEN inhibiert AKT, eine Kinase, welche für die Transduktion von Wachstums- und Überlebenssignalen verantwortlich ist (Cantley and Neel, 1999; Kandel and Hay, 1999). Die epigenetische Stilllegung von PTEN verstärkt die AKT-Signaltransduktion und wirkt sich daher auch positiv auf die Onkogenese aus.

2.1.5.4 Geringe Mutationsfrequenz des Tumorsuppressors p53 in Melanomen

Eines der bedeutendsten Tumorsuppressorgene ist das Gen *TP53*, welches für den Transkriptionsfaktor p53 kodiert. p53 spielt bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden eine zentrale Rolle und wird daher auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. p53-Zielgene kodieren Schlüsselproteine der Apoptose, der DNA-Reparatur und des Zellzyklusarrests (Michalak et al., 2005; Rozan and El-Deiry, 2007). Zudem greift p53 auch transkriptionsunabhängig durch Protein-Protein-Interaktionen in die Induktion der Apoptose und in die DNA-Reparatur ein (Chipuk and Green, 2006; Sengupta and Harris, 2005; Yee and Vousden, 2005).

Aufgrund seiner bedeutenden Rolle als Tumorsuppressor ist p53 in 50% - 60% aller menschlichen Neoplasien mutiert (Bourdon, 2007; Toledo and Wahl, 2006; Vousden and Lane, 2007). In malignen Melanomen jedoch ist p53 bemerkenswerterweise mit einer Frequenz von nur 0 – 25% mutiert (Bennett, 2008; Hocker and Tsao, 2007; Lubbe et al., 1994; Papp et al., 1996; Straume and Akslen, 1997). Zudem wird *TP53* während der Entwicklung vom Melanozyt zum metastasierenden Melanom verstärkt exprimiert (Sparrow et al., 1995; Weiss et al., 1995; Weiss et al., 1993).

2.1.6 Die Chemoresistenz von Melanomen

Wie in Kapitel 2.1.3.4 erwähnt ist das Ansprechen von Melanomen auf jegliche Art der Chemotherapie äußerst schlecht, und selten führt sie zu einer Verlängerung der Überlebensdauer des Patienten. Einige der hierfür möglicherweise verantwortlichen Resistenz-vermittelnden Faktoren des malignen Melanoms werden im Folgenden genauer dargestellt.

Zunächst sei ein hypothetischer Aspekt erwähnt. Melanozyten benötigen eine hohe intrinsische Resistenz, welche ursächlich für die Chemoresistenz von Melanomen sein könnte. Sie müssen ihre Funktion als Photoprotektoren der Haut auch bei hohem UV-induzierten DNA-Schaden und oxidativem Stress, verursacht durch die Synthese von Melanin, erfüllen (Box and Terzian, 2008). Um unter diesen

Bedingungen überleben zu können, benötigen sie eine relativ hohe DNA-Reparaturkapazität bei gleichzeitig geringer Neigung zur Induktion der Apoptose (Box and Terzian, 2008). Diese beiden Eigenschaften vermitteln daher nicht nur eine natürliche Resistenz gegenüber physiologisch in Melanozyten vorkommenden DNA-Schäden, sondern – zusammen mit weiteren während der Melanom-Progression auftretenden malignitätsfördernden Veränderungen - auch Resistenz gegenüber (DNA-schädigenden) Chemotherapeutika. In Übereinstimmung hiermit steht, dass Melanome größere Mengen einiger Nukleotid-Exzisionsreparatur-Proteine exprimieren als Melanozyten (Bowden et al., 2010).

Zudem besitzen Melanozyten die Eigenschaft, sehr hohe Mengen an antiapoptotischem Bcl-2 zu exprimieren (Nishimura et al., 2005) und nach Bestrahlung mit UV-Licht GADD45A zu induzieren, welches Apoptose inhibiert (Fayolle et al., 2008). Weitere typische Eigenschaften von Melanomen, welche mit der Inhibition der Apoptose assoziiert sind, werden in Kapitel 2.1.5.3 genauer beschrieben.

2.2 Alkylierende Agenzien

Alkylierende Agenzien (AA) sind in unserer Umwelt ubiquitär verbreitet. Sie entstehen beispielsweise bei industriellen Prozessen, bei der Nahrungsmittelverarbeitung und bei der unvollständigen Verbrennung von Zigarettenrauch, aber auch bei endogenen Vorgängen wie Metabolismus und Inflammation (Bartsch and Montesano, 1984; DeMarini, 2004; Jagerstad and Skog, 2005; Marnett and Burcham, 1993). Ein bedeutendes zelluläres Zielmolekül von AA ist die DNA, welche an 13 verschiedenen Positionen alkyliert werden kann. Besonders die Alkylierung der O⁶-Position der DNA-Base Guanin erzeugt eine mutagene Läsion, welche für die toxischen und karzinogenen Eigenschaften der AA verantwortlich ist (Kaina et al., 2007) (s. 2.2.1 und 2.2.2).

Das DNA-Reparaturenzym MGMT (O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, s. 2.3.1) entfernt O⁶-Alkylierungen des Guanins sehr effizient und ist daher der bedeutendste Schutzfaktor der Zelle gegenüber den toxischen Wirkungen der O⁶-Alkylguanin induzierenden Agenzien. In Abwesenheit von MGMT induzieren O⁶-Alkylierungen DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) als Sekundärläsionen, welche stark zytotoxisch und hochpotente Induktoren der Apoptose (s. 2.5.1) sind (Kaina et al., 2007; Ochs and Kaina, 2000; Roos et al., 2004; Roos et al., 2007). Bei der Verabreichung von hohen Dosen von O⁶-AA verliert MGMT allerdings seine Bedeutung als Schutzfaktor der Zelle, da die induzierten N-Alkylierungen nach

Übersteigen der Reparaturkapazität der Zelle ebenfalls zur Zytotoxizität beitragen (Kaina et al., 2010).

Aufgrund der antineoplastischen Eigenschaften der O⁶-AA werden sie zur Chemotherapie verschiedenster maligner Neoplasien verwendet. Hierbei kommen sowohl O⁶-methylierende als auch O⁶-chloroethylierende Agenzien zum Einsatz. Diese beiden Wirkstoffgruppen werden im Folgenden genauer vorgestellt.

2.2.1 Methylierende Agenzien

Methylierende Chemotherapeutika wie Procarbazin (PCZ), Dacarbazin (DTIC) und Temozolomid (TMZ) werden u. a. zur Behandlung von Melanomen (s. 2.1.3.4), Glioblastomen und Lymphomen eingesetzt (Markovic et al., 2007b; Preusser et al., 2011; Punnett et al., 2010). Ihr aktives Intermediat – ein elektrophiles Carbenium-Ion – reagiert nach dem S_N1-Mechanismus mit nukleophilen Zentren der DNA. N-Alkylierungen stellen die weitaus häufigsten Addukte dar. So entstehen u. a. N7-Methylguanin und die wesentlich instabileren Addukte N3-Methyladenin und N3-Methylguanin, welche durch die Basenexzisionsreparatur (BER) repariert werden können. Im Gegensatz hierzu wird O⁴-Methylthymine nur etwa zu 0,4% induziert und kann durch MGMT (s. 2.3.1) repariert werden. O⁶-Methylguanin (O⁶MeG) ist die weitaus toxischste Läsion, welche jedoch nur zu einem Anteil von 0,3 – 8% induziert und sehr effizient durch MGMT repariert wird. Es verursacht Punktmutationen, chromosomale Aberrationen und Schwesterchromatiden-Austausche (SCE) und trägt zur Tumorentstehung und –progression bei. Aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften ist O⁶MeG Hauptvermittler der während der Chemotherapie erzielten antineoplastischen Effekte (Kaina et al., 2007). Die Abwesenheit von MGMT und das Funktionieren der Basen-Fehlpaarungs-Reparatur (MMR, *Mismatch repair*) sind notwendige Voraussetzungen für die O⁶MeG-induzierte Toxizität (Branch et al., 1993; Karran and Bignami, 1994).

Das populärste Modell der Prozessierung von O⁶MeG in der Zelle wird im Folgenden erklärt und ist in **Abb. 1** vereinfacht dargestellt. Entfernt MGMT die Methylgruppe des O⁶MeG noch vor der Replikation, hat diese Modifikation der DNA keine weiteren negativen Konsequenzen für die Zelle (Hampson et al., 1997). Durchläuft die Zelle allerdings die S-Phase, so geht O⁶MeG während der Replikation eine Fehlpaarung mit Thymin ein (Toorchen and Topal, 1983). MGMT kann nun postreplikativ die Methylgruppe entfernen, wobei ein nicht-komplementäres Guanin:Thymin-Paar in der DNA zurückbleibt. Diese Fehlpaarung führt entweder im Laufe der nächsten Replikation zu einer GC → AT-Transition und

damit zur Etablierung einer Mutation, oder sie wird durch die MMR erkannt und repariert. Beide Möglichkeiten gehen mit dem Überleben der Zelle einher. Wird MGMT nicht exprimiert oder ist seine Reparaturkapazität erschöpft, so wirkt O⁶MeG über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen stark genotoxisch. Wahrscheinlich erfolgen sich wiederholende Exzisionen und Reinsertionen des Thymins gegenüber des O⁶MeG durch das MMR-System (Duckett et al., 1996; Hampson et al., 1997; Karran and Bignami, 1994). Dabei entstehen Lücken in der DNA, welche das Fortschreiten der Replikationsgabel blockieren und deren Kollaps induzieren (Ochs and Kaina, 2000). Bei diesem Vorgang entstehen DSB, welche vorwiegend durch die homologe Rekombination (HR, s. 2.3.3) repariert werden und zu Schwesterchromatiden-Austauschen (*Sister chromatid exchange*, SCE) führen (Kaina et al., 1997; Mojas et al., 2007; Quiros et al., 2010; Roos et al., 2009a). Übersteigt die Zahl der DSB die Reparaturkapazität der Zelle, so vermitteln sie die toxische Wirkung des O⁶MeG und führen im ersten Nachbehandlungszyklus oder in einem der folgenden Zellzyklen zur Induktion von Apoptose (s. 2.5.1) (Kaina et al., 1997; Ochs and Kaina, 2000; Quiros et al., 2010).

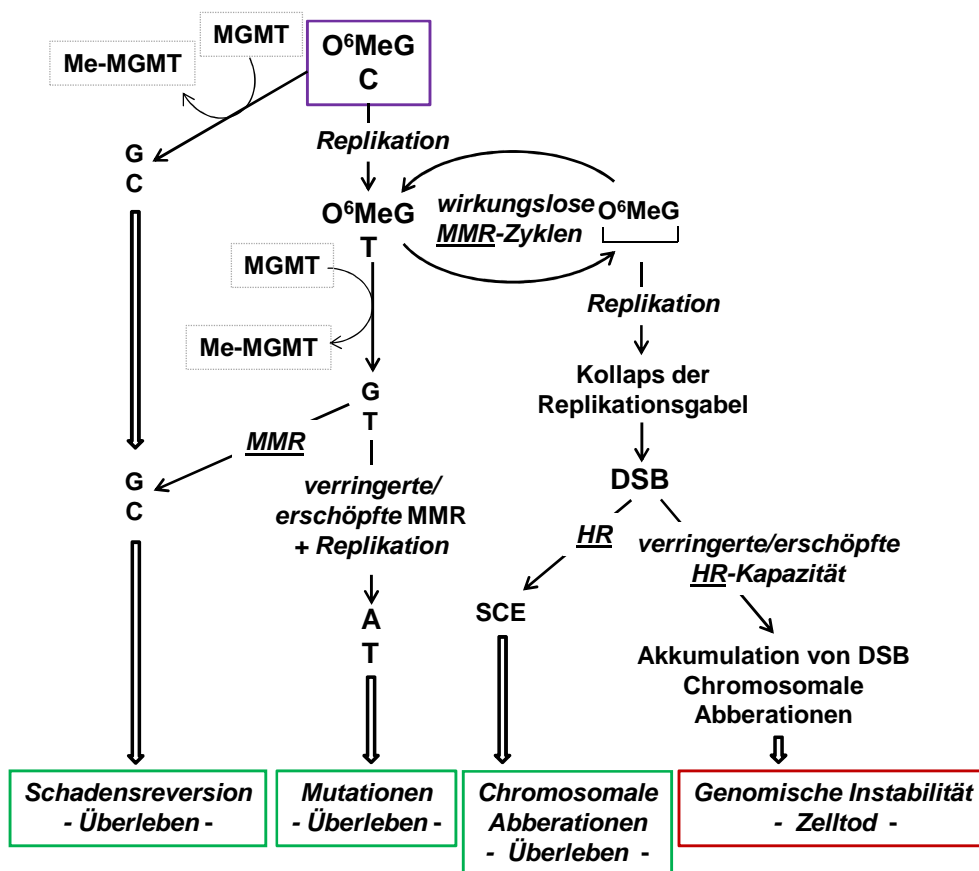


Abb. 1: Vereinfachtes Modell zur Prozessierung von O⁶MeG, welche – je nach physiologischem Kontext – zu verschiedenen Endpunkten führt. Me-MGMT: Methyliertes MGMT

2.2.2 Chlorethylierende Agenzien

Chlorethylierende Agenzien wie Carmustin (BCNU), Nimustin (ACNU), Lomustin (CCNU) und Fotemustin (FM) gehören zu den *N*-Chlorethyl-*N*-Nitrosoharnstoff-Derivaten (CNU, *2-ChlorethylNitrosoureas*). Sie werden vor allem zur Therapie von Glioblastomen, des malignen Melanoms und malignen Hirnmetastasen verschiedenen Ursprungs eingesetzt und entweder als Monotherapeutikum oder in der Kombination mit weiteren antineoplastischen Medikamenten verwendet (Jacquillat et al., 1990; Khayat et al., 1992; Khayat et al., 1994; Mornex et al., 2003). Die antineoplastische Wirkung der chlorethylierten Agenzien beruht auf der Induktion von DNA-Interstrang-*Crosslinks* (ICL), welche grundlegende physiologische Prozesse wie DNA-Replikation und Transkription blockieren (Dronkert and Kanaar, 2001; McHugh et al., 2001; Muniandy et al., 2010).

Bei physiologischem pH-Wert von 7,4 zerfallen alle CNU durch spontane Hydrolyse, wobei das hochreaktive, elektrophile Intermediat 2-Chlorethyldiazohydroxid entsteht (Brundrett, 1980; Hayes et al., 1997). Dieses reagiert nach dem Mechanismus der unimolekularen nukleophilen Substitution (S_N1 -Mechanismus) mit nukleophilen Zentren der DNA, wobei zu etwa 97% *N*-Chlorethylierungen entstehen. Hiervon befinden sich ca. 95% der Alkylierungen an der N7-Position von Guanin (Inga et al., 1999). *N*-Alkylierungen werden sehr effizient durch die BER repariert. Obwohl O^6 -Chlorethylguanin (O^6 CIeTG) nur 2 – 3% aller Addukte darstellt und nur 1% aller DNA-Chlorethylierungen zu Interstrang-*Crosslinks* führen (Inga et al., 1999), wird O^6 CIeTG aufgrund seiner ICL-induzierenden Eigenschaften die größte Toxizität beigemessen (Colvin et al., 1974; Montgomery et al., 1975; Reed et al., 1975; Thomas et al., 1978). ICL gehören zu den gefährlichsten DNA-Läsionen überhaupt. Es wird geschätzt, dass etwa 20 – 40 unreparierte ICL zum Tod von Säuger-Zellen führen (Lawley and Phillips, 1996; Muniandy et al., 2010). Während der Reparatur des ICL entstehen Punktmutationen, DSB und SCE, welche einerseits für die Tumor-initiiierenden und –promovierenden und andererseits für die antineoplastischen Wirkungen der CNU verantwortlich sind.

Die Prozessierung von O^6 CIeTG in der Zelle und die Reparatur der ICL ist unzureichend aufgeklärt und wird kontrovers diskutiert; sie soll im Folgenden jedoch vereinfacht erläutert werden (s. **Abb. 2**).

O^6 CIeTG wird – wie O^6 MeG auch – sehr effizient durch MGMT repariert (Brent et al., 1987a; Brent et al., 1987b; Pegg, 1990). Wird die Alkylgruppe des O^6 CIeTG durch MGMT entfernt, hat diese DNA-Modifikation keine weiteren negativen Konsequenzen für die Zelle (Hampson et al., 1997). Geschieht dies jedoch nicht, so

entstehen *in vitro* innerhalb von 8 – 12 h nach der Alkylierung ICL (Brent et al., 1987a). Hierbei findet eine intramolekulare Umlagerung des O⁶CIeTg statt, wobei zunächst N1-O⁶-Ethanoguanin entsteht. N1-O⁶-Ethanoguanin reagiert nun entweder mit MGMT und führt zu dessen kovalenter Bindung an die DNA (Gonzaga et al., 1992), oder es reagiert im Folgeschritt mit dem gegenüberliegenden Nucleosid, Desoxycytidin, wobei ein N1-Guanin-N3-Cytosin-ICL (dCytidin-CH₂-CH₂-dGuanosin) entsteht (Tong et al., 1982). Das Auftreffen der Replikationsgabel auf den ICL bewirkt einen Replikationsblock und den Kollaps des Replikationskomplexes, in dessen Folge DSB entstehen.

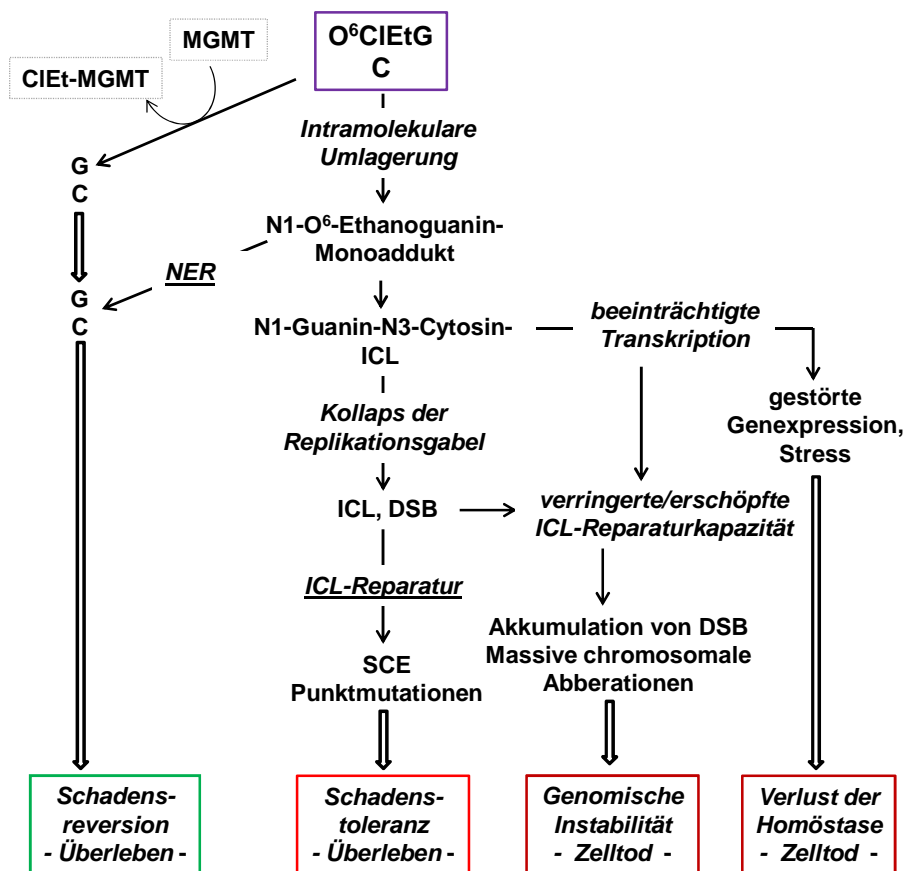


Abb. 2: Vereinfachtes Modell zur Prozessierung von O⁶CIeTg, welches - wird es nicht durch MGMT repariert -, zur Bildung von DNA-Interstrang-Crosslinks (ICL) führt. Diese hemmen Replikation und Transkription und wirken daher zytotoxisch.

Die Quervernetzungen der beiden DNA-Stränge und die daraus resultierenden Sekundärläsionen werden durch die so genannte ICL-Reparatur (s. 2.3.4), bestehend aus Komponenten der DSB- und Nucleotid-Exzisions-Reparatur (NER) sowie Fanconi-Proteinen, repariert. Die Integrität des DNA-Doppelstrangs wird somit wiederhergestellt. Hierbei können allerdings Punktmutationen und SCE entstehen, welche jedoch von der Zelle toleriert werden. Übersteigt die Zahl der DSB die

Reparaturkapazität der Zelle, so bewirken sie eine zytotoxische Wirkung von O⁶CIEtG, indem sie Apoptose induzieren.

2.3 DNA-Reparatur

Aus naturwissenschaftlicher Sicht besteht der Sinn des Lebens in der Weitergabe von Genen an die Tochtergeneration. Voraussetzung hierfür ist die Unversehrtheit des Genoms, welches die genetische Information eines Organismus in Form von chromosomaler DNA kodiert und daher im Gegensatz zu anderen Makromolekülen der Zelle nicht ersetzt werden kann. Die Konservierung der DNA muss daher trotz ständiger Angriffe durch endogene und exogene Agenzien stets gewährleistet sein. Aus diesem Grund haben sich im Laufe der Evolution potente Mechanismen zur Detektion von DNA-Schäden, eine DNA-Schadensantwort und verschiedene DNA-Reparatursysteme entwickelt (Ljungman, 2010).

In den folgenden Kapiteln werden die verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen vorgestellt. Hierbei werden solche, die in besonderem Maße an der Prozessierung von O⁶-AA-induzierten Schäden beteiligt sind, ausgiebiger behandelt.

2.3.1 O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Das DNA-Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist hauptverantwortlich im Schutz gegenüber der O⁶-AA induzierten Karzinogenese (s. 2.2), da es effizient die Entfernung von Alkyl-Gruppen an der O⁶-Position des Guanins katalysiert (Kaina et al., 1991). Ein weiteres Substrat mit geringerer biologischer Bedeutung ist O⁴-Methylthymin (Graves et al., 1987; Zak et al., 1994). Da MGMT die Entfernung der O⁶-Läsionen in einem Einschrittprozess durchführt, spricht man hierbei auch von Schadensreversion. Die Alkyl-Gruppe wird kovalent auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum des MGMT übertragen, wobei das Enzym selbst irreversibel inaktiviert wird. Aus diesem Grund wird MGMT auch als Suizidenzym bezeichnet, welches nach Beendigung der Reaktion polyubiquitinyliert und proteasomal degradiert wird (Srivenugopal et al., 1996; Xu-Welliver and Pegg, 2002). Daher ist die Kapazität einer Zelle, O⁶-Alkylierungsaddukte zu reparieren, stark abhängig von der vorhandenen MGMT-Menge und der Aktivierbarkeit des MGMT-Promotors.

Agenzien, welche zur Induktion von MGMT führen, sind UV-Licht, Corticosteroide, Proteinkinase C-Aktivatoren, ionisierende Strahlung und alkylierende Agenzien (Boldogh et al., 1998; Fritz et al., 1991; Grombacher and Kaina, 1995; Grombacher

et al., 1996). Dies kann über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP1, NFκB, p53 und den Glucocorticoid-Rezeptor vermittelt werden (Harris et al., 1991; Kaina et al., 2007; Lavon et al., 2007).

Die Aktivierbarkeit des Promotors durch Transkriptionsfaktoren wird häufig durch die Methylierung von CpG-Inseln auf epigenetischer Ebene (s. 2.4.1) unterbunden (Costello et al., 1994a; Costello et al., 1994b; Harris et al., 1991; Qian et al., 1995; Qian and Brent, 1997). Es konnte auch gezeigt werden, dass der Verlust von p53 mit verstärkter *MGMT*-Methylierung einhergeht, während eine p53-Überexpression zu deren Verminderung führt (Esteve et al., 2005; Lai et al., 2008; Peterson et al., 2003). Im Gegensatz hierzu steht die Beobachtung, dass vor einem *MGMT*-profizienten Hintergrund die Überexpression von p53 zu einer verminderten *MGMT*-Expression führt. Dies erfolgt durch die Blockierung der Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an seine Bindungsstellen im *MGMT*-Promotor (Bocangel et al., 2009; Srivenugopal et al., 2001).

MGMT wird ubiquitär exprimiert, allerdings lassen sich Gewebe-spezifische Unterschiede beobachten (Christmann et al., 2011; Margison et al., 2003). So ist die Expression in Leber und Darm physiologischerweise besonders hoch, während sie im Gehirn sehr gering ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die *MGMT*-Expression hohen interindividuellen Schwankungen unterliegt (Janssen et al., 2001; Myrnes et al., 1983). In Tumoren ist die *MGMT*-Aktivität bzw. -Expression noch variabler, wobei Brust-, Kolon-, Lungen- und Ovarialtumoren die höchste Aktivität zeigen (Chen et al., 1992; Christmann et al., 2011; Kaina et al., 2007; Margison et al., 2003; Preuss et al., 1996).

2.3.1.1 *MGMT* in Melanomen

Im Vergleich zu anderen Tumorarten ist die Aktivität von *MGMT* in Melanomen relativ gering (Chen et al., 1992). Egyhazi und Kollegen zeigten, dass der überwiegende Teil der von ihnen untersuchten Melanom-Metastasen *MGMT*-Expression oder -Aktivität aufweisen (Egyhazi et al., 1995; Egyhazi et al., 1997). Diese Beobachtung wurde von Augustine und Kollegen bestätigt, da der Großteil der von ihnen untersuchten Melanom-Zelllinien *MGMT*-Aktivität besitzen (Augustine et al., 2009). Der *MGMT*-Promotor ist je nach Studie in 0 – 50% der untersuchten Melanom-Zelllinien und 13 – 35% der Tumorproben hypermethyliert (Furuta et al., 2004; Tellez et al., 2009). Auch in Melanomen korreliert die *MGMT*-Aktivität mit der Resistenz gegenüber alkylierenden Agenzien (Naumann et al., 2009; Passagne et al., 2003). Wie bei anderen Tumorarten, kann eine Behandlung der Zellen mit O⁶-

AA zur Induktion von MGMT führen, was mit einer Verstärkung der Resistenz einhergeht (Christmann et al., 2001; Egyhazi et al., 1997).

2.3.2 Nukleotid-Exzisions-Reparatur

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur ist eines der vielseitigsten DNA-Reparatursysteme, da es verschiedenste Helix-verdrehende Läsionen entfernt. Hierzu gehören UV-induzierte Photoläsionen [(6-4) Photoprodukte (6-4PPs) und Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs)], Intrastrang-Crosslinks und „sperrige“ Addukte, welche aus Reaktionen der DNA mit beispielsweise Aflatoxin oder Benzo[a]pyren hervorgehen. Defekte in NER-Komponenten führen beim Menschen zu autosomal-rezessiv übertragenen Erbkrankheiten wie Xeroderma pigmentosum (XP) und dem Cockayne-Syndrom (CS). Während XP-Patienten sowohl eine hohe Photosensitivität als auch eine Prädisposition gegenüber Hautkrebs aufweisen, konnte Letzteres bei CS-Patienten nicht beobachtet werden (Friedberg, 2001; Hoeijmakers, 2001). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Krankheiten auf Defekten in zwei unterschiedlichen NER-Wegen beruhen: Bei XP-Patienten ist die Globale Genom-NER (GG-NER) gestört, während bei CS-Patienten die Transkriptions-gekoppelte NER (TC-NER, *Transcription coupled NER*) betroffen ist. Für XP sind 8 (XP-A bis XP-G, XPV), für CS zwei (*CS-A und CS-B*) Komplementationsgruppen bekannt. Die TC-NER entfernt Läsionen vom transkribierten Strang aktiver Gene, während die GG-NER für die Replikations-unabhängige Reparatur nicht-transkribierten Chromatins und des Sinnstrangs transkribierter Gene verantwortlich ist. Ihr kommt große biologische Bedeutung zu, da sie die Wahrscheinlichkeit der Manifestation von Mutationen während der Replikation durch transläsionale DNA-Synthese vermindert (Friedberg, 2001; Hoeijmakers, 2001). GG-NER und TC-NER unterscheiden sich hauptsächlich in den DNA-Schadenserkennungsschritten. Bei der TC-NER ermöglicht die Blockierung der RNA-Polymerase II (RNAPII) die Detektion der Läsion und löst die Reparatur aus (Tornaletti and Hanawalt, 1999; van den Boom et al., 2004). Hierbei sind die Proteine CSA und CSB als Vermittler der RNAPII-Ubiquitylierung, gefolgt von deren Dislokation und Degradation, unabdingbar (van Hoffen et al., 1993; Venema et al., 1990). Im Gegensatz hierzu besitzt die GG-NER spezielle Schadenserkennungs-Proteine: das XPC-RAD23A/B (Xeroderma pigmentosum Komplementationsgruppe C – rad23 Homolog)-Heterodimer ist der primäre Läsionsdetektor (Reardon et al., 1996). Zudem sind DDB1-DDB2 (*Damaged DNA binding protein 1/2*) (Chu and Chang, 1988; Tang et al., 2000) und XPA-RPA

(*Replication protein A*) (Asahina et al., 1994; Li et al., 1995) an der Schadenserkenkung beteiligt.

Nachdem der Schaden durch einen der beiden NER-Erkennungsmechanismen detektiert wurde, läuft der Reparaturprozess auf ähnliche Weise ab:

Zunächst entwindet der TFIIH (Transkriptionsfaktor IIH)-Komplex, welcher die beiden Helikasen XPB und XPD enthält, den geschädigten DNA-Bereich (Araujo et al., 2001; Evans et al., 1997; Schaeffer et al., 1994; Schaeffer et al., 1993; Weeda et al., 1990). Hierdurch entsteht der so genannte Präinzisions-Komplex, in welchem XPA den Schaden abgrenzt und welcher durch das Einzelstrang-bindende Protein RPA stabilisiert wird (Evans et al., 1997; Mu et al., 1997; Staresincic et al., 2009; Wakasugi et al., 1997). Die Endonukleasen ERCC1-XPF und XPG schneiden nun an der 5'- bzw. 3'-Seite der Läsion, was zur Freisetzung eines Oligonukleotids führt, welches den Schaden enthält (Matsunaga et al., 1995; O'Donovan et al., 1994; Sijbers et al., 1996).

Der etwa 24 bis 32 Nukleotide große einzelsträngige Bereich wird nun durch die DNA-Polymerasen δ und ϵ in Anwesenheit von PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) und RF-C (*Replication factor C*) wieder aufgefüllt. Zuletzt katalysiert Ligase I die Ausbildung der Phosphodiesterbindung zum neu synthetisierten Oligonukleotid (Araujo et al., 2000; Moser et al., 2007; Mu et al., 1997).

2.3.2.1 XPC und DDB2

Da die beiden NER-Proteine XPC und DDB2 in dieser Arbeit untersucht wurden, soll hier ihre Rolle bei der GG-NER und ihre Regulation detailliert beschrieben werden. XPC liegt im Komplex mit HR23A/B vor. HR23A/B stimuliert die Aktivität von XPC und verhindert dessen proteasomale Degradation (Ng et al., 2003; Sugasawa et al., 1997). XPC-HR23A/B spielt eine grundlegende Rolle bei der Schadenserkenkung und Reparatur von Helix-verdrehenden Läsionen (Sugasawa et al., 1998; Volker et al., 2001). *In vitro* bindet es DNA-Addukte mit unterschiedlichsten chemischen Strukturen. Es erkennt besonders verzweigte, blasenförmige Strukturen, welche Übergänge zwischen doppel- und einzelsträngigen DNA-Bereichen enthalten und die DNA-Doppelhelix verdrehen (Sugasawa et al., 2001; Sugasawa et al., 2002). Die Erkennung und Reparatur erfolgt umso stärker, je Helix-verdrehender die Läsion ist (Geacintov et al., 2002). Während die Erkennung von 6-4PPs effizient erfolgt, ist die von CPDs abhängig vom UV-DDB-Komplex (s. u.) (Fitch et al., 2003b; Moser et al., 2005; Nishi et al., 2009). Zudem ist XPC-HR23A/B für die Rekrutierung von TFIIH zur Schadensstelle verantwortlich (Araujo et al., 2001; Li et al., 1998b; Yokoi

et al., 2000). Die DNA-Bindung von XPC kann durch Polyubiquitylierung, welche durch den UV-DDB1-CUL4-ROC1-Komplex (s. u.) nach UV-Bestrahlung vermittelt wird, potenziert werden (Sugasawa et al., 2005). Eine weitere UV-induzierte posttranslationale Modifikation von XPC ist die Sumoylierung, welche wahrscheinlich zu dessen Stabilisierung führt (Wang et al., 2005).

DDB2 bildet zusammen mit DDB1 den so genannten UV-DDB-Komplex. Interessanterweise wurden in XP-E-Patienten bisher nur Mutationen im *DDB2*-Gen gefunden (Hwang et al., 1998; Nichols et al., 2000; Nichols et al., 1996). UV-DDB bindet 6-4PP mit hoher Affinität, während die Bindung an CPDs moderat ist (Fujiwara et al., 1999; Reardon et al., 1993; Sugasawa et al., 2005; Wittschieben et al., 2005). Da XPC allein nicht in der Lage ist, CPDs zu erkennen, ist der UV-DDB-Komplex unentbehrlich für die Reparatur von CPDs (Kusumoto et al., 2001; Sugasawa et al., 2001). In Übereinstimmung hiermit ist die Entfernung von CPDs in XP-E mutierten Zellen deutlich vermindert, während die Reparatur von 6-4PPs nur leicht betroffen ist (Hwang et al., 1999). Generell nimmt die Bindung von UV-DDB an Läsionen deutlich ab, sobald der einzelsträngige, blasenförmige Bereich mehr als drei Nukleotide umfasst (Wittschieben et al., 2005). Nach Beendigung der Erkennung der Photoläsion durch UV-DDB wird der Komplex proteasomal degradiert (Fitch et al., 2003a; Ropic-Otrin et al., 2002). Die hierfür nötige Polyubiquitylierung wird durch die E3-Ligase CUL4A vermittelt, welche im Komplex mit DDB1 und ROC1 vorliegt (Chen et al., 2001b; Groisman et al., 2003; Shiyonov et al., 1999).

Sowohl XPC als auch DDB2 können transkriptionell reguliert werden. Der Transkriptionsfaktor p53 spielt hierbei die wahrscheinlich bedeutendste Rolle. Er bestimmt sowohl die basalen XPC- und DDB2-Mengen als auch ihre Induktion nach Detektion von DNA-Schäden. p53 beeinflusst damit entscheidend die NER-Kapazität einer Zelle (Adimoolam and Ford, 2003). So weisen p53-defiziente Zellen niedrigere Mengen an DDB2 und XPC und eine verminderte GG-NER-Kapazität auf (Adimoolam and Ford, 2002; Ford and Hanawalt, 1997; Hwang et al., 1999; Smith et al., 1995). Die durch p53 induzierte Neusynthese von DDB2 tritt allerdings mit beträchtlicher Verzögerung zu einem Zeitpunkt ein, an dem der DNA-Schaden schon erkannt und DNA-gebundenes DDB2 degradiert wurde (Ropic-Otrin et al., 2002). Die Induktion von DDB2 durch p53 dient daher wahrscheinlich dem Nachfüllen des zellulären DDB2-Pools, welcher während der vorangegangenen Schadensdetektion verbraucht wurde. Zudem fördert das Tumorsuppressorgen BRCA1 (*Breast cancer type 1 susceptibility protein*) die Bindung von p53 an den DDB2-Promotor und damit dessen Induktion (Navaraj et al., 2005; Takimoto et al.,

2002). Des Weiteren kann BRCA1 auch p53-unabhängig DDB2 und XPC-induzieren (Hartman and Ford, 2002; Somasundaram, 2003). Lin und Kollegen haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor E2F1 in UV-bestrahlten Zellen an sein responsives Element im *XPC*-Promotor bindet und die Transkription induziert (Lin et al., 2009).

2.3.3 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Bei physiologischen Prozessen wie der V(D)J-Rekombination oder der Segregation der Chromosomen während der Meiose werden DSB in die DNA eingefügt (Keeney and Neale, 2006; Soulas-Sprauel et al., 2007). Sie können allerdings auch durch endogene oder exogene Angriffe auf die DNA entstehen, welche entweder den DSB direkt verursachen oder ihn replikationsabhängig induzieren. Endogene Noxen, die zur Entstehung von DSB führen, sind beispielsweise Nukleasen, physikalischer Stress während der Trennung der Schwesterchromatiden während der Meiose oder Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive oxygen species*). Chemotherapeutika sowie UV- und ionisierende Strahlung (*Ionizing radiation*, IR) sind Beispiele für DSB-verursachende exogene Noxen. Da bereits ein DSB genomische Instabilität und Zelltod induzieren kann, ist die effiziente und korrekte Reparatur für das Überleben der Zelle essentiell (Rich et al., 2000). Die Detektion der DSB erfolgt an so genannten DNA-Schadens-Kontrollpunkten (*DNA damage checkpoints*) des Zellzyklus und führt zunächst zum Zellzyklus-Arrest. Dieser dient primär der Reparatur des Schadens, bevor die Zelle in die nächste Zellzyklusphase übertritt (Weinert and Hartwell, 1988). Gleichzeitig resultiert die DNA-Schadensantwort in der Aktivierung von DNA-Reparatur-Proteinen und der Induktion von DNA-Reparatur-Genen.

In Eukaryoten unterscheidet man zwei DSB-Reparaturwege: die Homologe Rekombination (HR) und die Nicht-homologe Endverknüpfung (*Nonhomologous end joining*, NHEJ). Die HR findet bevorzugt in der S-Phase und der G2-Phase des Zellzyklus statt, da das Vorhandensein einer homologen Matrize in Form eines Schwesterchromatids notwendige Voraussetzung ist. Drei aufeinanderfolgende Schritte sind kennzeichnend für die klassische HR: 1) Die Bildung von 3'-Überhängen an den DSB-Enden, 2) Das Einwandern eines Strangs des geschädigten Chromatids in den homologen DNA-Doppelstrang, gefolgt von der komplementären Neusynthese, und 3) Die Auflösung des so entstandenen Reparatur-Intermediats.

Zu Beginn der HR dient der MRN (MRE11, *Meiotic recombination 11 homolog 1*; RAD50, *rad50 Homolog*; NBN, *Nibrin*)-Komplex als Schadenssensor für DSB (Chen

et al., 2001a; Hopfner et al., 2002). Er bindet an die offenen DNA-Enden, stabilisiert sie und rekrutiert die Transduktorkinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) zur Schadensstelle. ATM löst die *Checkpoint*-Aktivierung aus, indem es der Zelle das Vorhandensein von unreparierten DSB signalisiert (Grenon et al., 2001; Lee and Paull, 2005; Paull and Lee, 2005). Hierzu phosphoryliert es eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher zellulärer Prozesse. Beispielsweise induziert die Phosphorylierung der Kinase CHEK2 (*Cell cycle checkpoint kinase 2*) Zellzyklusarrest, während das Zielprotein p53 die DNA-Reparatur stimuliert und – je nachdem vor welchem Hintergrund die Prozesse ablaufen - proapoptotisch wirkt (Roos and Kaina, 2006). Nach Stabilisierung der DSB-Enden erfolgt dort die so genannte End-Resektion, bei der 3'-Überhänge gebildet werden (Lamarche et al., 2010). Hierzu rekrutiert der MRN-Komplex ein Heterodimer aus BRCA1 und CtIP (*CtBP (C-terminal-binding protein) interacting protein*), welches zusammen mit dem MRN-Komplex die Endresektion reguliert (Limbo et al., 2007; Sartori et al., 2007). Die hierbei entstandenen einzelsträngigen Bereiche werden von RPA umhüllt, welches nun das ATR-ATRIP (*Ataxia telangiectasia and rad 3 related - ATR-interacting protein*)-Heterodimer bindet (Zou and Elledge, 2003). Auch ATR ist eine Transduktorkinase, welche Signale beispielsweise durch Phosphorylierung von p53 und CHEK1 (*Cell cycle checkpoint kinase 1*) vermittelt und amplifiziert (Guo et al., 2000; Zhao and Piwnica-Worms, 2001). Für die effiziente Reparatur ist die Phosphorylierung des Histons H2AX (nach Phosphorylierung γ H2AX genannt) durch ATM und ATR essentiell. Es markiert die Schadensstelle, interagiert mit dem MRN-Komplex, MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint Protein 1*) und ATM und amplifiziert das Schadenssignal (Rogakou et al., 1998; Stucki et al., 2005). Die Bindung von RPA an die einzelsträngigen 3'-Überhänge ist Voraussetzung für die Ausbildung des RAD51 (*rad51 Homolog*)-Nukleoproteinfilaments, auch präsynaptischer Komplex genannt (Song and Sung, 2000). Dieses ist essenziell für die so genannte Strang-Einwanderung. Sie führt zur Entstehung des synaptischen Komplexes mit der so genannten *D-Loop (Displacement Loop)*, einem Heteroduplex aus geschädigtem DNA-Strang und seinem intakten Homolog. BRCA2 (*Breast cancer type 2 susceptibility protein*) fördert den Austausch von RPA mit RAD51 (Song and Sung, 2000), während BRCA1 RAD51 und BRCA2 im Bereich der Schadensstelle sequestriert (Greenberg et al., 2006). RAD54 (*rad54 Homolog*) ist ebenfalls in mehreren Schritten der HR involviert. Es ist ein Chromatin-*Remodeling*-Komplex und fördert die Einwanderung des RAD51-Nukleofilaments. Zudem unterstützt es die Beladung des 3'-Überhangs mit RAD51-Rekombinase und die Suche nach und Paarung mit homologen Bereichen (Amitani et al., 2006; Bugreev

et al., 2007; Heyer et al., 2006; Sugawara et al., 2003). Nach Zusammenfinden der Homologen erfolgt die Verlängerung des eingewanderten Strangs, wobei der verloren gegangene Bereich neu synthetisiert wird. Als Resultat ist einer der beiden Stränge des geschädigten Chromatids wieder intakt und dient als Matrize zur Reparatur des zweiten Strangs durch Neusynthese (Ferguson and Holloman, 1996; Nassif et al., 1994; Strathern et al., 1982). Bei diesem als Synthese-abhängige Strang-Anlagerung (*Synthesis dependent strand annealing*, SSDA) bezeichneten Modell finden keine Schwesterchromatidenaustausche statt. Erfolgt eine gleichzeitige Neusynthese beider geschädigter Stränge mithilfe desselben Strangs des Schwesterchromatids als Matrize, so bezeichnet man dieses Modell klassisch als Doppelstrangbruch-Reparatur (*Double-strand break-repair*, DSBR) (Orr-Weaver and Szostak, 1983; Orr-Weaver et al., 1983; Szostak et al., 1983). Hierbei entstehen so genannte Holliday-Junktionen, bei deren Auflösung Rekombinationen und in der Folge SCE stattfinden können (Holliday, 2007).

Da die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) im Gegensatz zur HR kein homologes Schwesterchromatid benötigt, findet sie bevorzugt in der G₀- und G₁-Phase des Zellzyklus statt (Shrivastav et al., 2008). Sie spielt bei der Reparatur von O⁶-AA-induzierten DNA-Schäden allerdings keine große Rolle (Roos et al., 2009a). Bei der Verknüpfung der DSB-Enden entstehen häufig Insertionen, Deletionen und Translokationen (Moore and Haber, 1996; Wilson et al., 1997). Sie gilt daher im Vergleich mit der HR als sehr fehleranfällig.

2.3.4 Interstrang-Crosslink-Reparatur

Es existieren nur wenige endogene Substanzen, die ICL induzieren. Endogene ICL-induzierende Agenzien sind z.B. Malondialdehyd, ein Produkt der Lipidperoxidation, oder Stickstoffoxid als Gas oder in seiner hydrierten Form (HONO) (Caulfield et al., 2003; Niedernhofer et al., 2003; Scharer, 2005; Shapiro et al., 1977). Exogene Quellen ICL-induzierender Agenzien sind beispielsweise Formaldehyd und das antibiotisch wirkende Pilzgift Mitomycin C (Kim et al., 2002; Kozekov et al., 2003; Kozekov et al., 2001; Scharer, 2005). Die prominentesten Vertreter ICL-induzierender Agenzien sind Chemotherapeutika. Die hierzu gehörenden Chloronitrosoharnstoff-Derivate, Mitomycin C (MMC) oder Cisplatin werden, mehr oder weniger erfolgreich, zur Therapie nahezu aller malignen Neoplasien eingesetzt. Die Gruppe der O⁶-alkylierenden Agenzien, welche zu den Chloronitrosoharnstoff-Derivaten gehören, werden in Kapitel 2.2.2 genauer vorgestellt.

Die schnelle und effiziente Reparatur von ICL ist bedeutend für das Überleben der Zelle, da bereits etwa 40 ICL Reparatur-defiziente Säugerzellen töten können (Lawley and Phillips, 1996; Magana-Schwencke et al., 1982). Das Auftreffen der Replikationsgabel auf den ICL ist das Zytotoxizität-vermittelnde Ereignis, da hierbei hochtoxische DSB als Sekundärschäden entstehen (Bessho, 2003; De Silva et al., 2000). Da das Fanconi-Netzwerk die Entstehung von DSB verhindert, haben Zellen von Fanconi-Patienten einen Defekt in der ICL-Reparatur und sind daher hypersensitiv gegenüber Interstrang-*Crosslinkern* (D'Andrea and Grompe, 2003; Joenje and Patel, 2001; Sobock et al., 2006). Die Reparatur ICL-assoziierter Schäden stellt für die Zelle eine große Herausforderung dar. So treten ICL unter physiologischen Bedingungen selten auf, so dass im Laufe der Evolution noch kein spezialisierter ICL-Reparaturmechanismus entstanden ist. Ein weiteres Problem der ICL-Reparatur beruht auf der Beteiligung beider DNA-Stränge, so dass kein intakter Strang als Matrize vorhanden ist. Die ICL-Reparatur bedient sich daher in Abhängigkeit von der Struktur des ICL selbst Komponenten der GG-NER (Hoy et al., 1985; Kaye et al., 1980; Wood, 2010), der TC-NER (Vos and Hanawalt, 1987; Zheng et al., 2003), der HR (Dronkert and Kanaar, 2001), des NHEJ (Dronkert and Kanaar, 2001), der MMR (Fiumicino et al., 2000; Muniandy et al., 2009; Wu et al., 2005), der Transläsions-Synthese (TLS) (Minko et al., 2008; Roos et al., 2009b) und des Fanconi-Netzwerks (Kennedy and D'Andrea, 2005; Patel and Joenje, 2007). Ihr Mechanismus ist noch relativ unbekannt, weil die experimentelle Untersuchung Probleme mit sich bringt. So ist der Reparaturmechanismus von der Struktur der *Crosslinks* selbst abhängig und daher existieren Unterschiede im Reparaturmechanismus der verschiedenen Läsionen. Außerdem verursachen die meisten *Crosslinker* hauptsächlich andere DNA-Schäden, so dass es schwierig ist, die zelluläre Antwort auf diese Schäden von der auf die *Crosslinks* zu unterscheiden.

Die ICL-Reparatur läuft in folgenden Schritten ab:

- 1) Schadenserkenkung (in Abwesenheit von Replikation oder beim Kollaps der Replikationsgabel)
- 2) Inzision und *Crosslink*-Entkopplung (*Unhooking*)
- 3) Entfernung des Monoaddukts und Auffüllen der Lücken
- 4) Reparatur des offenen DSB durch HR

Die Reparatur von ICL kann Replikations-unabhängig in der G0/G1-Phase erfolgen, wobei die Rekrutierung von Fanconi-Proteinen abhängig von XPC und XPA ist

(Ben-Yehoyada et al., 2009). Spätestens die Blockierung der Replikationsgabel und der daran angeschlossene Kollaps ist das Ereignis, welches zelluläre Reaktionen auf den Schaden hervorruft (Akkari et al., 2000). Während der G1-Phase, wenn noch kein DSB vorhanden ist, sind unterschiedliche Proteine in der Erkennung des ICL involviert. Komponenten der MMR dienen als Sensoren von MMC- und Psoralen-induzierten ICL und binden an Cisplatin-induzierte ICL (Fiumicino et al., 2000; Wu et al., 2005; Zhu and Lippard, 2009). Proteine der TC-NER sind an der Detektion von Cisplatin-induzierten ICL beteiligt (Furuta et al., 2002; Islas et al., 1994; Zheng et al., 2003). Der GG-NER-Faktor XPC ist zur Erkennung und Entfernung von Psoralen-induzierten ICL notwendig, und eine XPC-Defizienz führt zu einer leichten Sensitivierung der Zellen auch gegenüber Laser-lokaliserten ICL (Chen et al., 2003; Muniandy et al., 2009; Thoma et al., 2005). Interessanterweise korreliert die XPC-Defizienz mit der Unfähigkeit, wenig Helix-verdrehende MMC-induzierte ICL zu reparieren (Zheng et al., 2003), während noch nie gezeigt werden konnte, dass XPC für die Reparatur von stark Helix-verdrehenden Cisplatin-induzierten ICL benötigt wird.

Die Blockierung der Replikationsgabel durch den ICL führt zur Aktivierung der Transduktorkinase ATR. Diese stimuliert die DNA-Reparatur beispielsweise durch Phosphorylierung von H2AX und aktiviert den S-Phase *Checkpoint* durch Phosphorylierung von CHEK1 und FANCD2 (Pichierri and Rosselli, 2004). Außerdem induziert die Blockierung der Replikationsgabel die Assemblierung des aktiven Fanconi-Kern-Komplexes bestehend aus den Komplementationsgruppen FANCA/B/C/E/F/G/L/M (Kennedy and D'Andrea, 2005; Mirchandani and D'Andrea, 2006), welcher für die ICL-Reparatur unabdingbar ist. Die durch den aktiven Kern-Komplex induzierte Monoubiquitylierung von FANCD2 durch die E3-Ligase FANCL dient als Marker für die Aktivierung des Fanconi-Netzwerks (Andreassen et al., 2004; Taniguchi et al., 2002). In der folgenden Prozessierung des ICL entsteht ein Doppelstrangbruch an der Replikationsgabel, entweder durch deren Kollaps oder durch Inzision eines parentalen Strangs (De Silva et al., 2000; Niedernhofer et al., 2004). Diese Inzision wird wahrscheinlich durch die Endonukleasen ERCC1-XPF oder MUS81-EME1 durchgeführt (De Silva et al., 2000; Dendouga et al., 2005; Hanada et al., 2006; Niedernhofer et al., 2004). Sowohl beim Kollaps der Replikationsgabel als auch bei der Inzision entstehen zwei Heteroduplexe aus Eltern- und Tochterstrang, wobei ein Doppelstrang einen offenen Bruch aufweist (**Abb. 3**).



Abb. 3: Schematisches Modell zur Entstehung eines offenen DSB an einer blockierten Replikationsgabel. Sie beruht auf der Inzision eines Matrizenstrangs durch eine Endonuklease oder auf dem Kollaps der blockierten Replikationsgabel.

Zur Auflösung des ICL entwenden Helikasen wie FANCM die Doppelhelix im Bereich des *Crosslinks* (Mosedale et al., 2005). Die DNA öffnet sich blasenartig, so dass einzelsträngige Bereiche entstehen, welche durch RPA ummantelt werden. Nun erfolgt die Entkopplung des ICL, wozu XPF-ERCC1 einen Strang in der Nähe des ICL schneidet (Fisher et al., 2008; Kumaresan et al., 2002; Niedernhofer et al., 2004; Rothfuss and Grompe, 2004). Dieses Modell wird unterstützt durch die Beobachtung, dass ERCC1- und XPF-defiziente Zellen hypersensitiv auf ICL-induzierende Agenzien reagieren (Andersson et al., 1996; Dahl and Gulberg, 2007; De Silva et al., 2000, 2002; Niedernhofer et al., 2004). Monoubiquitinyliertes FANCD2 fördert die Inzision durch ERCC1-XPF und die Entkopplung des *Crosslinks* (**Abb. 4**) (Kumaresan and Lambert, 2000; Kumaresan et al., 2007; McCabe et al., 2008). Als Folge entsteht eine Lücke mit 3'-Ende, welches als Startpunkt zur DNA-Synthese durch eine fehleranfällige Transläsionspolymerase genutzt werden kann (**Abb. 4**) (Minko et al., 2008; Roos et al., 2009b). Bei dieser DNA-Neusynthese werden häufig falsche Basen und damit Mutationen in die DNA eingefügt. Das Vorhandensein des aktiven Fanconi-Kern-Komplexes fördert die TLS (Mirchandani et al., 2008). Dies geht mit der Beobachtung einher, dass Zellen von Fanconi-Patienten deutlich weniger Punktmutationen aufweisen (Niedernhofer et al., 2005; Niedzwiedz et al., 2004).

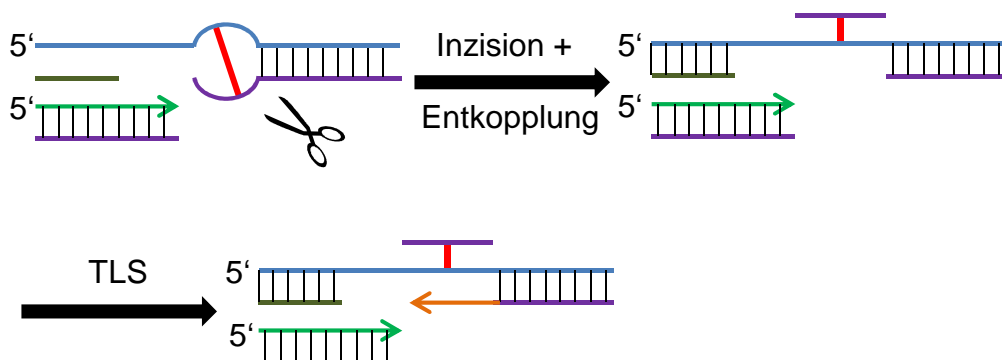


Abb. 4: Schematisches Modell zur Entstehung der zweiten Inzision durch ERCC1-XPF, Entkopplung des ICL und Transläsionssynthese (TLS, oranger Pfeil). Nach Entkopplung des ICL füllt eine fehleranfällige Transläsionspolymerase die Lücke im DNA-Strang wieder auf.

Nach Beendigung der Reparatursynthese durch eine Transläsionspolymerase wird das entkoppelte Monoaddukt aus der Helix herausgedrängt. So entsteht ein Substrat für den so genannten zweiten Reparaturzyklus, bei dem das Monoaddukt aus der DNA entfernt wird (**Abb 5**).

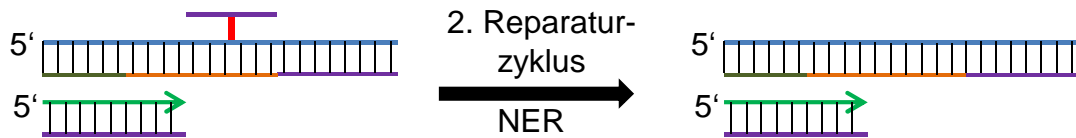


Abb 5: Schematisches Modell des zweiten Reparaturzyklus. Nach Beendigung der Transläsionssynthese wird das aus der Helix herausgedrängte Monoaddukt durch NER aus der DNA entfernt.

Nach Induktion von Laser-lokaliserten ICL wird der Beginn des zweiten Reparaturzyklus durch die Rekrutierung von DDB2 zur Schadensstelle eingeleitet (Muniandy et al., 2009). Die Entfernung des Monoaddukts selbst wird anschließend wahrscheinlich durch die NER durchgeführt (Cipak et al., 2006). Die folgende Reparatur des offenen DSB beruht hauptsächlich auf der HR, eingeleitet durch die Endresektion des 5'-Endes (Niedernhofer et al., 2005; Patel and Joenje, 2007). Monoubiquitinyliertes FANCD2 wirkt auf viele Weisen stimulierend auf die HR. So reguliert es einige HR-assoziierte Funktionen von BRCA2/FANCD1 und colokalisiert mit RAD51 und BRCA1 (Garcia-Higuera et al., 2001; Hussain et al., 2004). Des Weiteren interagiert FANCD2 mit TIP60, einer Histondesacetylase, welche durch Acetylierung von ATM eine bedeutende Rolle in der HR besitzt (Hejna et al., 2008; Ikura et al., 2000; Squatrito et al., 2006; Sun et al., 2005). Die HR wird in Kapitel 2.3.3 genauer beschrieben.

2.4 Histon-Desacetylasen

Histon-Desacetylasen (HDACs) katalysieren die Entfernung von an ϵ -Aminogruppen (ϵ -NH₃⁺-Gruppen) gebundenen Acetyl-Resten verschiedenster zellulärer Proteine (Spange et al., 2009; Witt et al., 2009). Aus diesem Grund werden sie auch häufig als Lysin-Desacetylasen (KDACs) bezeichnet. Ihre Benennung rührt daher, dass Histone ihre ersten identifizierten Zielproteine waren (Inoue and Fujimoto, 1969).

HDACs werden aufgrund ihrer phylogenetischen Konservierung in vier Hauptklassen eingeteilt (Gregoretto et al., 2004):

- Klasse I: HDAC1, 2, 3 und 8
- Klasse IIa: HDAC4, 5, 7 und 9

- Klasse IIb: HDAC6 und 10
- Klasse III: SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7
- Klasse IV: HDAC11

Die Klassen I, II und IV werden als klassische HDACs bezeichnet (de Ruijter et al., 2003). Sie sind Zink-abhängige Desacetylasen und strukturell mit den HDA1 (*Histone deacetylase 1*)/Rpd3-Proteinen aus *S. cerevisiae* verwandt (Yang and Seto, 2008). Klasse I-HDACs sind Bestandteil von Multiproteinkomplexen und vorwiegend im Nukleus lokalisiert, wo sie vor allem als Transrepressoren agieren, welche die Genexpression auf epigenetischer Ebene regulieren (Yang and Seto, 2008). Die Unterklasse der IIa-HDACs besitzen eine Kernimport- und -export-Sequenz. Ihre Assoziation mit Bindungspartnern ist stark abhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus und reguliert ihre subzelluläre Lokalisation (Verdin et al., 2003; Yang and Gregoire, 2005). Durch diese Eigenschaft spielen sie eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion zwischen Zytoplasma und Nukleus (Yang and Seto, 2008). HDAC6 ist die besser Erforschte der beiden Klasse IIb-HDACs. Sie ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wo sie eine wichtige Rolle bei der Dynamik des Zytoskeletts spielt (Boyault et al., 2007). Ihre Aktivität wird ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert, ihr prominentestes Zielprotein ist α -Tubulin (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003b).

Die Klasse III-Enzyme, auch Sirtuine (*Sir „tu“-like protein*) genannt, sind Homologe des Hefe-Proteins Sir2 (*Silent information regulator 2*) (Haigis and Guarente, 2006; Yang and Seto, 2008). Sirtuine benötigen Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) als Cofaktor (Haigis and Guarente, 2006). Sie werden ubiquitär exprimiert und gelten als Schlüsselregulatoren der Lebensdauer und des Alterns (Kaeberlein et al., 1999; Kennedy et al., 1995; Michishita et al., 2005). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass eine Beschränkung der Kalorienzufuhr die NAD⁺/NADH-Ratio der Zelle und damit des Sirtuin-Cofaktors NAD⁺ erhöht und die Lebenszeit von Versuchstieren verlängert (Baur et al., 2006; Guarente and Picard, 2005).

2.4.1 Epigenetische Regulation der Genexpression durch Histon-Acetyltransferasen und Histondesacetylasen

Der Begriff Epigenetik wurde 1942 durch Conrad Waddington geprägt. Epigenetik umfasst vererbare Veränderungen der Genexpression und des Phänotyps, welche nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen. Die prominentesten und am besten charakterisierten Mediatoren der epigenetischen Regulation der Genexpression sind die microRNA (miRNA)-induzierte Degradation und Repression

der Translation von mRNAs, die Methylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich von Genen und die posttranslationale Modifikation der Histone (Berger, 2002; Bird, 2002; Kouzarides, 2007).

Zu den bisher bekannten Histon-Modifikationen gehören Acetylierung (Sterner and Berger, 2000), Phosphorylierung (Nowak and Corces, 2004), Methylierung (Sims et al., 2003), Sumoylierung (Nathan et al., 2006), Ubiquitylierung (Shilatifard, 2006), Arginin-Deiminierung (Cuthbert et al., 2004), Prolin-Isomerisierung (Nelson et al., 2006) und ADP-Ribosylierung (Hassa et al., 2006). Die Gesamtheit des Modifikationsmusters bildet den so genannten *Histone Code*, welcher einen bestimmten biologischen Ausgang kodiert (Berger, 2002; Turner, 2002) und Prozesse wie Transkription, Replikation, DNA-Reparatur, Chromatin-Kondensation und Apoptose beeinflusst (Kouzarides, 2007).

Die kovalente Acetylierung der Histone fördert die Auflockerung der Chromatinstruktur und damit die Transkription (Wang et al., 2007a). Sie wird durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) – den „Gegenspielern“ der HDACs – katalysiert. HATs werden drei Hauptfamilien zugeordnet: GNATs (*Gcn5-related N-acetyl transferases*), MYSTs (MOZ/YBF2/SAS2/TIP60) und CBP/p300 (*CREB-binding protein/p300*) (Sterner and Berger, 2000). Sie übertragen eine Acetyl-Gruppe von Acetyl-Coenzym A auf die entsprechenden Lysin-Reste von Histonen. Die meisten Acetylierungsstellen der Histone befinden sich aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit an den aus dem Nukleosom hervorstehenden N-Termini (Kouzarides, 2007). Zur Regulation der Transkription werden besonders Histone von Promotor-assoziierten (TATA Box und *Promoter proximal elements*) Nukleosomen (des-)acetyliert (Sewack et al., 2001; Turner, 2000; Urnov and Wolffe, 2001).

Die Transkriptions-hemmende Wirkung der Histon-Desacetylierung beruht auf zwei Effekten:

- 1) Straffen der Chromatinstruktur (*cis*-aktiver Mechanismus): Durch Desacetylierung der ϵ -NH₂-C(O)CH₃-Gruppen der Histone H3 und H4 entstehen positiv geladene ϵ -NH₃⁺-Gruppen. Hierdurch wird die elektrostatische Interaktion zwischen dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA und den Histonen verstärkt (Nakatani, 2001). Dies führt zu einer verminderten Akzessibilität der DNA sowohl für spezielle Transkriptionsfaktoren als auch für die basale Transkriptionsmaschinerie (Wang et al., 2007a).
- 2) Ablösen von Transkriptions-fördernden Proteinen mit Bromodomäne (*trans*-aktiver Mechanismus) (Jeanmougin et al., 1997): Die verminderte Fähigkeit von desacetylierten Histonen, Proteine mit Bromodomäne („Acetyl-Histon-Lese-Domäne“) zu binden, führt zu einer verminderten Transkription. Proteine mit

Bromodomänen fördern die Transkription durch verschiedene Mechanismen: ATP-abhängige Chromatin-*Remodeling*-Komplexe erhöhen die Akzessibilität der DNA für Proteine, welche für die Transkription benötigt werden. Transkriptionelle Coaktivatoren und Mediatoren besitzen ebenfalls Bromodomänen. Des Weiteren besitzen Histon-Acetyltransferasen selbst eine Bromodomäne und erhöhen die Histon-Acetylierung über eine positive Rückkopplungsschleife (Berger, 2002; Wang et al., 2007a, b).

HDACs der Klasse I spielen bei der Genregulation eine besonders große Rolle und agieren in Multiproteinkomplexen mit bekannten Repressoren der Transkription wie Sin3, RCOR (*Repressor element 1-silencing transcription factor corepressor*) oder NCOR (*Nuclear receptor corepressor*), welche die Aktivität der HDACs weiter verstärken (Grozinger and Schreiber, 2002; Huang et al., 1999; Witt et al., 2009; Yang and Seto, 2008; You et al., 2001) und Transrepressoren rekrutieren (Ayer et al., 1995). Zudem binden sie DNA-Methyltransferasen (DNMTs), welche CpG-Inseln in Promotor-Regionen hypermethylieren und damit die Stilllegung eines Gens manifestieren (Robertson et al., 2000; Rountree et al., 2000).

Histon-Desacetylierung, die fehlende Bindung von Transkriptions-fördernden Proteinen mit Bromodomänen und die DNA-Methylierung begünstigen und fördern sich gegenseitig und führen gemeinsam zur Stilllegung der Genexpression (Deaton and Bird, 2011; Jones and Baylin, 2002; Kouzarides, 2007).

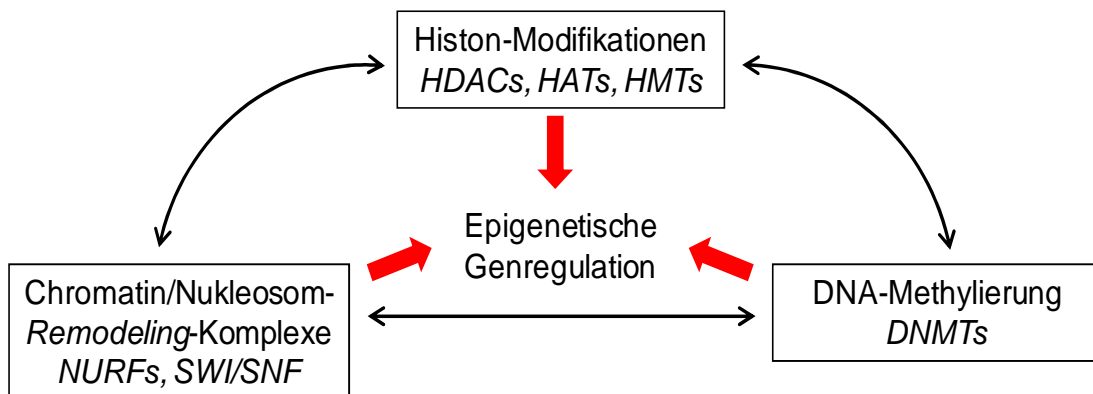


Abb. 6: Zusammenspiel von DNA-Methylierung, kovalenten Histon-Modifikationen und Chromatin-*Remodeling* bei der epigenetischen Regulation der Genexpression. Alle drei Prozesse kooperieren konzertiert und begünstigen sich gegenseitig.

2.4.2 Regulation von Nicht-Histon-Proteinen durch HATs und HDACs

Die posttranslationale Acetylierung von Nicht-Histon-Proteinen an ϵ -Aminogruppen von Lysin-Resten beeinflusst mRNA-Stabilität, Translation, Lokalisation, Stabilität und Degradation von Proteinen, sowie Protein-Protein-Interaktionen und die Aktivität von Enzymen und reguliert somit verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Überleben und Apoptose (Kramer et al., 2006; Spange et al., 2009; Xu et al., 2007). Zu den acetylierten Proteinen gehören Transkriptionsfaktoren, Hormon-Rezeptoren, Chaperone, Schlüsselproteine der Signaltransduktion, DNA-Reparatur-Proteine und Proteine des Zytoskeletts (Spange et al., 2009). Diese Proteine und deren Acetylierungsstatus werden ebenfalls durch die veränderte Expression von HDACs und HATs während der malignen Transformation beeinflusst und tragen somit zur Tumorprogression bei (Yang, 2004).

Folgende Tabelle gibt anhand ausgewählter Beispiele die biologischen Auswirkungen der Acetylierung einige Proteine wieder (adaptiert aus Spange et al., 2009):

Biologische Auswirkung	Protein	
	Steigerung	Verminderung
Protein-Stabilität	p53, p73, c-Myc, E2F1	pRB, HIF-1 α
DNA-Bindung	Verstärkung p53, STAT3, E2F1, APEX, p50 und p65 (NF κ B)	Verminderung FEN-1
Gen-expression	Transkriptionelle Aktivierung p53, STAT3, p65 (NF κ B), p73	Transkriptionelle Inaktivierung STAT1, FOXO1, FOXO4
Protein-Interaktion	Verstärkung STAT1, STAT3, TFIIB	Verminderung Ku70, HSP90
Lokalisation	Nukleärer Import PCNA Subnukleäre Lokalisation WRN, PCNA	Nukleärer Export CBP/p300
mRNA-Stabilität	Erhöhung p21	Erniedrigung eNOS
Enzym-Aktivität	Erhöhung p300, ATM	Erniedrigung PTEN, HDAC1, MDM2

Tab. 2: Zielproteine von HDACs und HATs und biologische Bedeutung ihrer Acetylierung.

Die durch Acetylierung ausgelöste Verminderung der Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren erklärt, warum die Überexpression von HATs bzw. die Inhibition von HDACs nicht ausschließlich zur Aktivierung der Transkription führt (Spange et al., 2009).

2.4.3 Desacetylierung, Histondesacetylase-Inhibitoren und Krebs

Genetische und epigenetische Veränderung tragen beide entscheidend zur Tumorentstehung und -progression bei (Jones and Baylin, 2002; Laird, 2005). Mittlerweile sind viele Tumorsuppressorgene und Onkogene, deren abberante Expression durch epigenetische Mechanismen reguliert wird, bekannt (Esteller, 2007).

Die Hypoacetylierung von Tumorsuppressorgenen erfolgt während der malignen Transformation verschiedenster Zelltypen (Baylin and Ohm, 2006; Fraga et al., 2005). In Übereinstimmung hiermit konnte gezeigt werden, dass HDACs beispielsweise in Kolon-, Brust-, Magen-, Pankreas und Prostatakrebs überexprimiert werden (Choi et al., 2001; Halkidou et al., 2004; Weichert et al., 2008a; Wilson et al., 2006; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2004b; Zhu et al., 2004). Eine hohe HDAC-Expression geht häufig mit einer besonders schlechten Prognose einher (Miyake et al., 2008; Rikimaru et al., 2007; Weichert et al., 2008b). Im Umkehrschluss führt die Inhibition von HDACs durch epigenetische Effekte zur Transaktivierung von Tumorsuppressorgenen (s. 2.4.1). Zudem können Histondesacetylase-Inhibitoren (HDACi) durch eine inhibierend wirkende Hyperacetylierung von Transkriptionsfaktoren auch eine Repression von onkogenen Zielgenen auslösen (s. 2.4.2). Es wurde bereits gezeigt, dass HDACi Zellzyklus-Arrest induzieren, Angiogenese inhibieren (Carew et al., 2008; Witt et al., 2009) und selektiv in transformierten Zellen Differenzierung und Zelltod induzieren (Bolden et al., 2006; Gottlicher et al., 2001; Johnstone, 2002; Minucci and Pelicci, 2006; Xu et al., 2007). Sie revertieren damit klassische Kennzeichen der malignen Transformation und sind aus diesen Gründen viel versprechende Zielproteine in der Tumorthherapie.

Der HDACi Suberoylanid-Hydroxamsäure (SAHA, Vorinostat, Zolinza® von Merck) wurde im Oktober 2006 von der FDA zur Mono-Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen (Grant et al., 2007; Khan and La Thangue, 2008). Viele weitere HDACi befinden sich in Phase I und II klinischer Studien zur Therapie von verschiedenen Krebserkrankungen (Carew et al., 2008; Glaser, 2007; Stimson

and La Thangue, 2009). Zudem wurde schon gezeigt, dass sie die Wirksamkeit derzeitig eingesetzter zytotoxischer Agenzien und Chemotherapeutika synergistisch verstärken können. Hierzu gehören beispielsweise der *Heatshock*-Protein-90 (HSP-90) Inhibitor 17-AAG (17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin), der Proteasom-Inhibitor Bortezomib, aber auch ionisierende Strahlung und DNA-schädigende Agenzien wie Cisplatin, Doxorubicin oder Temozolomid (Camphausen et al., 2005; Chen et al., 2011; Kim et al., 2003; Nawrocki et al., 2006; Rahmani et al., 2003; Rikiishi et al., 2007).

Valproinsäure (VPA), ebenfalls ein HDACi, ist ein weit verbreitetes Antikonvulsivum und wird nun in klinischen Studien zur Anwendung als Chemotherapeutikum geprüft. Hierauf wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

2.4.4 Valproinsäure

Valproinsäure (VPA) ist eine kurzkettige Fettsäure und Derivat der Valeriansäure, welche natürlicherweise von Baldrian produziert wird. Valproinsäure wurde erstmals 1881 von B. Burton synthetisiert und mehrere Jahrzehnte lang als „physiologisch inertes“ Lösungsmittel für verschiedenste Pharmaka verwendet. Anfang der 1960er Jahre wurde beobachtet, dass VPA epileptische Anfälle in Nagern vermindert (Lebreton et al., 1964). Seitdem wird sie als Antikonvulsivum zur Behandlung der Epilepsie eingesetzt (s. 2.4.4.1). Göttlicher und Kollegen haben 2001 entdeckt, dass VPA ein Inhibitor der Klasse I-HDACs ist und somit die Genregulation auf epigenetischer Ebene beeinflusst (Göttlicher et al., 2001). Daher wird VPA seit einigen Jahren als Medikament zur epigenetischen Therapie von malignen Neoplasien erprobt (s. 2.4.3 und 2.4.4.2).

2.4.4.1 Einsatz als Antikonvulsivum

Die antikonvulsive Wirkung von VPA beruht auf der Potenzierung des inhibitorischen ZNS-Transmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) durch verschiedene Mechanismen wie z. B. Hemmung der GABA-Degradation und Verstärkung der GABA-Synthese (Mesdjian et al., 1982). Des Weiteren dämpft VPA die Exzitation durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und blockiert verschiedene Na^+ -, Ca^{2+} - und K^+ -Kanäle (VanDongen et al., 1986). Aufgrund dieser Effekte und ihrer guten Verträglichkeit wird Valproinsäure als Mittel der ersten Wahl zur Langzeit-Therapie für generalisierte Formen der Epilepsie eingesetzt. Außerdem zeigt die

Verabreichung von VPA Behandlungserfolge bei weiteren vor allem neurologischen Erkrankungen wie z. B. Depression, Sucht, Migräne und Schizophrenie (Calabrese and Delucchi, 1989; Chateauvieux et al., 2010; McElroy et al., 1989; Smith et al., 2010).

2.4.4.1.1 Nebenwirkungen

Im Allgemeinen ist Valproinsäure sehr gut verträglich. Die häufigsten Nebenwirkungen von in der Epilepsie-Therapie erreichten Serum-Spiegeln (etwa 50 - 120 mg/l, entspricht 0,3 – 0,72 mM) sind laut Packungsbeilage (Valproinsäure ratiopharm Lösung) Thrombozytopenie, Leukopenie, Gewichts- und Appetitveränderungen, Schläfrigkeit, Tremor und Parästhesien. Erst bei hohen Serum-Spiegeln treten schwere neurologische Nebenwirkungen wie Desorientiertheit, Schläfrigkeit und Verwirrtheit sowie hämatologische Veränderungen auf (Atmaca et al., 2007; Daud et al., 2009).

Da die Embryonalentwicklung entscheidend von epigenetischen Mechanismen gesteuert wird, erklärt die Hemmung von HDACs der Klasse I durch VPA dessen teratogene Wirkung (Gottlicher et al., 2001; Jammes et al., 2011).

2.4.4.2 VPA als HDACi in der Krebstherapie

Die Verwendung von Valproinsäure zeigt bei der Therapie von verschiedenen malignen Neoplasien vielversprechende Wirkungen, welche hauptsächlich auf die Inhibition von HDACs zurückzuführen sind (s. 2.4.3).

Im Folgenden wird genauer auf Publikationen eingegangen, welche die Potenzierung von DNA-schädigenden Agenzien durch eine Kombination mit VPA beschreiben.

Chen et al. zeigten eine Potenzierung der durch TMZ-induzierten Apoptose durch Kobehandlung von Glioblastomzellen mit VPA und führen dies auf vermehrten oxidativen Stress zurück (Chen et al., 2011). Vor allem Klinische Studien zur Therapie von hämatologischen Krebserkrankungen zeigten, dass eine VPA-Monotherapie oder Kombinationstherapie mit dem Agenz all-trans-Retinsäure (ATRA) oder Decitabin positive Resultate erzielen (Bug et al., 2005; Garcia-Manero et al., 2006; Inoue et al., 2005; Kuendgen et al., 2006; Kuendgen et al., 2004; Pilatrinio et al., 2005; Raffoux et al., 2005). Die Kombination aus VPA und dem DNA-Methyltransferase (DNMT)-Inhibitor 5-Azacytidin als „epigenetische Therapie“

erwies sich in Klinischen Studien bisher am erfolgreichsten (Soriano et al., 2007; Voso et al., 2009).

Zur Therapie von soliden Krebserkrankungen mit VPA wurden ebenfalls klinische Studien durchgeführt, wobei hier häufig eine Kombination aus VPA und einem oder mehreren DNA-schädigenden Agenzien verabreicht wurde. So führten Münster et al. eine klinische Phase I/II-Studie durch, welche die klinische Relevanz von VPA als HDACi bei der Therapie von soliden Tumoren demonstrierte. Durch die Verabreichung von VPA zusammen mit Epirubicin bzw. mit FEC100 (5-Fluoruracil, Epirubicin und Cyclophosphamid) wurden beachtliche Erfolge bei der Therapie von fortgeschrittenen Tumoren verschiedener Art erzielt. 5 von 15 Brustkrebspatientinnen erfuhren eine Vollremission, 8 Patientinnen zeigten Teilremission (Munster et al., 2009; Munster et al., 2007).

In einer weiteren Klinischen Phase I-Studie wurden Brustkrebspatientinnen einer „epigenetische Vorbehandlung“ mit VPA und dem DNMT-Inhibitor Hydralazin vor der eigentlichen Chemotherapie mit Cyclophosphamid und Doxorubicin unterzogen. Die Gesamtansprechrates betrug 81%, wobei 5 von 15 Patientinnen eine Voll- und 8 Patientinnen Teilremissionen erfuhren (Arce et al., 2006).

Eine klinischen Phase I/II-Studie von Daud et al. galt der Untersuchung einer möglichen Potenzierung der Wirkung des Topoisomerase I-Inhibitors Karenitecin durch eine zusätzliche Verabreichung von VPA bei Patienten mit metastasierendem malignen Melanom (Daud et al., 2009). Bei 47% der Patienten wurde eine Stabilisierung der Erkrankung erreicht. Im Gegensatz hierzu konnte eine Klinische Phase I/II-Studie zur Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Standard-Chemoimmuntherapie aus DTIC und IFN- α bei Patienten mit fortgeschrittenem malignen Melanom keine Potenzierung der Therapie nachweisen (Rocca et al., 2009).

2.5 Zelltod

Um die Homöostase in einem adulten Organismus zu erhalten, muss jede Zellverdopplung mit der Elimination einer anderen Zelle einhergehen. Zudem müssen Zellen, welche ihre Funktion aufgrund (intra)zellulärer Schäden nicht mehr erfüllen können oder eine Gefahr für den Gesamtorganismus darstellen, eliminiert werden. Aufgrund intensiver Forschungsarbeit der letzten Jahrzehnte sind verschiedene Zelltod-Modi entdeckt worden. Zu den Prominentesten gehören die Apoptose, die Nekrose und der Autophagie-assoziierte Zelltod, welche sich sowohl

in ihren spezifischen Auslösern, ihren biochemischen Vorgängen und der zellulären Morphologie deutlich voneinander unterscheiden (Hotchkiss et al., 2009).

Sind durch Chemotherapeutika induzierte DNA-Schäden irreparabel (s. 2.3), stellen diese Schäden einen klassischen Apoptose-Induktor dar (Elmore, 2007; Roos and Kaina, 2006). Zudem determiniert die Fähigkeit einer Tumorzelle, DNA-Schadens-induzierte Apoptose auszulösen, das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie entscheidend. Aufgrund dessen wird im Folgenden die Apoptose genauer beschrieben.

2.5.1 Apoptose

Als Antwort auf das Fehlen trophischer Faktoren oder auf intrazelluläre Schäden aktivieren Zellen ein Suizidprogramm, die Apoptose (Raff, 1992). Sie ist ein hochkonservierter Prozess, welcher bereits bei Protozoen zur Elimination von mit Pathogenen infizierten Zellen dient, um so die Gesamtpopulation zu schützen (Ameisen, 1996).

Die Apoptose ist durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet, die sie von anderen Zelltod-Arten unterscheidet (Castedo et al., 2002; Galluzzi et al., 2007; Kroemer et al., 2005; Kroemer et al., 2007).

Zu den klassischen morphologischen Veränderungen gehören das Schrumpfen der Zellen und des Zellkerns, die Kondensation des Chromatins (Pyknose), gefolgt vom Zerfall des Zellkerns (Karyorrhexis) und das abschließende Abschnüren von apoptotische Körperchen, welche die Zellinhalte umschließen. Die Aktivierung von Caspasen (*Cysteinylnyl aspartic acid-protease*), der Konsum von ATP, die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma, die Exposition des Membran-Phosphoglycerids Phosphatidylserin und nukleosomale Fragmentierung der DNA durch Caspase-aktivierte DNasen (CAD) sind Beispiele für klassische biochemische Merkmale der Apoptose (Gogvadze et al., 2006; Hacker, 2000; Stennicke and Salvesen, 1998; Wyllie, 1980), welche allerdings nicht alle notwendigerweise gemeinsam auftreten müssen. In der Regel wird durch Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen und Phagozytose der apoptotischen Körperchen eine Entzündungsreaktion unterbunden (Kerr et al., 1972; Kurosaka et al., 2003; Savill and Fadok, 2000).

Bei vielen Entwicklungsprozessen ist die Apoptose ein physiologischer Vorgang. Hierzu gehört beispielsweise die Entwicklung des Nervensystems, bei dem überschüssig produzierte Neuronen durch Apoptose beseitigt werden (Nijhawan et

al., 2000). Allerdings liegt der Deregulation der Apoptose auch der Pathophysiologie einiger Erkrankungen zu Grunde. So ist die Unfähigkeit einer Zelle, Apoptose zu induzieren, ein bedeutendes Malignitätsmerkmal und mit dem Scheitern der Chemotherapie assoziiert (Elmore, 2007). Das Gegenteil, die exzessive Induktion der Apoptose, ist beispielsweise Grundlage verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz (Elmore, 2007; Ethell and Buhler, 2003). In Säugern unterscheidet man zwei klassische Apoptose-induzierende Signalwege: den intrinsischen (mitochondrialen) und den extrinsischen (Rezeptor-) Signalweg. Aufgrund der Bedeutung dieser beiden Signalkaskaden für die Responsivität von Tumorzellen auf eine Chemotherapie und die zahlreichen Resistenz-vermittelnden Modifikationen ihrer Schlüsselkomponenten sollen diese beiden Signalkaskaden im Folgenden genauer vorgestellt werden.

2.5.1.1 Extrinsischer Signalweg

Bei der Induktion von Apoptose über den intrinsischen Signalweg werden so genannte Todes-Rezeptoren (DR, *Death receptor*), Transmembranrezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Superfamilie, aktiviert (Locksley et al., 2001). Ihre Liganden werden entweder para- oder autokrin sezerniert oder sind in der Zellmembran von z. B. zytotoxischen T-Zellen verankert. Anhand des am besten charakterisierten Rezeptor-Liganden-Paares, FAS (CD95, Apo-1) und FASLG, wird im Folgenden die Signalkaskade genauer beschrieben.

Nach Bindung des trimeren Liganden kommt es zur Aggregation der Rezeptoren, welche nun über ihre intrazelluläre Todesdomäne (*Death domain*) das Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain*) rekrutieren (Ashkenazi and Dixit, 1998). FADD dimerisiert durch Interaktion der Todeseffektor-Domänen (DED, *Death effector domain*) beider Proteine mit Procaspase-8 und komplettiert so den so genannten DISC (*Death-inducing signalling complex*) (Kischkel et al., 1995). Durch die so ermöglichte Dimerisierung der Procaspase-8 erfolgt die aktivierende Autoproteolyse dieser als Zymogen vorliegenden Initiator-Caspase (Ashkenazi and Dixit, 1998; Nicholson, 1999). Die Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 mittels proteolytischer Spaltung durch Caspase-8 initiiert die Exekution der Apoptose, worauf in Kapitel 2.5.1.3 genauer eingegangen wird.

Durch die Spaltung von BID zu tBID (*truncated BID*) kann der extrinsische Signalweg auf den intrinsischen koppeln und so die apoptotische Antwort amplifizieren (Li et al., 1998a). tBID transloziert zu den Mitochondrien und fördert dort die Homooligomerisierung von Bax und Bak und damit die Permeabilisierung

der Mitochondrien-Membran (Kim et al., 2006; Ren et al., 2010; Wei et al., 2001; Willis et al., 2007), welche der kritische Schritt des intrinsischen Apoptose-Signalwegs ist (s. 2.5.1.2).

O⁶-Methylguanin und andere DNA-Schäden können zu einer Aktivierung des extrinsischen Signalwegs führen (Roos and Kaina, 2012). In diesem Zusammenhang wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass sowohl in Lymphozyten als auch in Glioblastom- und Melanomzellen die Induktion von Apoptose durch O⁶-methylierende Agenzien (s. 2.2.1) stark von der Funktionsfähigkeit des extrinsischen Signalwegs abhängt (Roos et al., 2004; Roos et al., 2007; Roos et al., 2011). Die Deregulation von Komponenten des extrinsischen Signalwegs trägt somit zur Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Chemotherapeutika bei.

2.5.1.2 Intrinsischer Signalweg

Todesrezeptor-unabhängige Stimuli wie die Depletion von Wachstumsfaktoren, ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Stress, DNA-Schäden oder Zytokine können den intrinsischen Apoptose-Signalweg, der wegen der zentralen Rolle der Mitochondrien auch mitochondrialer Signalweg genannt wird, auslösen (Joza et al., 2002). Diese Stimuli beeinflussen die Anfälligkeit von Zellen gegenüber Apoptose, indem sie u. a. das zytoplasmatische Verhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen der BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familie und deren subzelluläre Lokalisation beeinflussen (Cory and Adams, 2002). Das namensgebende Kennzeichen des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, *Mitochondria outer membrane permeabilisation*) durch noch nicht vollständig verstandene Mechanismen (Chipuk et al., 2006). Hierbei spielen die proapoptotischen BCL-2-Proteine BAK und BAX eine wichtige Rolle. Ein Modell schlägt vor, dass BAK- und BAX-Oligomere Poren innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran bilden (Chipuk et al., 2006; Javadov and Karmazyn, 2007). In einem zweiten Modell fördert BAX die Öffnung der Permeabilitäts-Transitions-Pore (PTP), einem Kanal bestehend aus VDAC (*Voltage-dependent anion channel*), CYPD (*Cyclophilin D*) und ANT (*Adenine nucleotide translocator*), welcher eigentlich dem transmembranösen Transport von Nukleotiden und anderen kleinen Molekülen dient (Crompton, 1999; Shimizu et al., 1999; Shimizu et al., 2000; Vairo et al., 2000). BAX und BAK lösen so den Verlust des Membranpotenzials und die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum aus (Saelens et al., 2004).

Name	Funktion
Cytochrom c	Assemblierung des Apoptosoms
Smac/DIABLO*	Inhibition von IAPs (<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>)
HtrA2/Omi**	Inhibition von IAPs (<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>)
AIF***	Chromatin-Kondensation (Stadium I), Rekrutierung von Endonukleasen
Endonuklease G	Oligonukleosomale DNA-Fragmentierung
CAD****	Chromatin-Kondensation (Stadium II), DNA-Fragmentierung

Tab. 3: Während der Apoptose freigesetzte mitochondriale Proteine und ihre Funktionen. **Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low isoelectric point*, ***High temperature requirement A2/ serine protease Omi protein A2*, ****Apoptosis inducing factor*, *****Caspase-activated DNase*

Diese hierbei freigesetzten Proteine und ihre Funktionen werden in der folgenden Tabelle aufgeführt (Elmore, 2007):

Analog zum DISC beim extrinsischen Apoptose-Signalweg ist die molekulare Plattform zur Initiation der Caspase-Kaskade beim intrinsischen Signalweg das Apoptosom (Rodriguez and Lazebnik, 1999; Wang, 2001). Voraussetzung für seine Assemblierung ist die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol, welches an APAF-1 bindet und dessen Speichen-förmige, heptamere, dATP-abhängige Oligomerisierung induziert. APAF-1 rekrutiert über seine N-terminale CARD (*Caspase recruitment domain*) die Initiator-Caspase des intrinsischen Signalwegs, die Procaspase-9. Sie liegt, wie die anderen Caspasen auch, als Zymogen vor und wird durch autoproteolytische Prozessierung aktiviert (Srinivasula et al., 1998; Wang, 2001). Nun initiiert Caspase-9 die Exekution der Apoptose durch Aktivierung der Effektor-Caspasen -3, -6 und -7 (s. 2.5.1.3) (Elmore, 2007).

Der mitochondriale Apoptose-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Elimination von Zellen mit irreparablen DNA-Schäden (Bitomsky and Hofmann, 2009; Roos and Kaina, 2006). Durch die DNA-Schadensantwort wird p53 aktiviert, welches durch direkte Protein-Protein-Interaktion oder durch Transaktivierung von Genen wie *Bax* und *Apaf-1* starken Einfluss auf den intrinsischen Signalweg nimmt (Hakem et al., 1998; Jeffers et al., 2003; Michalak et al., 2005; Youle and Strasser, 2008).

2.5.1.3 Exekution der Apoptose

Nach Aktivierung der als Dimer vorliegenden Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 mittels proteolytischer Prozessierung durch die Initiator-Caspasen-9, -8 und -10 spalten diese spezifische Zielproteine und führen so zu den typischen biochemischen und morphologischen Merkmalen der Apoptose (s. 2.5.1) (Elmore, 2007; Salvesen and Riedl, 2008). Die Aktivität von Effektor-Caspasen kann beispielsweise durch die Bindung von IAPs oder die Phosphorylierung durch AKT negativ reguliert werden (Cardone et al., 1998; Yang and Li, 2000). Effektor-Caspasen spalten eine Vielzahl von Proteinen, welche hierdurch aktiviert oder inaktiviert werden können. Proteine, welche für die strukturelle Integrität der Zelle verantwortlich sind und durch Caspasen inaktiviert werden, sind z. B. Vimentin, Plectin und Gelsolin. Ihre Spaltung geht mit dem Verlust der Zellintegrität und –morphologie einher (Ho and Hawkins, 2005; Lamkanfi et al., 2007). Die Spaltung des Inhibitors von CAD (ICAD) initiiert die nukleäre Translokation von CAD und damit die Fragmentierung der DNA. Weitere Proteine, die typischerweise während der Apoptose durch Caspasen gespalten werden, sind das DNA-Reparaturprotein PARP und der Zellzyklusregulator p21 (Ho and Hawkins, 2005; Lamkanfi et al., 2007).

2.5.2 Nekrose

Der nekrotische Zelltod wird primär als passive Reaktion auf eine traumatische Schädigung von Zellen oder Geweben, welche ohne den Konsum von ATP stattfindet, angesehen. Ob eine Zelle durch Nekrose oder einen anderen Zelltodmechanismus stirbt, hängt auch stark von der Art des Zelltodsignals, dem Gewebetyp, dem Entwicklungsstadium und dem physiologischen Kontext ab. Klassische Nekrose-Auslöser sind die Schädigung der Zellmembran, massiver DNA-Schaden und die Störung der Energieversorgung der Zelle (Jagtap and Szabo, 2005).

Typische morphologische Merkmale sind das Anschwellen der Zellen, Karyolyse, Pyknose, Karyorrhesis und die Zerstörung der Zellmembran, begleitet von der Freisetzung des Zytoplasmas in das umgebende Gewebe und einer inflammatorischen Reaktion (Searle et al., 1982; Wyllie et al., 1980). Biochemische Merkmale sind das Ansteigen der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration und Reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS), das Absinken des zellulären pH-Wertes und ATP-Depletion (Golstein and Kroemer, 2007).

In den letzten Jahren wurde entdeckt, dass die Nekrose, wie die Apoptose auch, kontrolliert verlaufen kann. So spielt die Kinase RIPK1 (*Receptor-interacting serine threonine kinase 1*) bei gleichzeitiger Inhibition von Caspasen eine essentielle Rolle bei der Induktion von Nekrose als Antwort auf die Stimulation von Rezeptoren der TNF-Superfamilie (Christofferson and Yuan, 2010; Moquin and Chan, 2010). Auch bei der Nekrose-Induktion durch massiven DNA-Schaden ist RIPK1 ein zentrales Protein. RIPK1 erkennt die hierbei ausgelöste Hyperaktivierung von PARP1 (z. B. durch DSB), welche ATP-Depletion und irreversible Beeinträchtigung des Energiehaushalts zur Folge hat (Jagtap and Szabo, 2005).

2.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit metastasierendem malignem Melanom beträgt nur 6 Monate. Sie kann aufgrund der hohen intrinsischen Resistenz der Tumore durch Chemotherapie kaum verlängert werden. Die der Zytostatika-Resistenz zugrunde liegenden Mechanismen sind weitgehend unbekannt.

Um den Therapieerfolg zu erhöhen ist es daher dringend erforderlich, die molekularen Grundlagen der Resistenz aufzuklären und neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

Das methylierende Agenz TMZ und das CNU-Derivat FM werden häufig bei der Therapie des metastasierenden malignen Melanoms eingesetzt. In der folgenden Arbeit sollen zelluläre Parameter, welche die Resistenz gegenüber dem ICL-induzierenden Agenz Fotemustin vermitteln, identifiziert werden. Hierzu sollen vier Melanom-Zelllinien (D05-Mel, D14-Mel, A375 und RPMI-7951) bezüglich einer Korrelation zwischen p53, welches in Melanomen *selten* mutiert ist, und dem Ansprechen auf die Alkylanzien-Behandlung untersucht werden. Ferner ist beabsichtigt, den Einfluss von FM auf die Expression von DNA-Reparatur-Genen, welche in der Reparatur von FM-induzierten DNA-Schäden involviert sein könnten, zu analysieren. Die Rolle potenzieller Kandidatengene soll anschließend mithilfe von RNA-Interferenz verifiziert werden. Die *in vitro* gewonnenen Daten sollen in einem translationalen Ansatz auf das Mausmodell übertragen werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit Möglichkeiten zur Sensitivierung von Melanomzellen gegenüber Alkylanzien. Die zugrunde liegende Arbeitshypothese beruht auf den Tatsachen, dass Krebszellen im Laufe ihrer Entwicklung Tumorsuppressorgene epigenetisch stilllegen (*epigenetic silencing*) und in der

Literatur bereits Wirkungs-potenzierende Effekte von HDACi auf DNA-schädigende Agenzien beschrieben wurden. Hierbei soll untersucht werden, ob der in der Epilepsie-Therapie eingesetzte und gut verträgliche Wirkstoff VPA, welcher ein HDAC-Inhibitor ist, menschliche maligne Melanom-Zelllinien gegenüber Temozolomid und Fotemustin sensitiviert.

An den Zelllinien D05-Mel, D14-Mel, A375 und RPMI-7951 soll ein möglicher sensitivierender Effekt von VPA gegenüber den beiden Alkylanzien untersucht werden. Hierbei ist von Interesse, ob die Sensitivierung, ausgelöst durch die VPA-Behandlung, verstärkt zur Induktion von Apoptose oder Nekrose führt. Darauf folgende Versuche dienen der Identifikation Sensitivierungs-vermittelnder Parameter wie Regulation von Zellzyklus und Apoptose. So soll analysiert werden, ob VPA Zellzyklusverteilung oder Verdopplungszeit der Zellen beeinflusst und so sensitivierend wirkt. Des Weiteren soll untersucht werden, ob der FAS (CD95, Apo-1)-abhängige extrinsische Apoptose-Signalweg in der Sensitivierung involviert ist. Mögliche durch VPA regulierte Gene, deren Regulation Resistenz und Sensitivität beeinflussen könnten, sollen mithilfe eines PCR-Arrays identifiziert werden.

3 Material

3.1 Geräte und Hilfsmittel

Blot-Kammer, Trans Blot Cell	Bio-Rad, München
Blot-Kammer, Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank	
Hera Cell 150 für Säugerzellen	Heraeus, Hanau
Typ B für Bakterien	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Einfrierbox, Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Elektrophoreseapparaturen	
Agarosegel~, Wide Mini-Sub Cell	Bio-Rad, München
SDS-PAGE~, Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, München
Comet Assay~, 41-2025	Peqlab, Erlangen
Entwicklungskassette	Appligene, Heidelberg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Flüssigszintillationszähler, TriCarb 2100TR	Canberra Packard Central Europe, Schwadorf, Österreich
Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- 80 °C, Forma 905	
- 20°C, Premium NoFrost	Liebherr, Ochsenhausen
Heizblock, Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Infrarot-Abbildungsanlage, Odyssey	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Magnetrührer, MR 2000	Heidolph, Schwabach
Mikroplatten Leser, Sunrise RC TS/TW	Tecan, Crailsheim
Mikroskope	Zeiss, Jena
Axiovert 35	Olympus, Hamburg
BX 50	Nikon, Düsseldorf
Microphot-FXA	Zeiss, Jena
Telaval 31	Zeiss, Jena
Wilovert A	Hund, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Geräte	
My Cycler Thermal Cycler	Bio-Rad, München

MyiQ Single Color RealTime PCR Detection System	Bio-Rad, München
pH-Meter, pH525	WTW, Weilheim
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, Pipetman (P10, P20, P200, P1000)	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe, Pipetboy acu	IBS, Fernwald
Proteintransferkammer, Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Schüttelinkubator	Braun Biotech. Int., Melsungen
Schwingmühle	TissueLyser, Retsch, Haan
Spannungsquellen	
200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, München
Power Pac 200/300	Bio-Rad, München
Spektrophotometer, Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Sterilbänke	
CLASSII A/B3, NUAIR	Zapf, Sarstedt
Hera safe	Heraeus, Hanau
Transilluminator, InGenius	Syngene, Cambridge, UK
Überkopfschüttler, Eigenbau	Werkstatt, Universitätsmedizin, Mainz
Ultraschallbad, Sonorex RK102P	Bandelin, Berlin
Ultraschallstab, Sonifier Cell Disruptor B15	Branson, Dietzenbach
UV-C-Quelle NSE 11-270	Philips, Hamburg
Vakuumpumpe N022 AN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Vortexer, Vortex Genie	Bender & Hobein, Gera
Wasserbad, 3044	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Wippschüttler, Certomat TC2	Braun, Melsungen
Zentrifugen	
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge, DW41	Qualitron, Korea
Tischzentrifuge, Galaxy Mini	Merck Eurolab, Darmstadt
Zelltank (N ₂) Locator 6+	Thermo Fisher Scientific, Waltham

3.2 Chemikalien

2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazinyl)-	Sigma-Aldrich, Steinheim
---------------------------------------	--------------------------

Ethansulfonsäure (HEPES)	
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (AA/BA) 40%	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
para-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entwicklerlösung	Kodak GBX, Rochester, USA
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (1%, 10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Fixiererlösung	Kodak GBX, Rochester, USA
Glycerin ~87%	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Luminol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (MeOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat dibasisch Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS-Salzmischung	Biochrom, Berlin
Polyethylenglykol 400 (PEG)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete™	Roche, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe

Szintillationslösung, Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris Base)	Roth, Karlsruhe
Tween 20 (Polysorbat 20)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe

3.3 Verbrauchsmaterialien

6/24/48/96-Loch-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Chemilumineszenz-Filme	GE Healthcare, München
Deckgläser 24x50 mm	Diagonal, Münster
Durchflusszytometer-Analysenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen	Norm-Ject, Tuttlingen
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrozellulose-Membran Protran®	Whatman, Dassel
Objektträger	Diagonal, Münster
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml) MultiUltra Tubes	Roth, Karlsruhe
PCR-Platten, 96-Loch	Bio-Rad, München
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, Tip One, gestopft, repellierend	Star Lab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße 15 ml + 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml + 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzenfilter, Rotilabo 0,45 µM	Roth, Karlsruhe
Transferpapier (1 mm)	Roth, Karlsruhe
Zellkultur-Schalen und -Flaschen, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.4 Kits, Assays und gebrauchsfertige Mixe

Effectene® Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Mykoplasmen-Detektionskit (PCR-basiert)	Minerva Biolabs, Berlin

Nucleobond AX 100	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin® RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Roti Load 4 x (SDS-Ladepuffer)	Roth, Karlsruhe
SYBR®GreenER™ qPCR SuperMix for iCycler®	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Pol Master Mix RED	Biomol, Hamburg
Verso cDNA Kit	ABgene, Hamburg

Die Anwendung der aufgelisteten Systeme fand, falls nicht gesondert vermerkt, nach Angaben des Herstellers statt.

3.5 Inhibitoren, Aktivatoren und biologische Substanzen

Agar (Pulver)	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
AnnexinV-FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kalbsthymus-DNA (³ H-markiert)	Sigma-Aldrich, Steinheim
LB-Medium, Pulver	Roth, Karlsruhe
<i>Low melting point</i> (LMP)- Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Milchpulver	Frema Reform, Granovita
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
O ⁶ -Benzylguanin (O ⁶ BG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase Inhibitor cocktail Complete™	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Valproinsäure (VPA)	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.6 Chemotherapeutika/Gentoxische Substanzen

[³ H]-Methyl-N-Nitrosoharnstoff ([³ H]-MNU)	GE Healthcare, München
Fotemustin (Muphoran®)	Servier Research International, Neuilly-sur- Seine, Frankreich
<i>1-(2-chloroethyl)-3-(1-diethoxyphosphorylethyl)-1-nitrosourea</i> (IUPAC-Nomenklatur)	
Temozolomid (Temodar®)	Schering-Plough, München
<i>3-methyl-4-oxoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxamide</i> (IUPAC-Nomenklatur)	

3.7 Puffer und Lösungen

Es folgt eine Auflistung aller verwendeten Puffer und Lösungen. Falls nicht besonders vermerkt, wurden diese in ddH₂O angesetzt.

Agarose-Gellösung	1 – 3% Agarose 90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM EDTA 0,7 µg/ml Ethidiumbromid
Annexinbindepuffer	10 mM HEPES 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ 0,1% BSA pH 7,4
APS-Lösung 10% (w/v)	1 g APS ad 10 ml H ₂ O
Bradford-Reagenz	8,5% Phosphorsäure, 4,75% Ethanol, 1% Coomassie blue G250 (anschließend gefiltert)
BSA-Blocklösung	5% BSA 20 mM Tris 137 mM NaCl 0,1% Tween pH 7,6
Chemilumineszenz-Lösung	0,1 M Tris, pH 8,5 1,25 µM Luminol 200 mM para-Cumarsäure 0,15 ‰ H ₂ O ₂
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO
Elektrophorese-Puffer (ICL <i>Comet Assay</i>)	300 mM NaOH 1 mM EDTA pH >13
DTT Stammlösung 1 M Fraktionierungspuffer A	154,25 mg ad 1 ml H ₂ O 10 mM HEPES-KOH pH 7,4 100 µM EDTA 1 mM EGTA 250 mM Sucrose frisch hinzugegeben: 10 µM DDT 0,5 mM PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 x Proteinase inhibitor cocktail Complete™
Fraktionierungspuffer B und Lysepuffer für für Gesamtzellextrakte	20 mM Tris-HCl pH 8,5 1 mM EDTA 1 mM β-Mercaptoethanol 5% Glycerol frisch hinzugegeben: 10 µM DDT 0,5 mM PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄

Material

Lysepuffer ICL <i>Comet</i> Assay	1 x Proteinase Inhibitor Cocktail Complete™ 2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris pH 10, frisch hinzugegeben: 1% TritonX-100 10% DMSO
Milch-Blocklösung	5% Milchpulver 20 mM Tris 137 mM NaCl 0,1% Tween pH 7,6
Natriumfluorid Stammlösung 500 mM Natriumorthovanadat Stammlösung 200 mM Neutralisations-Puffer (ICL <i>Comet</i> Assay) PMSF Stammlösung 200 mM Ponceau S-Lösung	20,95 mg ad 1 ml H ₂ O 36,78 mg ad 1 ml H ₂ O 0,4 M Tris pH 7,5 34,84 mg ad 1 ml Isopropanol 0,1% Ponceau 5% CH ₃ COOH
Propidiumiodid-Lösung Reaktionspuffer MGMT-Assay	50 µg/ml in ddH ₂ O 70 mM HEPES-KOH, pH 7,8 1 mM DTT 5 mM EDTA
SDS-PAGE-Puffer	50 mM Tris 384 mM Glycin 0,1% SDS
SDS-PAGE Sammelgel (4%)	4,4 ml ddH ₂ O 0,76 ml Tris-HCl (pH 6,8) 60 µl SDS 0,76 ml AA/BA (40%) 60 µl APS (10%) 6 µl TEMED
SDS-PAGE Trenngel	(5%) (7,5%) (10%) (12%) (15%) (7,2) (6,5) (5,7) (5,1) (4,3) ml ddH ₂ O 3 ml Tris-HCl (pH 8,8) 120 µl SDS (10%) (1,5) (2,3) (3,0) (3,6) (4,5) ml AA/BA (40%) 60 µl APS (10%) 6 µl TEMED
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)	10 mM Tris-Cl, pH 8 1 mM EDTA
Transferpuffer	50 mM Tris 384 mM Glycin 20% Methanol
TBE-(Tris-Borat-EDTA)-Puffer (5x)	450 mM Tris 450 mM Borsäure 6,25 mM EDTA
TBS-T (Tris-gepufferte Salzlösung)	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween-20
Zelllyse-Puffer (ICL <i>Comet</i> Assay)	2,5 M NaCl

Zellysepuffer für Gesamtzellextrakte
und MGMT-Aktivitätstest

100 mM EDTA
10 mM Tris
1% Na-Laurylsarcosinat
1% Triton X100
10% DMSO
pH 10
20 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
1 mM β -Mercaptoethanol
5% Glycerin
100 mM PMSF
pH 8,5

3.8 Zellen

3.8.1 Bakterien

Escherichia coli (*E. coli*) Stamm DH-5 α

Kompetente DH5- α dankend erhalten von D. Aasland.

3.8.2 Säugerzellen

Zelllinie	Zelltyp	p53-Status	Herkunft	Medium
A375	malignes Melanom	wt	ATCC	DMEM + 10% FCS
A375 empty ²	s. A375	wt	s. A375	s. A375, + 10 μ g/ml Puromycin
A375 shXPC	s. A375	wt	s. A375	s. A375, + 10 μ g/ml Puromycin
D05-Mel ¹	malignes Melanom	wt	Primärtumor	RPMI + 10% FCS
D05 DNFADD ²	s. D05	wt	s. D05	RPMI + 10% FCS
D05 shp53 ²	s. D05	wt	s. D05	s. D05, + 2,2 μ g/ml Puromycin
D05 empty ²	s. D05	wt	s. D05	s. D05, + 2,2 μ g/ml Puromycin
D14-Mel ¹	malignes Melanom	mt	Primärtumor	RPMI + 10% FCS
G361	malignes Melanom	wt	ATCC	McCoy's 5A +

				10% FCS
Malme-3M	malignes Melanom	wt	ATCC	DMEM + 20% FCS
RPMI-7951	malignes Melanom (Lymphknoten- metastase)	mt	DSMZ	RPMI + 10% FCS

¹ Zellen wurden von Prof. C.W. Schmidt (Institute of Medical Research, Australien) bzw. von Prof. T. Wölfel (Institut für Hämatologie/Onkologie; Mainz) zur Verfügung gestellt.

² Zellen dankend erhalten von Dr. Wynand Roos

3.9 Wachstumsmedien und Zellkulturlösungen

3.9.1 Wachstumsmedien, Zellkulturlösungen, Antibiotika und Selektionsantibiotika für Säugerzellen

DMEM, High Glucose, mit Glutamin	GBO, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
G418	Biochrom AG, Berlin
McCoy's 5A Medium	Lonza, Basel, Schweiz
MykoKill	PAA, Cölbe
Penicillin (10 U/µl)/Streptomycin (10 µg/µl)	PAA, Cölbe
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI 1640-Medium	GBO, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA, Cölbe

3.9.2 Wachstumsmedien und Kulturlösungen für Bakterien

LB-Medium	25g/l LB-Medium (Pulver)
LB-Agar-Lösung	25 g/l LB-Medium (Pulver)
	15 g/l Agar

LB-Medium und LB-Agar wurden autoklaviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml).

3.10 Nukleinsäuren und Nukleotide

3.10.1 DNA-Oligonukleotide (Primer)

Primer für die Reverse Transkription (RT)-Polymerasekettenreaktion (PCR)

RT-PCR-Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg, bezogen. Sie wurden bei – 20°C gelagert.

Name	Sequenz
<i>BRCA1</i> -up	5'-GAGGAGATGTGGTCAATGGAAG-3'
<i>BRCA1</i> -low	5'-GGGTATCAGGTAGGTGTCCAGC-3'
<i>DDB2</i> -up	5'-GGGGCTCCAGCAGTCCTTTTT-3'
<i>DDB2</i> -low	5'-GGGCCACATGCGTCACTTTCTTTT-3'
<i>ERCC1</i> -up	5'-AGGGCCGCCAGCAAGGAAGAAAT-3'
<i>ERCC1</i> -low	5'-TGCAGTCGGCCAGGATACACAT-3'
<i>GADD45A</i> -up	5'-CCGAAAGGATGGATAAGGTG-3'
<i>GADD45A</i> -low	5'-TTCCCGGCAAAAACAAATAA-3'
<i>GAPDH</i> -up	5'-CCCCTCTGGAAAGCTGTGGCGTGAT-3'
<i>GAPDH</i> -low	5'-GGTGAAGAGTCGGAGTTGCTGTTGA-3'
<i>XPA</i> -up	5'-ATGCGAAGAATGTGGCAAAG-3'
<i>XPA</i> -low	5'-TCACCGCATTGTGAATGATG-3'
<i>XPB</i> -up	5'-ACCGGGAATATGTGGCAATCAAAA-3'
<i>XPB</i> -low	5'-AAACGCCAAGTCTTCCTCCTCCAT -3'
<i>XPC</i> -up	5'-CTTTGATTTCCATGGCGGCTACTC-3'
<i>XPC</i> -low	5'-GCTGCTGCTTTCTTTCCCTTTTG -3'
<i>XPD</i> -up	5'-GACCCGGGAGGATATTGCTGTGAT-3'
<i>XPD</i> -low	5'-ACCATGAGGCCGTAGTCCGTCTTG-3'
<i>XPF</i> -up	5'-TCCCGTGCTTCTGATTGAGTTTGA-3'
<i>XPF</i> -low	5'-AGGGCTGCTAATTCTGCGATGTTT-3'
<i>XPG</i> -up	5'-AAGAAGCAGCAGCCAGCGAAATAG-3'
<i>XPG</i> -low	5'-AAACACAGATCTGGCGGTCACGAG-3'

Primer für die Echtzeit-PCR (*Real-time PCR*)

Die Primer für die Echtzeit-PCR wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Für PCR-Arrays wurde die entsprechende Primerlösung maschinell durch Sigma-Aldrich in 96-Loch Platten vorgelegt. Die unten aufgelisteten Gene *XPF* und *XPG* befanden sich nicht auf dem PCR-Array. Die Lagerung erfolgte bei - 20°C.

Gen**	up (5' - 3')	low (5' - 3')
<i>ACTB</i>	TGGCATCCACGAACTACC	GTGTTGGCGTACAGGTCTT
<i>APEX1</i>	AGGATTAGATTGGGTAAAGGA	GCTGGTAGTTTGTCTCTG
<i>ATM</i>	CAAGATGTTTCATAGAGTT	TGAGGAAGATAGTAAGAG
<i>ATG</i>	AGGACAATATAAGGCTTCAA	TTCCAACAATCCACTCTC
<i>ATG7</i>	GAACCTCAGTGAATGTATG	AACCTTGTTCCAAGTCTAA

Material

<i>BIRC3</i>	TGGTAATGAGATGTGATG	GTAAAGAGGTTCTGAGTC
<i>BCL2</i>	CGACTCCTGATTCATTGG	TCTACTTCCTCTGTGATGT
<i>BAX</i>	ATCAGATGTGGTCTATAATG	CAGAAGGCACTAATCAAG
<i>BECN1</i>	GGATGGAAGGGTCTAAGA	CTGTGGTAAGTAATGGAG
<i>BID</i>	GAAGACAGGCTGGAAGATA	GTGTGGATGATATGAAGGC
<i>BRCA1</i>	AAGACTTCTACAGAGTGAA	CAGTTCCAAGGTTAGAGA
<i>BRCA2</i>	AACAACAATTACGAACCAA	AACATTCCTTCCTAAGTCTA
<i>CASP2</i>	GAGAGAAAGAACTGGAATT	TCTGGTCACATAGAACAT
<i>CD44</i>	GGACCAATTACCATAACTATT	AGGATTCGTTCTGTATTCT
<i>CDC25A</i>	GTGAAGAACAACAGTAATC	TGAGGTAGGGAATGTATT
<i>CDC25B</i>	CGTGACCTTGATTGAGTT	TCCCGGAAGTTTGCTAAA
<i>CXCR4</i>	GCCTTACTACATTGGGAT	ACAGTGTTCTCAAACCTCA
<i>CHEK1</i>	CCACCTCTTCATAACAACAA	TAAATCACAATCGCCACTC
<i>CHEK2</i>	GCACTGTCTACTAAGCAGAAAT	AGGCACCACTTCCAAGAG
<i>CCNA1</i>	ATTTCAACACAGTTTCCC	CAGCATATTCAGTCACATT
<i>CCNB1</i>	CCTTCGGAGAGCATCTAA	CATAGTTAGTTCCATCAGGTATT
<i>CCNE1</i>	GCAAATAGAGAGGAAGTC	ATTAACCAATCCAGAAGAAT
<i>CDKN1A</i>	TACATCTTCTGCCTTAGT	TCTTAGGAACCTCTCATT
<i>CDKN1B</i>	ACAGCTCGAATTAAGAATA	CTTATACAGGATGTCCATT
<i>CYP1A1</i>	CTGCTTAGCCTAGTCAAC	GGTAGGTAGCGAAGAATAG
<i>CYP1B1</i>	TCCGTCCCCATCCCAATC	CCTCACTGGAAGCTTTAACT
<i>DDB2</i>	TTTAACCCTCTCAATACCA	CTACTAGCAGACACATCC
<i>DDIT3</i>	ACTGAGCGTATCATGTTAA	CAGGTGTGGTGTATGTATG
<i>ERCC1</i>	AGGAAGAAATTTGTGATAC	TGTGTAGATCGGAATAAG
<i>FANCC</i>	AGATGTATGAAGCCTTGAA	AGACAACATAAGCACCAT
<i>FAS</i>	TTATCTGATGTTGACTTGAGTAA	GGCTTCATTGACACCATT
<i>FASLG</i>	CAATCTTACCAGTGCTGAT	AATCCCAAAGTGCTTCTC
<i>FOS</i>	TCAGTGGAACCTGTCAAGA	TGGATGATGCTGGGAACA
<i>FEN1</i>	CGGGAGAATGACATCAAG	AACAGCAATCAGGAACTG
<i>GPX1</i>	GCCAAGAACGAAGAGATT	TCGAAGAGCATGAAGTTG
<i>GSTM1</i>	ACTATCCTTCGTGAACATC	AGACACAACCACTAACAG
<i>GAPDH</i>	CATGAGAAGTATGACAACAG	ATGAGTCCTTCCACGATA
<i>GADD45A</i>	ATCCACATTCATCTCAAT	GTAACTACAAAGGTATTTCA
<i>HSPA1B</i>	GGACTTTGACAACAGGCT	GCTTGTTCTGGCTGATGT
<i>HSP90AA1</i>	AGTTATCCTACACCTGAA	CATCATCGCTTACTTCTT
<i>HMOX1</i>	CAACAAAGTGCAAGATTC	AGAAAGCTGAGTGTAAAGG
<i>HUS1</i>	TGTTATCTATGTCAAGCAGTA	CGGTTCTTGTAAGTCCTT
<i>HIF1A</i>	TATTTGCGTGTGAGGAAA	CATCTGTGAGAACCATAAC
<i>ITGB1</i>	GAGGATTACTTCGGACTTCA	GCTGGTGTGTGCTAATG
<i>ICAM1</i>	AAGAAGATAGCCAACCAATGT	TACACGGTGAGGAAGGTT
<i>IL6</i>	CCAATCTGGATTCAATGA	GTTCCCTCACTACTCTCAA
<i>JUN</i>	ATGGAAACGACCTTCTATG	TCTTGGGGTTACTGTAGC
<i>LIG1</i>	GAAGTGGCAACAGAGAAG	CTTTGGAGGTCTTTAGGG
<i>LIG3</i>	GCTATATGTCTTTGGCTTTC	GGAATAGGCACAGTTCTT
<i>LIG4</i>	TGAGCACATTGAGAAGGA	CAGTAGGAGAAGCACCAA
<i>LAMP1</i>	GCTCCAAAGAAATCAAGACTGT	GGTGCCACTAACACATCTG
<i>MMP13</i>	GGCTCTTAATGGTTATGAC	GCACTTATCTTCTTAACTTCT
<i>MMP3</i>	GAAGTACTAGCAAGGACCTC	TCCAGCTCGTACCTCATT

Material

<i>MMP7</i>	TTGATAAGCACTGTTCT	GCAAGTATAGATGAATAAGACA
<i>MDM2</i>	ATCTTGATGCTGGTGTA	AGGCTATAATCTTCTGAGTC
<i>MDM2</i>	GCCTGTCCAGTTTGAAAT	GGTTGCCATCTTGATAGTT
<i>MSH2</i>	CTTCTTCTGGTTCGTCA	ATCATTCTCCTTGGATGCCTTAT
<i>NOX1</i>	CTCTCCAGCCTATCTCAT	AATGTCACATACTCCACTG
<i>NOS2</i>	AATCCAGATAAGTGACATAAG	CTCCACATTGTTGTTGAT
<i>NOS3</i>	CAAGGAGACGAAGAGAAC	TGGAGTCTTGTGTAGGATA
<i>MPG</i>	CAACCGAGGCATGTTTCAT	TGGAGATGTTTCATGCAGAAG
<i>MGMT</i>	CTCTTACCATCCCGTTT	AATCACTTCTCCGAATTTTCCAC
<i>PTEN</i>	ATCATCAAAGAGATCGTTA	ACCTTACTACATCATCAATA
<i>PARP1</i>	GAACGACCTGATCTGGAA	CACTTGCTGCTTGTGAA
<i>POLD1</i>	TCTGGGATGATGATGATGC	GTGTTCTGCCTCCATCTC
<i>POLE</i>	TTTGGCATTGACATTGAG	AATCATCATAATCTGGTCTGT
<i>PCNA</i>	TTACCATAGAGATGAATGAACCA	AGTGCACCGTTGAAGAG
<i>RAD51</i>	AATTAGTTCCAATGGGTTT	TGAAGTAGTTTGTCAAGC
<i>RHOA</i>	CCGATGTTATACTGATGTG	ACAGAAATGCTTGACTTC
<i>RHOB</i>	TGATCGTGTTTCAGTAAGGAC	CAATGTCGGCCACATAGTT
<i>RAC1</i>	ATCAGTTACACAACCAAT	CGTAATCTGTCATAATCTTC
<i>REV1</i>	AACACATATTATTGCCACAA	GAATGTAGGAGAGGAGTC
<i>REV3L</i>	AGTGCATTAGTATCAGGAA	TGTAGGAGGTAGGGAATA
<i>ARHGDI</i>	TCGTTTGTGCTGAAGGAG	TCATGCCGGACACTATCT
<i>SELE</i>	GCTATGACTTATGATGAG	ATTCCAATCCAGTAATAAC
<i>SOD1</i>	TCTGTTTCAATGACCTGTATT	GCCTCATAATAAGTGCCATA
<i>TIAM1</i>	TAATGCTCTGAATCCTAGTC	GAAACAGAAGAGGGCTTTG
<i>TXNRD1</i>	CGAAATTATGGATGGAAAGTC	GAGCCAATGTGATTCTGTA
<i>TREX1</i>	TCATGTGAAGAGGGGAGAC	GAAGTTGGAGAGGGTGAG
<i>TIMP2</i>	AAGGAAGTGGACTCTGGAA	CTTTGAACATCTTTATCTGCTTGA
<i>TOP2A</i>	ACGGTGTTGGATATTCTAAG	AAGCGAGCCTGATTATTC
<i>TOP2B</i>	ATAACATTCCAACCAGAT	GGCAATTTCTTTCCATTA
<i>TP53</i>	AGCACTAAGCGAGCACTG	ACGGATCTGAAGGGTGAAA
<i>TP63</i>	ATTGTTCTCCGTTGTTGATA	GTAAGGGTCAGGGCAGTA
<i>TP73</i>	CACTTTGAGGTCACTTTC	ATCTGGCAGTAGAGTTTC
<i>AKT1</i>	ATTGTGAAGGAGGGTTGG	TGAAGGTGCCATCATTCT
<i>VCAM1</i>	TGTCATTGAGGATATTGGAA	ATAACTGTATTCTTGGGTGAT
<i>WEE1</i>	TTCCAGAGATTAAGACAA	ATATTCATTGAGGAGTC
<i>WRNIP1</i>	CTGGAGACCAACGAAATC	TAATGTCACAAACCTTATGC
<i>WRN</i>	AAGATGTGCTGTAGAAGAA	TCGTAACATAACAAATGGA
<i>XPA</i>	AAGGAAGTCCGACAGGAA	ACACGCTGCTTCTTACTG
<i>XPC</i>	ACACCTACTACCTCTCAA	TAAATAGCAAATCTCCTTTCC
<i>XPF*</i>	GGTTGACTTCTTACTGATA	AGATGAATGCTTCTTGACA
<i>XPG*</i>	CTGGCTGATGAGTGTGTA	CAAGTGCTGTCTGATTCC
<i>XRCC1</i>	GAGGAAGTTGGATTTGAA	ATTTAGGTCTCTTGGGAA
<i>XRCC3</i>	CATTGTTCTGTCTTTCT	CTCCTTTACCGATTTTCAG
<i>XRCC4</i>	GTGTGAGTGCTAAGGAAG	CTCATCATAGACTGGATCTC

* Die Primer für die Gene *XPF* und *XPG* befanden sich nicht auf dem PCR-Array.

** Gennamen s. Abkürzungsverzeichnis

3.10.2 DNA-Marker – und Ladepuffer

100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt
λ DNA/EcoRI + HindIII DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Gel loading Dye Blue (6 x)	Fermentas, St. Leon-Rot

3.10.3 Vektoren und rekombinante Plasmide

Verwendete Plasmide

pSuper.puro	Oligoengine, Seattle, USA
pSuperior.retro.puro-p53 shRNA	Oligoengine, Seattle, USA

Kloniertes Plasmid und Klonierungsstrategie

pSuper.puro-XPCshRNA

Vektor: pSuperior.retro.puro, linearisiert mit BglIII und HindIII

Sense-Sequenz: 5'-GATCCGCTCGAGATGATGAGGAATTGTTCAAGAGAC-3'

Antisense-Sequenz: 5'-AGCTTAAAAAGCTCGAGATGATGAGGAATTGTCTCT
TGAAC-3'

Quelle der Sequenz: (Wu et al., 2007)

Sense- und *Antisense*-shRNA-Nukleotide wurden mit BglIII und HindIII-kompatiblen Enden von der Firma Oligoengine, Seattle, USA bezogen.

3.11 Proteine

3.11.1 Proteinmarker

peqGold Proteinmarker II, 10 - 200 kDa	Peqlab, Erlangen
peqGold Proteinmarker IV, 10 - 170 kDa	Peqlab, Erlangen

3.11.2 und zugehörige Reaktionspuffer

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt
RNase A	Sigma-Aldrich, München
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt

3.11.3 Antikörper

Primärantikörper für Western Blots

Anti-ATR (sc-1887)	Ziege polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-p-ATR (#2853)	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-BRCA1 (#9010)	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-p-BRCA1 (#9009)	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Caspase-8 (#9746)	Maus monoklonal	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-DDB2	Kaninchen polyklonal	V. Rapić-Otrin, Pittsburgh, USA
Anti-ERK2 (sc-154)	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-p21 (554228)	Maus monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-p53 (DLN-08276)	Maus monoklonal	Dianova, Hamburg
Anti-XPC (ab6264)	Maus monoklonal	Abcam, Cambridge, UK

Sekundärantikörper für Western Blots

Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Ziege	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	Ziege	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA
Anti-Ziege IgG, HRP-konjugiert	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Kaninchen IRDye 800CW, IR-Farbstoff-konjugiert	Esel	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Anti-Maus IRDye 800CW, IR-Farbstoff-konjugiert	Esel	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Anti-Maus IRDye 680, IR-Farbstoff-konjugiert	Esel	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Anti-Kaninchen IRDye 680, IR-Farbstoff-konjugiert	Esel	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Meerrettich-Peroxidase (HRP, *Horseradish peroxidase*)-konjugierte Zweitantikörper wurden mit entsprechender Blocklösung 1:3000 verdünnt.

Infrarot (IR)-Farbstoff-konjugierte Zweitantikörper wurden 1:10000 in TBST verdünnt.

3.12 Software und Datenbanken

Ascent Software v2.6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cell A	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster
CellQuest Pro	BD Biosciences, Heidelberg
EndNote v9.0 .0	Thomson Reuters, NY City, USA
GeneSnap v6.0.5	Syngene, Cambridge, UK
GeneTools	Syngene, Cambridge, UK
Graph Pad Prism v3.0.2	GraphPad Software, La Jolla, USA
iQ5 2.0 Standard Edition	Bio-Rad, München
Image J	W. Rasband, http://rsb.info.nih.gov/ij/
Komet 4.0.2.	Kinetic Imaging, Liverpool, UK
ModFit LT	Verity Software House, Topsham, USA
MS Office v2010	Microsoft, Unterschleißheim
Multi Analyst v1.0.1	Bio-Rad, München
Odyssey v3.0	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Photoshop v7.0	Adobe Systems, München
WinMDI	J. Trotter http://facs.scripps.edu/software.html

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkultur

Die gesamten Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich autoklavierte bzw. sterilisierte Materialien verwendet.

4.1.1.1 Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Inkubatoren bei einer Temperatur von 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und einem relativen CO₂-Gehalt von 5% in entsprechendem Kulturmedium mit Penicillin und Streptomycin auf Zellkulturschalen kultiviert.

4.1.1.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden alle 3 bis 5 Tage wie folgt gesplittet:

A375 und A375-Klone	1:10 – 1:20
D05 und D05-Klone	1:5 – 1:10
D14	1:5 – 1:10
G361	1:5
Malme-3M	1:2
RPMI-7951	1:4

Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA nach einer Inkubationszeit von 0,5 - 3 min von der Schale gelöst. Die Ablösung der Zellen vom Schalenboden wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, zentrifugiert, resuspendiert und auf eine neue Schale mit entsprechendem Zellkulturmedium überführt.

4.1.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellkulturen wurden subkonfluent wachsende Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA von der Schale gelöst und zur Inaktivierung des Trypsins in ein 15 ml Röhrchen mit FCS-haltigem Medium überführt. Es folgte eine

Sedimentierung der Zellen bei 1000 UpM für 5 min. Die Zellen wurden in 90% FCS + 10% DMSO resuspendiert und auf Kryoröhrchen (2 – 3 Röhrchen pro 10 cm-Schale) verteilt. Die Kryoröhrchen wurden mithilfe einer Isopropanol-haltigen Einfrierbox auf - 80°C abgekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

Aufzutauende Zellkulturen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 2 min in ein Wasserbad (37°C) gestellt. Zur Entfernung des DMSOs erfolgte die Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen mit 5 ml Kulturmedium. Durch Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 1000 UpM konnte der DMSO-haltige Überstand entfernt werden. Die Zellen wurden in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert, auf Schalen überführt und vor Aussaat des Experiments für mindestens 7 Tage im Inkubator kultiviert.

4.1.1.4 Mykoplasmentest

Regelmäßig wurde ein PCR-basierter Mykoplasmentest der Firma Minerva Biolabs, Berlin durchgeführt. Positiv getestete Zellen wurden umgehend und sachgemäß entsorgt oder für 2 – 3 Wochen mit MykoKill laut Herstellerangaben behandelt. Der Erfolg der Antibiotika-Behandlung wurde nach deren Beendigung erneut mithilfe des oben genannten Tests untersucht.

4.1.2 Behandlung von Zellen

4.1.2.1 Alkylierende Agenzien

Zur Depletion des resistenzvermittelnden DNA-Reparaturproteins MGMT (s. 2.3.1) wurde – wenn nicht anders angegeben – dem Zellkulturmedium 1 h vor Behandlung mit Alkylanzien der MGMT-Inhibitor O⁶BG (gelöst in DMSO) in einer Konzentration von 10 µM zugefügt (Dolan et al., 1990).

Da FM sehr instabil ist, wurde direkt vor der Behandlung ein Aliquot, welches eine definierte Menge des pulverisierten Chemotherapeutikums enthielt, aus dem - 20°C Gefrierschrank entnommen. Das Pulver wurde in einem entsprechenden Volumen 100% Ethanol gelöst, so dass die so erhaltene Stammlösung stets eine Konzentration von 10 mg/ml hatte. Sollten Volumina < 4 µl pipettiert werden, wurde eine entsprechende Vorverdünnung der Stammlösung in Zellkulturmedium vorbereitet. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Ethanol-Endkonzentration in der Zellkultur < 0,4% war.

Die TMZ-Stammlösung wurde von Dr. W. Roos in einer Konzentration von 35 mM vorbereitet. Das Pulver, welches bei - 20°C gelagert wird, wurde in 33% DMSO gelöst und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei – 80°C gelagert. Direkt vor der Behandlung wurden die Aliquots aufgetaut und zur Resolubilisierung 15 s lang sonifiziert. Ein entsprechendes Volumen dieser Stammlösung wurde dem Zellkulturmedium direkt zugegeben. Sollten Volumina < 4 µl pipettiert werden, so wurde eine entsprechende Vorverdünnung der Stammlösung in Zellkulturmedium vorbereitet.

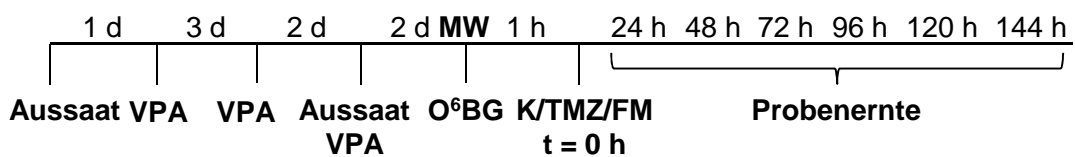
Da sowohl FM als auch TMZ eine sehr geringe Halbwertszeit besitzen, wurde auf einen Mediumwechsel zur Gewährleistung einer Pulsbehandlung verzichtet.

4.1.2.2 Bestrahlung mit UVC

Die Bestrahlung mit UVC wurde mithilfe einer UVC-Quelle durchgeführt. Vor der Bestrahlung wurden sowohl Medium als auch Deckel der Kulturschale entfernt, um eine Absorption der Strahlung durch diese zu vermeiden.

4.1.2.3 Behandlung mit VPA

Für die Experimente, bei denen vor der Alkylanzien-Behandlung eine Vorbehandlung der Zellen mit VPA stattfand, wurde folgendes Behandlungsschema durchgeführt:



Einen Tag nach Aussaat der Zellen wurde das Medium gewechselt und VPA in einer Konzentration von 1 mM (gelöst in ddH₂O) zugefügt. Die Zellen wurden drei Tage lang inkubiert, zusammen mit den Zellen im Überstand zentrifugiert, in frischem Medium mit 1 mM VPA resuspendiert und nach Bedarf gesplittet. Nach einer weiteren Inkubation von zwei Tagen erfolgte die Aussaat der Zellen für das entsprechende Experiment in VPA-haltigem (1 mM) Medium. 2 Tage später wurde zur Entfernung von VPA das Medium gewechselt. Anschließend wurden die Zellen nach Bedarf mit O⁶BG (10 µM) und 1 h später mit Alkylanzien behandelt.

4.1.3 Wachstumskurven

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden 5×10^4 Zellen pro 6 cm-Schale ausgesät und im Abstand von 24 h wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Gesamtzellzahl wird hierbei wie folgt berechnet:

Anzahl der Zellen in 10 Quadraten \times 1000 \times Zellsuspensionsvolumen

4.1.4 Herstellung von stabilen Zellklonen

Mithilfe von Zellklonen kann der Effekt der Expression eines transfizierten, stabil ins Genom integrierten Gens in einem isogenen Zellsystem untersucht werden. Das transfizierte Gen selbst kann beispielsweise für ein normales Protein, ein mutiertes Protein oder eine shRNA kodieren, welche die Expression eines Proteins der Wahl stilllegt.

Zur Herstellung von stabilen Zellklonen müssen die Zellen zunächst mit dem Zielgen, welches sich in der Regel zusammen mit einem eukaryotischen Resistenzgen auf einem Plasmid befindet, transfiziert werden. Um Kontrollklone zu erhalten, erfolgt zusätzlich eine Transfektion mit dem „leeren“ Vektor, der nur das Resistenzgen kodiert. Nach der Transfektion werden die Zellen stark verdünnt und mit eukaryotischem Antibiotikum behandelt, so dass aus einzelnen, ausschließlich erfolgreich transfizierten Zellen Klone wachsen können.

4.1.4.1 Transfektion

Die zu transfizierenden Zellen wuchsen auf 6 cm-Schalen und hatten zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 60 - 80%. Die Transfektion erfolgte mit Effectene® der Firma Qiagen nach Protokoll des Herstellers, wobei stets 2 µg Plasmid-DNA in die Transfektion eingesetzt wurden. Die verwendeten Mengen an Puffer EC, Enhancer und Effectene wurden dementsprechend verdoppelt. Nach Transfektion wurden die Zellen etwa 16 h inkubiert, bevor das Medium zur Entfernung der Transfektionslösung gewechselt wurde.

4.1.4.2 Selektion und Kultivierung von Klonen

Ein bis zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen durch Splitten (1:5, 1:10 und 1:100) stark ausgedünnt und in Kulturmedium mit Selektionsantibiotikum kultiviert.

Während der darauf folgenden 2 - 5-wöchigen Inkubationszeit entstanden aus einzelnen Zellen stabil transfizierte Klone, welche mit einer Pipettenspitze unter gleichzeitigem Aufsaugen von der Schale gekratzt und auf eine 96- oder 24-Loch-Platte mit Selektionsmedium überführt wurden. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie auf größere Schalen transferiert. Die Klone wurden zum Einen kryokonserviert, zum Anderen wurden sie per Western Blot und/oder quantitative Echtzeit-PCR auf die Expression des Transgens hin untersucht.

4.1.5 Zellodmessung am Durchflusszytometer

4.1.5.1 SubG1-Messung

Die Identifikation von apoptotischen Zellen einer Zellpopulation beruht auf der Fragmentierung der DNA während der Apoptose, so dass der DNA-Gehalt dieser Zellen kleiner ist als der DNA-Gehalt von G1-Zellen. Die DNA-Menge von fixierten Zellen kann durch Zugabe des DNA-Interkalators Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt werden. Hier werden einzelne Zellen mit Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt. Das Gerät detektiert die PI-Emission bei 585 nm. Je größer die PI-Emission ist, desto mehr DNA enthält die Zelle.

Da sich apoptotische Zellen von der Zellkulturplatte lösen, wurden sowohl Zellen im Medium als auch adhärente Zellen geerntet und in PBS gewaschen. Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 200 µl kaltem PBS resuspendiert und in 80% Ethanol fixiert (> 30 min, - 20°C). Die Zellen wurden anschließend in 367 µl PBS mit 0,03 µg/ml RNase resuspendiert und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden 134 µl Propidiumiodid-Lösung (50 µg/ml) hinzugegeben. 1×10^4 Zellen wurden am Durchflusszytometer analysiert und mit dem Computerprogramm WinMDI 2.8 ausgewertet.

4.1.5.2 AnnexinV-PI-Doppelfärbung

Die vitale, apoptotische und nekrotische/spät-apoptotische Fraktion einer Zellpopulation kann mithilfe der AnnexinV-PI-Doppelfärbung bestimmt werden. Vermes und Kollegen haben diese Methode 1995 das erste Mal beschrieben (Vermes et al., 1995). Im Gegensatz zur SubG1-Messung werden lebende Zellen untersucht. Die drei Fraktionen lassen sich wie folgt identifizieren:

Während der Apoptose transloziert das Phosphoglycerid Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Plasmamembran und wird so zugänglich für AnnexinV, ein PS-

bindendes Protein. Durch Verwendung von Flouresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem AnnexinV können PS-positive Zellen detektiert werden. Da die Plasmamembran der Zellen intakt ist, kann PI nicht in die Zellen eindringen und in die DNA interkalieren. Apoptotische Zellen sind folglich AnnexinV-FITC-positiv und PI-negativ.

Die Plasmamembran nekrotischer Zellen verliert ihre Integrität und wird permeabel. AnnexinV-FITC kann daher in die Zellen eindringen und von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran an PS binden. Gleichzeitig kann auch PI in die Zellen eindringen und die DNA markieren. Folglich sind nekrotische Zellen sowohl AnnexinV-FITC als auch PI positiv. Nekrotische Zellen könne nicht von spät-apoptotischen unterschieden werden.

Da sich apoptotische Zellen von der Zellkulturplatte lösen, wurden sowohl Zellen in Medium-Suspension als auch adhärenente Zellen mithilfe von Trypsin-EDTA geerntet und zweimal in kaltem PBS gewaschen. Nach Sedimentierung und gründlicher Entfernung des PBS wurden die Zellen in 50 µl Annexinbindepuffer mit 2,5 µl AnnexinV-FITC-Lösung resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln und auf Eis wurde den Proben 430 µl Annexinbindepuffer und 10 µl PI (50 µg/ml) hinzugefügt. Die Proben wurden wie SubG1-Proben gemessen und analysiert (s. o.).

4.1.6 Interstrang-Crosslink Comet Assay

Der ICL *Comet* Assay basiert auf einer von Ostling und Johanson eingeführten Methode zur Detektion von DSB in genomischer DNA (Ostling and Johanson, 1984). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Mobilität von Nukleinsäuren im elektrischen Feld mit abnehmender Größe des Fragments zunimmt, so dass in Agarose eingebettete Zellkerne mit fragmentierter DNA nach Beendigung der Gelelektrophorese einen Kometenschweif zu haben scheinen. Die Größe des „Kometen“ korreliert hierbei mit dem Grad der Fragmentierung.

Der *ICL Comet* Assay ist eine Modifikation des klassischen *Comet* Assays und dient der Detektion von Interstrang-Crosslinks. Er beruht auf der Theorie, dass die Mobilität von durch ionisierende Strahlung fragmentierter DNA während der Agarose-Gelelektrophorese durch die Vernetzung der beiden DNA-Stränge durch Interstrang-Crosslinks (ICL) herabgesetzt wird. Als Referenz dient eine ausschließlich ionisierender Strahlung ausgesetzte Probe.

Nach Ablauf der gewünschten Behandlungszeit mit dem ICL-induzierenden Agenz wurden die Zellen mit 6 Gray bestrahlt, trypsiniert (0,005% Trypsin, 0,02% EDTA),

bei 4°C und 1000 UpM pelletiert, in kaltem PBS resuspendiert und sofort auf Eis gestellt. Etwa $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden in LMP-Agarose (0,5% in PBS, 37°C) aufgenommen und auf mit 1,5% Agarose beschichtete Objektträger pipettiert. Die Suspension wurde mit einem Deckgläschen bedeckt und zum Aushärten für 4 min in den Kühlschrank gelegt. Nach Entfernung des Deckgläschens wurden die Objektträger für 2 h in vorgekühlten Lysepuffer gestellt. Anschließend folgte die Auflösung der Wasserstoffbrücken doppelsträngiger DNA durch Inkubation in stark alkalischem, vorgekühltem Elektrophorese-Puffer für 20 min im Kühlraum. Das elektrische Feld für die Gelelektrophorese wurde so eingestellt, dass die Spannung 0,74 V/cm Elektrodenabstand und die Stromstärke 300 mA betragen. Die Dauer der Gelelektrophorese betrug 15 min. Die Proben wurden durch dreimaliges Betropfen mit Neutralisationspuffer neutralisiert und in 100% Methanol für 30 min fixiert. Kurz vor der mikroskopischen Analyse wurde die DNA durch Auftropfen von 200 µl PI (50 µg/ml) gefärbt. Die Kometengröße von 50 Zellen pro Probe wurde mithilfe der Software "Kinetic imaging Komet v4.0.2" ausgewertet. Hierbei wurde das so genannte *Tail Moment* wie folgt berechnet:

$$TM = (Mb - Ma) \times \left(\frac{Fb}{Fc} \right)$$

Ma = Flächenmedian der Fluoreszenzverteilung des Nukleus

Mb = Flächenmedian der Fluoreszenzverteilung des Kometen

Fb = Mittlere Fluoreszenzintensität des Kometen

Fc = Mittlere Fluoreszenzintensität der gesamten DNA

Durch Normalisierung des TM von Zellen, die mit einem ICL-induzierenden Agens behandelt und bestrahlt wurden auf den TM von Zellen, welche ausschließlich bestrahlt wurden, können Rückschlüsse auf die relative Menge an ICL gezogen werden.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau durch Restriktionsendonukleasen ist für die Herstellung von rekombinanten Vektoren unentbehrlich. Zudem dient er dem analytischen Verdau von Vektoren, indem die bei dem Verdau entstandenen Fragmente auf einem Agarosegel (s. 4.2.2) analysiert werden. Die benötigte Enzymaktivität (U) pro µg Plasmid wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Größe } \lambda \text{ DNA (48,5 kb) x Anzahl der Schnittstellen des Enzyms im Plasmid}}{\text{Größe der DNA X (kb) x Anzahl der Schnittstellen des Enzyms im } \lambda \text{-Genom}}$$

Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Enzymvolumen 1/10 des Gesamtansatzes nicht übersteigt. Der Restriktionsverdau fand für 2 h oder über Nacht beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms/der jeweiligen Enzyme statt. Die eingesetzte Plasmid-Menge variierte je nach Fragestellung zwischen 0,5 µg für analytische Zwecke und 10 µg für spätere Klonierungen. Nach Bedarf und Möglichkeit wurden die Enzyme durch Hitze nach Herstellerangaben inaktiviert.

4.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente aus Restriktionsverdaus oder PCRs wurden durch Agarose-Gelelektrophorese zusammen mit einem Größenmarker aufgetrennt. Die gewünschte Probenmenge sowie ein DNA-Größenstandard wurden mit der entsprechenden Menge Probenpuffer versetzt und bei 100 V aufgetrennt. Nach gewünschter Laufzeit erfolgte die Detektion am UV-Transilluminator.

4.2.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden am NanoDrop spektralphotometrisch gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA von 40 µg/µl. Die Reinheit von Nukleinsäuren aus Plasmidpräparationen, die anschließend für Transfektionen eingesetzt werden sollten, wurde aus dem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt. Ein Wert größer als 1,8 entspricht einer hohen Reinheit; die Plasmide können somit für Transfektionen eingesetzt werden.

4.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation katalysiert eine Ligase die Ausbildung von kovalenten Phosphodiesterbindungen zwischen kompatiblen kohäsiven oder glatten Enden der DNA-Fragmente, um beispielsweise ein rekombinantes Plasmid herzustellen. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

x µl	Vektor (ca. 10 µg aus Restriktionsverdau)
x µl	<i>Insert</i>
2 µl	10x Ligase-Puffer
2 µl	T4 DNA-Ligase
ad 10 µl H ₂ O	

Das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert sollte 1:5 betragen. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde die T4 DNA-Ligase für 10 min bei 65°C inaktiviert.

4.2.5 Transformation von Bakterien

Zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5α (dankend erhalten von Dr. D. Aasland) wurde die Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und durchmischt. Nun wurden 1 - 10 ng Plasmid-DNA zu 100 µl Bakteriensuspension gegeben und 10 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock für 60 s bei 42°C. Die Bakteriensuspension wurde für 5 min auf Eis abgekühlt und in ein Röhrchen mit 1 ml LB-Medium überführt. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37°C und 200 UpM geschüttelt, dann für 3 min bei 4000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakteriensediment in 120 µl LB-Medium resuspendiert. 10 – 120 µl der Suspension wurden auf LB-Agar-Platten mit Selektionsantibiotikum (s. 3.9.2) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.6 Mini-Screen: Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke

6 - 12 Bakterienklone wurden mit sterilen Impfösen von der Platte aufgenommen und in 6 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt. Die Impföse wurde zudem auf einen definierten Bereich einer Rasterplatte getupft, welche bei 37°C über Nacht inkubiert wurde. Die Flüssigkultur wurde ebenfalls über Nacht bei 37°C und 200 UpM inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Rasterplatte mit Parafilm verschlossen und in den Kühlschrank gestellt. Die Plasmid-DNA der Klonen wurde wie folgt präpariert:

Die Bakterien wurden für 10 min bei 4000 UpM abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zum Pellet wurden 400 µl des RNase-haltigen Resuspensionspuffers pipettiert, das Pellet durch Vortexen vollständig gelöst. Die Suspension wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zugabe von 400

µl Lysepuffer leitet die alkalische Lyse der Bakterien ein. Ohne Verzögerung wurde das denaturierte Lysat mit 400 µl Neutralisierungspuffer versetzt. Die Neutralisierung führt zu einer raschen Renaturierung der Plasmid-DNA, während die genomische DNA sowie Proteine präzipitiert werden. Eine gute Durchmischung wurde durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gewährleistet. Es folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis, gefolgt von zwei 15-minütigen Zentrifugationsschritten bei 13.000 UpM, bei denen der jeweilige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Zum Überstand wurden 0,7 Volumenteile 100%igen Isopropanols pipettiert und sehr sorgfältig durchmischt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 13.000 UpM wurde der Überstand abgesaugt und 0,5 ml 70%iges Ethanol auf das Pellet gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13.000 UpM. Der Überstand wurde verworfen. Die Plasmid-Pellets wurden an der Luft getrocknet und in 60 µl ddH₂O gelöst. 10 - 20 µl der Plasmid-DNA wurden für einen Kontroll-Restriktionsverdau eingesetzt, welcher mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert wurde. Zeigten sich dort positive Klone, so konnten diese von der Rasterplatte für Midi-Präparationen erneut angeimpft werden. Die Resuspensions-, Lyse- und Neutralisierungspuffer wurden dem Kit „Nucleobond AX 100“ entnommen.

4.2.7 Midi-Präparation: Isolierung von Plasmid-DNA

6 - 12 Bakterienklone wurden mit sterilen Impfösen von der Platte aufgepickt, in 6 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt und für mindestens 6 h bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Die Suspension der angewachsenen Klone wurde im Verhältnis 1:500 bis 1:1000 in 300 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das „Nucleobond AX 100“ Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit des Eluats erfolgte am NanoDrop. Für die nachfolgende Überprüfung der Klone wurden 20 µl der DNA-Präparation in einen Restriktionsverdau eingesetzt und im Agarosegel aufgetrennt.

4.2.8 Herstellung des shRNA-Vektors gegen XPC

Zur Herstellung eines rekombinanten Plasmids zur Stilllegung von XPC durch RNA-Interferenz (RNAi) wurde der pSuper.puro-Vektor der Firma Oligoengine verwendet.

Das Oligonukleotid, auf dem die shRNA gegen XPC basiert, wurde ebenfalls von Oligoengine als BglIII/HindIII-Variante bezogen. Die Subklonierung des Oligonukleotids und die Amplifikation des rekombinanten Vektors erfolgte entsprechend des von Oligoengine bereitgestellten Protokolls (*pSuper: Manual. A Vector System for Expression of short interfering RNA*) bzw. wie in den Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.7 beschrieben.

4.2.9 Untersuchung der Genexpression mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Untersuchung des Expressionsniveaus von Genen werden zunächst die RNA-Transkripte (mRNA) einer Zelle in cDNA umgeschrieben. Bei dieser so genannten Reversen Transkription wird ein Enzym eingesetzt, welches sowohl eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität als auch eine RNase H-Aktivität aufweist. Mithilfe von Primern, die an sämtliche RNA-Transkripte der Zelle binden, erstellt dieses Enzym eine zur RNA komplementäre DNA-Kopie (cDNA) und degradiert anschließend durch seine RNase H-Aktivität den RNA-Strang der durch die Transkription entstandenen DNA:RNA-Hybride.

Die so gewonnene cDNA wird als Matrize für eine PCR zur *in vitro*-Amplifizierung mit für das zu untersuchende Gen spezifischen Primern verwendet, wobei die Amplifikation nahezu exponentiell verläuft. Bei der PCR werden mehrmals hintereinander ein Denaturierungsschritt, ein Anlagerungsschritt und ein Elongationsschritt durchgeführt. Beim Denaturierungsschritt werden die beiden DNA-Stränge bei 95°C voneinander getrennt, indem die stabilisierenden Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der DNA zerstört werden. Nun können sich die Primer, die als Ansatzpunkt für die thermostabile *Taq*-Polymerase dienen, anlagern. Die Anlagerungs-Temperatur sollte sich zwischen 50°C und 70°C bewegen und ist abhängig von der Primer-Komposition. Bei einer Temperatur von 72°C synthetisiert die Polymerase in einem semikonservativen Mechanismus den neuen DNA-Tochterstrang aus den der Reaktion zugefügten Desoxyribonukleotiden (dNTPs). Die Quantifizierung der synthetisierten doppelsträngigen DNA erfolgt mithilfe der Fluoreszenz eines DNA-Interkalators.

4.2.9.1 RNA-Isolation

a) Isolation von mRNA aus Zellen

Die Zellen wurden mithilfe von Trypsin-EDTA von einer 10 cm Schale geerntet, in ein Röhrchen mit Zellkulturmedium überführt und mit kaltem PBS bei 4°C

gewaschen. Das trockene Zellsediment wurde entweder direkt verwendet oder schockgefroren und bis zur RNA-Isolation bei - 80°C aufbewahrt.

b) Isolation von mRNA aus Tumoren

Zur Isolation der mRNA wurden 20 – 30 µg der Tumorproben mithilfe einer Schwingmühle (25 Hz, ca. 3 min) zerkleinert.

Anschließend wurde die RNA mithilfe des „NucleoSpin RNA II“ Kit der Firma Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers isoliert. Hierbei wurde die RNA mittels Säulenchromatographie aufgereinigt und mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben bestimmt.

4.2.9.2 cDNA-Synthese: Erststrangsynthese durch Reverse Transkription

Zur Reversen Transkription von mRNAs in cDNA unter Verwendung des „Verso cDNA Kits“ wurden Oligo-dT-Primer eingesetzt, welche spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNAs binden und somit ausschließlich deren Amplifikation ermöglichen. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Sollte die cDNA für eine RT-PCR verwendet werden, so wurde 1 µg RNA pro cDNA-Synthese eingesetzt. Sollte die cDNA für die Echtzeit-PCR verwendet werden, so wurden 1,5 – 2 µg RNA pro cDNA-Synthese eingesetzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

4.2.9.3 PCR und Detektion des Amplifikats

RT-PCR

Die cDNA wurde zur Verdünnung mit 30 µl ddH₂O versetzt. Zunächst wurde zum Angleich der in die PCR-Reaktion eingesetzten cDNA-Menge eine PCR für das Referenz-Gen GAPDH durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde unter Verwendung des „2xTaq DNA Pol, Master Mix Red“ wie folgt zusammengesetzt:

2xTaq DNA Pol, Master Mix Red®	15 µl
Primer <i>up</i>	2 µl
Primer <i>low</i>	2 µl
<hr/>	
ad 27 µl ddH ₂ O	

Je 27 µl dieses Reaktionsansatzes wurden in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurden je 3 µl der vorverdünnten (s. o.) cDNA hinzu pipettiert. Das in

die Reaktion eingesetzte cDNA-Volumen (und damit auch das ddH₂O-Volumen) wurde so lange variiert, bis die *GAPDH*-Signale aller Proben nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel optisch gleich stark aussahen. Die hierbei ermittelten cDNA-Volumina wurden nun in den folgenden PCRs für die Genexpressionsanalysen eingesetzt.

Folgendes Temperaturprofil wurde appliziert:

- | | | |
|-------------|--------|--|
| 1) 94°C | 2 min | Aktivierung der <i>hot start Taq</i> -Polymerase |
| 2) 94°C | 30 s | Denaturierung des DNA-Doppelstrangs |
| 3) Variabel | 45 s | Anlagerung der Primer |
| 4) 72°C | 1 min | Elongation |
| 5) 72°C | 10 min | finale Elongation |
| 6) 4°C | ∞ | Kühlen |

Schritte 2, 3, und 4 wurden individuell dem zu untersuchenden Gen angepasst.

In der folgenden Tabelle werden die spezifischen Primer-Anlagerungstemperaturen und Zyklenzahlen der verschiedenen Gene aufgeführt.

Name	Anlagerungstemperatur	Anzahl Zyklen
<i>BRCA1</i>	59°C	27
<i>DDB2</i>	59°C	27
<i>ERCC1</i>	58°C	26
<i>GAPDH</i>	58°C	23
<i>GADD45A</i>	54°C	28
<i>WRN</i>	58°C	28
<i>XPA</i>	59°C	28
<i>XPB</i>	59°C	27
<i>XPC</i>	59°C	27
<i>XPD</i>	58°C	28
<i>XPF</i>	60°C	30
<i>XPG</i>	58°C	28

Die PCR-Produkte wurden im 1% Agarose-Gel (s. 4.2.2) aufgetrennt, am UV-Transilluminator visualisiert und fotografisch dokumentiert.

Echtzeit-PCR (*Real-time PCR*)

Sowohl für den PCR-Array, bei dem die Untersuchung von 96 Genen gleichzeitig möglich ist, als auch für die klassische Untersuchung einzelner Gene wurde die Echtzeit-PCR verwendet. Um die Pipettiergenauigkeit zu erhöhen, wurden für das Pipettieren der Proben repellierende Spitzen verwendet.

Für die PCR-Reaktion selbst wurde der 2 x SYBR®GreenER™ qPCR SuperMix der Firma Invitrogen, welcher u. a. SYBR Green, *Taq*-Polymerase, dNTPs und Mg²⁺ enthält, verwendet.

PCR-Array

Zunächst wurde ein Mix bestehend aus 1 ml 2 x SYBRGreen Mix (s. o.), 100 µl cDNA und 100 µl H₂O vorbereitet. Je 12 µl dieser Lösung wurden in eine 96-Loch-Platte pipettiert, in denen 8 µl eines genspezifischen Primerpaars (625 nM) vorlagen (s. 3.10.1). Folgendes PCR-Programm wurde appliziert:

50°C	2 min	}	Vorbereitung 2 x SYBR®GreenER™ qPCR SuperMix	}	45 x
95°C	8 min 30 s				
95°C	15 s	Denaturierung des DNA-Doppelstrangs			
55°C	30 s	Anlagerung der Primer			
72°C	40 s	Elongation: Temperaturoptimum der <i>Taq</i> -Polymerase			

Während eines jeden Zyklus' wird die Fluoreszenzintensität des dsDNA-Interkalators SYBR® Green, welche proportional zur Menge des PCR-Produkts ist, gemessen. Zur Normalisierung der Messwerte dienen die Haushalts-Gene *GAPDH* und *bActin*. Kalibriert wurde auf einen beliebigen Messwert eines jeden Echtzeit-PCR-Laufs. Normalisierung sowie Kalibrierung wurden automatisch durch die Software iQ5 2.0 Standard Edition durchgeführt. Wurde der Ct-Wert erst bei einer Zyklenzahl > 35 erreicht, so führte dies zu einem Ausschluss aus der Expressions-Analyse. Zur Verifizierung der spezifischen Amplifikation erstellte das Gerät eine Schmelzkurve, aus der die Schmelztemperatur T_m des/der Amplifikate ablesbar ist und mit der theoretischen T_m des gewünschten Amplifikats verglichen werden kann. Hierzu wurde folgendes Temperaturprofil appliziert:

95°C	1 min	Initiale Denaturierung
55°C	1 min	Abkühlen auf Starttemperatur
+0,5 °C in 10 s bis Erreichen von 95°C		Detektion der Fluoreszenzintensität

Wurden hierbei Primer-Dimere oder unspezifische Amplifikate detektiert, so wurde der PCR-Lauf aus der Expressions-Analyse ausgeschlossen.

Klassische *Real time*-PCR zur Analyse einzelner Gene

Zunächst wurden cDNA-Mix und Primer-Mix in entsprechender Menge vorbereitet.

1 x Primer-Mix

1,67 µl Primerpaar (3 µM)

10 µl 2x SYBR ®GreenER™ qPCR SuperMix

1 x cDNA-Mix

0,4 µl cDNA

7,93 µl ddH₂O

11,67 µl des Primer-Mix wurden in eine 96-Loch-Platte vorgelegt. Anschließend wurde 8,33 µl cDNA-Mix hinzugefügt.

Jede Probe wurde als Triplikat angelegt. Sollte sich eines der Triplikate deutlich von den anderen beiden unterscheiden, so wurde es aus der Genexpressions-Analyse ausgeschlossen. Das applizierte PCR-Temperaturprofil und die Qualitätskontrolle (T_m , Zyklenzahl) entsprachen denen des PCR-Arrays (s. o.).

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten für Western Blots und MGMT-Assay

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von der Schale gelöst und bei 4°C pelletiert. Nach Waschen mit kaltem PBS erfolgte die Resuspension der Zellen in 150 - 300 µl Zellysepuffer. Lyse und Zerstörung der DNA wurden durch Sonifizierung mit 3 x 10 Pulsen (Ausgangsregler 4, Auslastungsgrad 40%) erreicht. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 UpM und 4°C abgetrennt. Der Überstand, der dem Gesamtzellextrakt entspricht, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

4.3.2 Herstellung von Phosphoprotein-Extrakten

Zur Herstellung von Phosphoprotein-Extrakten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, das anschließend gründlich entfernt wurde. Dann wurde ein der Zelldichte angepasstes Volumen von erhitztem (95°C/56°C) 1 x SDS-Ladepuffer (Roti Load, s. 3.4) auf die Schale gegeben. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Schale gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend wurde das Lysat sonifiziert (3 x 10 Pulse, Ausgangsregler: 4, Auslastungsgrad 40%) und für 5/10 min bei 95°C/56°C denaturiert. Die Proben wurden bei – 20°C gelagert. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde nach Durchführung eines Western Blots (s. 4.3.7) durch densitometrische Vermessung der ERK2-Signalintensität mit anschließendem Angleich des Probenvolumens erreicht.

4.3.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Tumorgewebe (Xenograft)

10 – 13 mg des Tumorgewebes wurden in ca. 60 µl/mg 1 x Probenpuffer (Roti Load, s. 3.4) aufgenommen und mithilfe einer Schwingmühle (25 Hz, ca. 3 min) zerkleinert. Das so entstandene Lysat wurde sonifiziert (3 x 10 Pulse, Ausgangsregler: 4, Auslastungsgrad 40%) und anschließend bei RT und 14.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden die Proben für 10 min/5 min bei 56°C/95°C erhitzt, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei – 20°C gelagert. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE durch densitometrische Vermessung der ERK2-Signalintensität mit anschließendem Angleich des Probenvolumens erreicht.

4.3.4 Kern-Plasma-Fraktionierung von Zellen

Die Zellen wurden trypsiniert, sedimentiert und in Fraktionierungspuffer A resuspendiert. Durch viermaliges Einfrieren (flüssiger Stickstoff) und Auftauen (37°C) mit anschließendem Vortexen für 5 s wurden die Zellen aufgebrochen. Nach der Sedimentation der Nuklei durch Zentrifugation (11000 UpM, 15 min, 4°C) wurde der Überstand, der der zytoplasmatischen Fraktion entspricht, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Nuklei wurden in Fraktionierungspuffer B resuspendiert, auf Eis sonifiziert und anschließend zentrifugiert (11000UpM, 15 min, 4°C). Der die nukleären Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Schockgefrieren der Proben in flüssigem Stickstoff erfolgte deren Lagerung bei – 80°C. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode bestimmt.

4.3.5 Proteinbestimmung mit der Bradford-Methode

Die Quantifizierung der Proteinmenge eines Zellextrakts erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976).

Je nach zu erwartender Proteinkonzentration wurden von jeder Probe 1 – 2 µl in Triplikaten in eine 96-Loch-Platte vorgelegt. Gleichzeitig wurde eine Eichkurve in Quadruplikaten mit 0, 1, 2, 3, 4 und 5 µl einer 1 mg/ml BSA-Stammlösung pipettiert. 200 µl der Bradford-Lösung wurden hinzugegeben, die Platte wurde anschließend für ca. 5 min im Dunkeln inkubiert.

Die optische Dichte (OD) der Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm am Mikroplattenleser bestimmt. Durch Vergleich der OD der Proben mit der OD der BSA-Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der Proben automatisch durch das Programm Ascent Software v2.6 am Mikroplatten-Leser ermittelt werden.

4.3.6 MGMT-Aktivitätstest

Das klassische Substrat des DNA-Reparaturenzyms MGMT ist O⁶-Methylguanin, welches durch Übertragung auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms selbst repariert wird. Da die Bindung des O⁶-Methylguanins durch das Enzym irreversibel ist, wird dieses hierbei inaktiviert (Kaina et al., 2007).

Auf diesen Gegebenheiten beruht das Prinzip des *in vitro*-MGMT-Aktivitätstest, bei dem das im zu untersuchenden Zelllysat enthaltene MGMT die Übertragung einer radioaktiv-markierten Methylgruppe von der O⁶-Position eines Guanins aus einem DNA-Oligonukleotid katalysiert (Myrnes et al., 1984). Die hierbei von MGMT kovalent gebundene Radioaktivität in Form von Tritium kann mithilfe eines Flüssigszintillationszählers detektiert und quantifiziert werden, wobei die gemessene Radioaktivität proportional zur MGMT-Aktivität ist.

Für den MGMT-Aktivitätstest wurde Kalbsthymus-DNA verwendet, welche mit [³H]-MNU radioaktiv markiert wurde. Nach dreimaliger Ethanol-Fällung und Lösung in TE-Puffer war die DNA gebrauchsfertig.

200 µg Protein des zu untersuchenden Zellextrakts (s. 4.3.1) wurden mit 10 µl der Tritium-markierten DNA gemischt und mit Reaktionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Anschließend folgte eine Inkubation für 90 min bei 37°C, bei der die MGMT-Reaktion stattfand. Es folgte die Zugabe von 400 µl Trichloressigsäure (TCA) und 100 µg BSA. Danach wurden die Proben 30 min lang bei 95°C gekocht, was zur Hydrolyse der doppelsträngigen DNA führte. Durch Abkühlen der Proben auf Eis wurden die Proteine gefällt und durch Zentrifugation

bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min bei 4°C sedimentiert. Das Proteinsediment wurde dreimal mit 400 µl 5% TCA gewaschen und mit 100 mM NaOH-Lsg. hydrolysiert. Die Proben wurden mit 5 ml Szintillationslösung versetzt. Die durch MGMT gebundene Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationszähler gemessen. Da die MGMT-Reaktion irreversibel ist, korreliert die MGMT-Menge direkt mit der gemessenen Radioaktivität, so dass die MGMT-Aktivität nicht wie üblich in Units sondern in fmol/mg Gesamtprotein angegeben wird.

4.3.7 Western Blot

Mithilfe des Western Blots können relative Menge oder posttranslationale Modifikation eines Proteins innerhalb eines Zellextrakts oder eines Proteingemischs untersucht werden. Hierzu werden die Proteine durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach dem Lämmli-Verfahren ihrer Größe nach aufgetrennt. Das negativ geladene Detergens SDS bindet und entfaltet Proteine und „maskiert“ deren Eigenladung, so dass denaturierte SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis und ähnlichen hydrodynamischen Eigenschaften entstehen, welche im elektrischen Feld Richtung Anode wandern. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine durch elektrophoretischen Transfer aus dem Gel auf einer Membran (PVDF, Nitrozellulose) immobilisiert. Die Visualisierung des zu untersuchenden Proteins erfolgte mithilfe von spezifischen Antikörpern. Der Primärantikörper bindet an das Protein der Wahl. Der an den Primärantikörper bindende Sekundärantikörper ist mit einer Peroxidase oder einem IR-Farbstoffe gekoppelt und kann mit entsprechendem Nachweissystem detektiert werden.

4.3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zuerst wurde das Trenngel gegossen (5 bis 15%) und mit Isopropanol überschichtet. Sobald die Polymerisierung des Acrylamids (induziert durch APS als Radikalbildner und katalysiert durch TEMED) abgeschlossen war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Taschen für die Proben wurden durch Eintauchen eines Kamms in das Trenngel ausgespart. Die Zellextrakte wurden auf Eis aufgetaut. Nach Beladung der Proben in die Taschen des Trenngels erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung zusammen mit einem Protein- Größenstandard in 1 x SDS-Laufpuffer (Roti Load, s. 3.4) bei einer Spannung von 60 – 120 Volt.

4.3.7.2 Proteintransfer: ElektrobloTTing durch Anwendung der Nass-Blot-Methode

Vier Transferpapiere und eine Nitrozellulose-Membran wurden in Transferpuffer eingeweicht. Das Sammelgel wurde verworfen und die Komponenten wurden wie folgt luftblasenfrei angeordnet:

Anode
2 xTransferpapier
Nitrozellulose-Membran
Gel
2 xTransferpapier
Kathode

Der Transfer der Proteine erfolgte über Nacht bei 100 mA. Zur Entfernung des restlichen Transferpuffers wurde die Membran mit TBS gespült. Zur Abschätzung der Transfereffizienz und der Beladung sowie zur Markierung des Proteinmarkers mit Bleistift erfolgte eine dreiminütige Färbung der auf der Membran gebundenen Proteine mit Ponceau S-Lösung. Die Entfärbung erfolgte mit TBST.

4.3.7.3 Immunodetektion

Zur Immunodetektion des Zielproteins wurde die Membran, je nach Primärantikörper und Empfehlung des Herstellers, für 1 h bei RT in 3% MP-TBST bzw. 5% BSA-TBST geblockt. Die Bindung des Erstantikörpers (1:500 – 1:4000 in der entsprechenden Blocklösung) fand stets bei 4°C über Nacht statt. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min in TBST erfolgte die Inkubation der Membran in der Zweitantikörper-Lösung für 1 - 2 h. Bei Verwendung eines IR-Farbstoff-konjugierten Antikörpers erfolgte dieser Schritt im Dunkeln. Zur Entfernung ungebundener Zweitantikörper wurde die Membran erneut gewaschen (s. o.). Bei Verwendung eines IR-Farbstoff-konjugierten Zweitantikörpers wurde die Detektion des zu untersuchenden Proteins mithilfe des Odysseys durchgeführt. Wurde ein Peroxidase-konjugierter Zweitantikörper verwendet, so wurde die Membran für 3 min in Chemilumineszenz-Lösung inkubiert und anschließend mit Zellophan-Folie umhüllt. In der Dunkelkammer erfolgte die Exposition des Chemilumineszenzfilms innerhalb einer Entwicklungskassette. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Signalstärke und variierte, je nach Antikörper, zwischen ca. 3 s und 10 min. Nun wurde der Film 15 – 25 s lang in 20% Entwickler-Lösung und anschließend kurz in

Leitungswasser geschwenkt. Zur Fixierung wurde der Film für > 5 min in 20% Fixierlösung inkubiert und anschließend mit Leitungswasser gereinigt. Nach dem Einscannen konnte die Signalintensität der Banden mithilfe der Image J Software densitometrisch vermessen werden.

4.4 Tierversuch

Die Tierversuche wurden vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Mainzer Str. 112, 56068 Koblenz genehmigt und entsprechend der Vorgaben des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt.

NOD SCID®-Mäuse (NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd) wurden Arbeitsgruppe Jonuleit (Hautklinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz) bezogen. Für die Tierversuche wurden sie in einer Pathogen-freien Umgebung mit 12 Stunden Tag-/Nachtzyklus bei einer Temperatur von 22 – 24 °C gehalten. Futter und Wasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

Die praktische Arbeit des Tierexperiments bis einschließlich der Tötung der Mäuse wurde durch Georg Nagel verrichtet. Durch Teilnahme an versuchstierkundlichen Kursen nach Richtlinien der FELASA (*Federation for Laboratory Animal Science Associations*) ist er geschult und geübt im Umgang mit Mäusen. Für das Experiment wurden vier Mäuse mit einem Körpergewicht von 20 – 25 g zufällig in zwei Gruppen mit je 2 Tieren aufgeteilt. 8×10^6 A375-Melanomzellen wurden subkutan in die Flanken eines jeden Tieres injiziert. Nach 22 Tagen hatte jede Maus zwei Tumore geeigneter Größe. Nun wurden 30 mg/kg O⁶BG (gelöst in 33% PEG 400, 66% PBS, steril) intraperitoneal injiziert. Zwei Stunden später erfolgte die intraperitoneale Injektion von FM (gelöst in 25% Ethanol, 75% 0,9% NaCl-Lsg., steril) mit einer Dosis von 70 mg/kg, während die beiden Kontrollmäuse nur die Ethanol-NaCl-Lsg. erhielten. 40 h nach FM-Behandlung wurden die Tiere nach Tierschutzvorgaben (TierSchG, §4) getötet. Die Tumore wurden mittels Sektion entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

Die Aufarbeitung der Proben für Western Blot und PCR ist in Kapitel 4.3.3 und 4.2.9.1b beschrieben.

4.5 Statistiken

Allen quantitativen Analysen liegen jeweils die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten zu Grunde. Die Daten wurden mithilfe der Software Graph Pad Prism v3.0.2 analysiert, wobei die automatisch berechneten Mittelwerte graphisch aufgetragen wurden. Die in den Abbildungen dargestellten Fehlerbalken

wurden automatisch berechnet und geben die so genannte Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard error of the mean*, SEM) wieder. Sie ist der Quotient aus Standardabweichung und der Quadratwurzel der Probenzahl.

$$SEM = \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{n}},$$

wobei n = Anzahl Messwerte,
 \bar{x} = empirischer Mittelwert
 x_i = Messwert x bei Probe i

Zur Überprüfung der Signifikanz der gemessenen Unterschiede zwischen zwei Gruppen (Zelllinie 1 vs. Zelllinie 2 oder behandelt vs. unbehandelt) wurden P-Werte mit dem ungepaarten T-Test berechnet und folgendermaßen angegeben: * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Resistenz menschlicher maligner Melanom-Zelllinien gegenüber dem ICL-induzierenden Zytostatikum Fotemustin

Die Resistenz gegenüber jeglicher Therapieform ist ein Charakteristikum des metastasierenden malignen Melanoms, welches diese Krankheit zu einer der verheerendsten Neoplasien macht. Zur Chemotherapie des malignen Melanoms wird häufig das ICL-induzierende Zytostatikum Fotemustin eingesetzt. Obwohl ICL eine der gefährlichsten und toxischsten DNA-Läsionen sind, ist die Ansprechrate der Tumore auf die Behandlung mit FM sehr schlecht. Die der Resistenz zugrunde liegenden Mechanismen sind weitgehend unbekannt. Im folgenden Kapitel werden Melanomzellen bezüglich ihrer Resistenz gegenüber FM untersucht, die durch die Behandlung ausgelösten zellulären Reaktionen genauer beleuchtet und mögliche Resistenzmechanismen der Zellen aufgezeigt. Bei der Betrachtung der folgenden Ergebnisse ist zu beachten, dass in allen Versuchen eine Depletion von MGMT (s. 2.3.1) mit dem spezifischen Inhibitor O⁶BG vorgenommen wurde (Dolan et al., 1990), um MGMT-Aktivitäts-bedingte Unterschiede zwischen den Zelllinien zu eliminieren.

5.1.1 Untersuchung der Sensitivität menschlicher maligner Melanom-Zelllinien gegenüber FM

Zur Bestimmung der Sensitivität maligner Melanom-Zelllinien gegenüber FM wurden diese mit einer FM-Dosis von 32 μ M behandelt. Fety und Kollegen haben gezeigt, dass in der Therapie des Melanoms Serumspiegel von 5 – 26 μ M (1,65 – 7,9 μ g/ml) erreicht wurden (Fety et al., 1992); die in den folgenden Experimenten verwendete Dosis von 32 μ M liegt somit leicht über den in der Therapie erreichten Serumspiegeln. 24 bis 144 h nach Behandlung erfolgte die Bestimmung der SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer.

In **Abb. 7A** ist dargestellt, dass die verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich auf die FM-Behandlung reagierten. Ein Anstieg der Apoptose-Rate wurde frühestens 48 h nach FM-Behandlung beobachtet. Die Apoptose-Raten der Zelllinien D05 (p53wt), D14 (p53mt), RPMI-7951(p53mt) und MeWo (p53mt) nehmen bis 144 h nach Behandlung zu, während die Zelllinien A375 (p53wt), G361 (p53wt) und Malme-3M (p53wt) resistent sind. Da die Sensitivität der Zelllinien mit ihrem p53-Status in

Verbindung stehen könnte, wurde eine durch FM verursachte Stabilisierung von p53 und Steigerung seiner transkriptionellen Aktivität in einem Zelllinienpaar bestehend aus einer p53wt (D05) und einer p53mt (D14) Zelllinie exemplarisch untersucht.

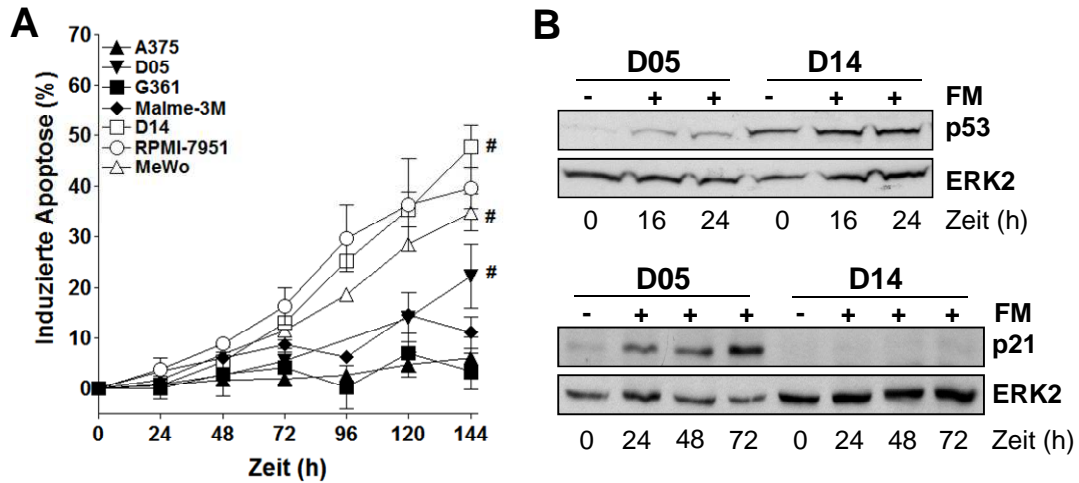


Abb. 7: Untersuchung der Apoptose-Induktion und p53-Aktivierung nach FM-Behandlung (32 μ M) in menschlichen malignen Melanom-Zelllinien. (A) Kinetik der Apoptose-Induktion durch FM 24 bis 144 h nach Behandlung. Die SubG1-Fraktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten. #: Daten von Dr. Steffen Naumann. (B) Western Blot-Analyse der p53- und p21-Proteinmengen in Kernextrakten von D05 (p53wt) und D14 (p53mt) Zellen nach FM-Behandlung. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Während in D05-Zellen bereits 16 h nach FM-Behandlung ein Anstieg der p53-Menge zu sehen war, wiesen D14-Zellen bereits eine hohe basale p53-Menge auf, die 24 h nach Behandlung nicht anstieg (**Abb. 7B, oben**). FM verursachte in D05-Zellen 24 bis 72 h nach Behandlung einen kontinuierlichen Anstieg von dem durch p53 transkriptionell regulierten Proteins p21, während in D14-Zellen die p21-Proteinmenge zu allen Zeitpunkten unter der Detektionsgrenze blieb (**Abb. 7B, unten**).

Die in **Abb. 7** gezeigten Ergebnisse werfen die Frage auf, ob in Melanom-Zelllinien eine Korrelation zwischen dem p53-Status und der Resistenz gegenüber FM besteht. Sie eine durch FM verursachte Stabilisierung und Aktivierung von p53 in D05-Zellen, welche in den p53mt D14-Zellen nicht zu sehen war.

5.1.2 Untersuchung einer Verbindung zwischen dem p53-Status und einer Resistenz gegenüber FM

Ein möglicher Zusammenhang des p53-Status mit der Resistenz gegenüber FM sollte in einem isogenen Zellsystem untersucht werden. Hierzu wurden D05-Klone etabliert, welche durch stabile Expression einer shRNA gegen p53 einen p53

Knockdown aufweisen. Diese Zellen werden im Folgenden als „shp53“ bezeichnet. Ihre als Kontrollzellen fungierenden Pendant, welche lediglich mit dem Leervektor transfiziert wurden, werden als „empty“ bezeichnet. Durch Untersuchung der Proliferation mithilfe von Wachstumskurven wurde ausgeschlossen, dass der p53 *Knockdown* eine Erhöhung der Proliferations-Rate bewirkt. Damit ist der Ausfall von p53 ursächlich für die mögliche Sensitivierung der Melanomzellen gegenüber FM verantwortlich.

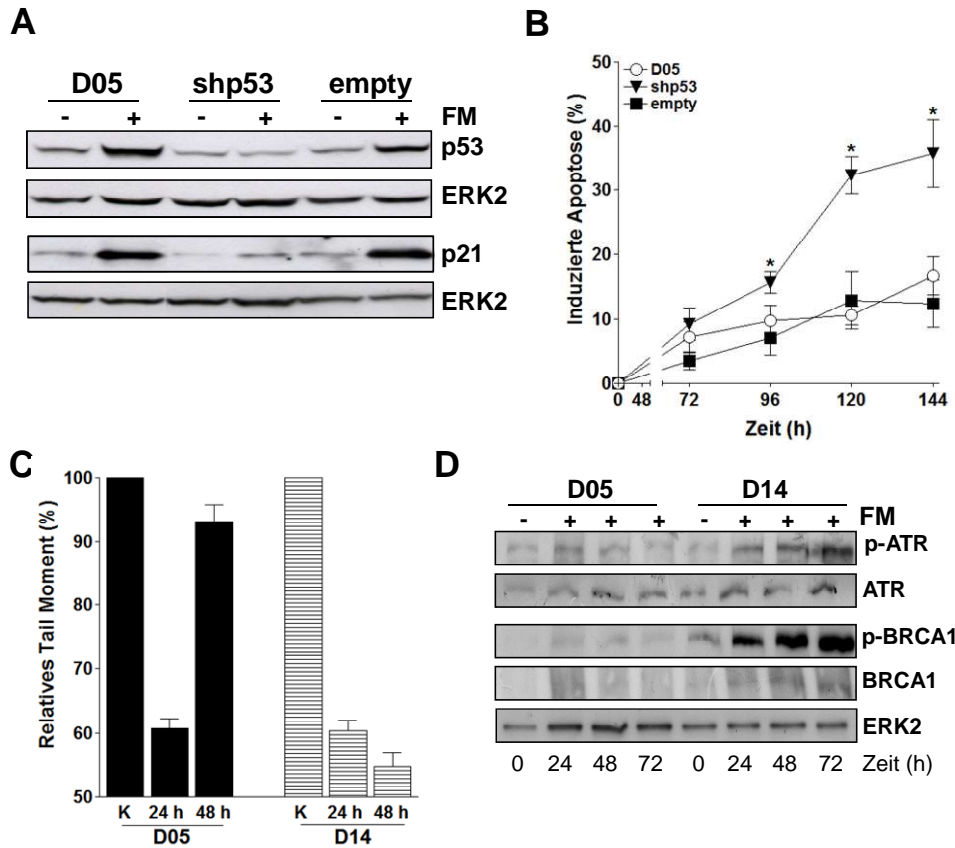


Abb. 8: Untersuchung des Einflusses von p53 auf maligne Melanom-Zelllinien bezüglich ihrer Resistenz gegenüber FM, ICL-Reparaturkapazität und DNA-Schadensantwort. (A) Verifizierung des p53 *Knockdowns* in D05-Zellen mittels Western Blot. Hierzu wurden p53- und p21-Mengen in Kernextrakten von D05-, shp53- und *empty*-Zellen 48 h nach FM-Behandlung (64 μ M) analysiert. ERK2 diente als Ladekontrolle. **(B)** Kinetik der Apoptose-Induktion durch FM (32 μ M) 72 bis 144 h nach Behandlung. Die SubG1-Fraktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * P < 0,05. **(C)** Untersuchung der ICL-Reparaturkapazität der D05 (p53wt) und D14 (p53mt)-Zellen. 24 und 48 h nach FM-Behandlung (32 μ M) wurden die Proben mithilfe des ICL *Comet* Assays analysiert. Dargestellt ist das Relative *Tail Moment* (RTM) im Verhältnis zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (RTM = 100%) **(D)** Western Blot-Analyse der ATR- und BRCA1-Gesamtproteinmengen sowie der entsprechenden Phosphoproteinmengen (p-BRCA1^{Ser1524} und p-ATR^{Ser428}) in Gesamtzellextrakten von D05 (p53wt) und D14 (p53mt)-Zellen nach FM-Behandlung (32 μ M). ERK2 diente als Ladekontrolle.

In **Abb. 8A** ist die Verifizierung des p53 *Knockdowns* mittels Western Blot dargestellt. Wie erwartet sind die basalen p53-Proteinmengen im shp53-Klon geringer als im *empty*-Klon und in der parentalen Zelllinie. Während sowohl in der

parentalen D05-Zelllinie als auch im *empty*-Klon ein Anstieg der p53-Mengen nach FM-Behandlung (64 μ M, 48 h) nachzuweisen war, war dieser im shp53-Klon nicht zu beobachten. In Übereinstimmung mit den für p53 gemachten Beobachtungen waren die Ergebnisse für p21, dessen Gen *CDKN1A* ein klassisches p53-Zielgen ist. Die basale p21-Menge war in shp53-Zellen niedriger als in den beiden Kontrollzelllinien D05 und D05 *empty*. Dies ging ebenso mit einer schwächeren FM-vermittelten p21-Induktion in den shp53-Zellen im Vergleich mit ihren beiden Kontrollzelllinien einher.

Die Sensitivität der drei Zelllinien wurde 72 bis 144 h nach FM-Behandlung (32 μ M) durch Bestimmung der SubG1-Fraktion ermittelt (**Abb. 8B**). Der shp53-Klon war deutlich sensitiver als der *empty*-Klon und auch als die parentale Zelllinie. Er wies eine signifikant erhöhte Apoptose-Rate auf (Signifikanzberechnungen beziehen sich auf *empty*-Klon), welche nach 144 h knapp 40% erreichte. Die Depletion von p53 führte somit zur Sensitivierung der D05-Melanomzellen gegenüber FM.

Da p53 eine bedeutende Rolle bei der Stimulation der DNA-Reparatur spielt (s. 2.3.2.1 und Sengupta und Harris, 2005) sollte überprüft werden, ob p53wt Zellen eine höhere ICL-Reparaturkapazität aufweisen. Diese könnte der Resistenz der p53wt Zellen gegenüber FM zugrunde liegen. Für diese Versuche wurde das bezüglich ihres p53-Status charakterisierte (s. **Abb. 7B** und Naumann et al., 2009) Zelllinienpaar D05 und D14 herangezogen. Mithilfe des ICL *Comet* Assays wurden die relativen ICL-Mengen in der DNA von D05 und D14-Zellen nach FM-Behandlung untersucht. Wie **Abb. 8C** zeigt, wurde 24 h nach FM-Behandlung (32 μ M) in beiden Zelllinien eine ähnlich starke FM-induzierte Verknüpfung der DNA-Stränge detektiert. 48 h nach FM-Behandlung stieg das *Relative Tail Moment* (%) in den D05-Zellen auf nahezu den Ausgangswert an, was einer Reparatur der *Crosslinks* entspricht. Dieser Anstieg blieb in den D14-Zellen aus. Diese Daten belegen eine Verbindung zwischen dem p53-Status und der ICL-Reparaturkapazität.

Aufgrund der geringeren Reparatur der ICL in den D14-Zellen ist anzunehmen, dass D14-Zellen eine stärkere DNA-Schadensantwort (DDR) als D05-Zellen aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden die Mengen der DDR-Proteine ATR und BRCA1 und ihrer phosphorylierten Formen per Western Blot untersucht. Zwischen D05- und D14-Zellen war kein Unterschied in den Gesamt-ATR-Mengen nachzuweisen. Allerdings konnte in den D14-Zellen 24 bis 72 h nach FM-Behandlung (32 μ M) ein Anstieg der Gesamt-BRCA1-Mengen detektiert werden (**Abb. 8D**). Die FM-Behandlung führte in D05-Zellen zu keiner Veränderung der Phosphorylierung von ATM und BRCA1. In D14-Zellen war im Zeitverlauf ein kontinuierlicher Anstieg beider Phosphoproteine zu beobachten.

Zusammenfassend zeigen die in **Abb. 8** präsentierten Daten, dass das Tumorsuppressorprotein p53 menschlichen malignen Melanom-Zelllinien Resistenz gegenüber FM verleiht.

5.1.3 Analyse der basalen und FM-abhängigen Expression von DNA-Reparatur-Genen; Rolle von p53

Die Expression von NER-Genen sollte exemplarisch in D05 (p53wt)- und D14 (p53mt)-Zellen aus folgenden Gründen analysiert werden: 1) Proteine der NER sind in der Reparatur von ICL involviert (s. 2.3.4) und 2) die NER-Gene *DDB2* und *XPC* werden p53-abhängig reguliert (s. 2.3.2.1). Zusätzlich wurde die Expression von *BRCA1* untersucht, da es zum Einen ein bedeutendes DDR-Gen ist und bei der Reparatur von FM-induzierten Schäden von Bedeutung sein könnte (s. 2.3.3), zum Anderen spielt *BRCA1* eine Rolle bei der Transaktivierung von *DDB2* und *XPC* durch p53 (s. 2.3.2.1).

Abb. 9A zeigt die mRNA-Mengen der Gene *BRCA1*, *DDB2*, *ERCC1*, *XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPD*, *XPF* und *XPG* in unbehandelten Zellen sowie nach 6- und 24-stündiger FM-Behandlung (32 μ M). In beiden Zelllinien waren die mRNAs aller untersuchten Gene detektierbar. Nach 6 h war keinerlei Effekt der FM-Behandlung zu sehen. Während die FM-Behandlung in D05-Zellen 24 h nach Behandlung zu einer *DDB2*- und *XPC*-Induktion führte, wurde *BRCA1* ausschließlich in D14-Zellen transaktiviert. Letztere auf mRNA-Ebene gemachte Beobachtung deckt sich mit den per Western Blot-Analyse gewonnenen Ergebnissen bezüglich der *BRCA1*-Gesamtproteinmengen und der *BRCA1*-Phosphorylierung, die in **Abb. 8D** bereits vorgestellt wurden.

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Expression von *DDB2*, *XPC* und *BRCA1* wurde eingehender analysiert (**Abb. 9B**). Hierzu wurden FM-Dosen zwischen 0 und 128 μ M eingesetzt. In D05-Zellen war 24 h nach Behandlung bereits ab einer FM-Dosis von 16 μ M eine Induktion von *XPC* und *DDB2* zu beobachten, welche in D14-Zellen auch bei hohen FM-Dosen nicht erreicht werden konnte. Während in D14-Zellen die *BRCA1*-Induktion verifiziert werden kann, führen in der Zelllinie D05 auch hohe FM-Dosen bis zu 128 μ M nicht zu einem Anstieg der *BRCA1* mRNA-Menge.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die auf mRNA-Ebene beobachtete Transaktivierung von *XPC* und *DDB2* auch auf Proteinebene nachweisbar ist und wie sich die Induktion im Zeitverlauf darstellt. Die Behandlung von D05-Zellen mit 32 μ M FM führte in einem Zeitraum von 24 bis 72 h zu einem kontinuierlichen Anstieg der *XPC* und *DDB2*-Mengen; dies war in D14-Zellen nicht der Fall (**Abb. 9C**). Die

DDB2-Menge der D14-Zellen blieb beim hier gezeigten Blot unter der Detektionsgrenze, konnten aber durch längere Exposition sichtbar gemacht werden.

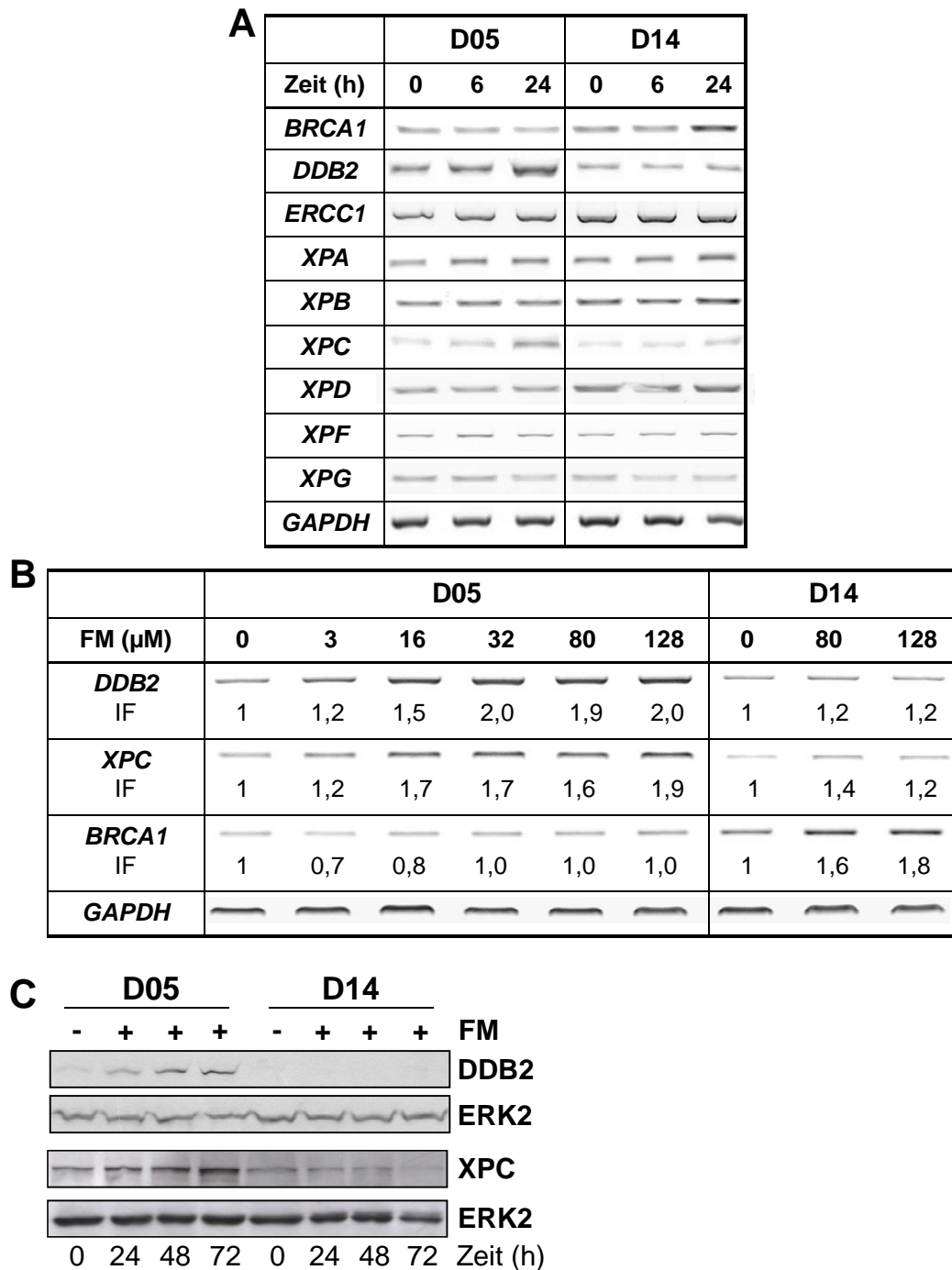


Abb. 9: Analyse der Expression der DNA-Reparatur-Gene *BRCA1*, *DDB2*, *ERCC1*, *XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPF* und *XPG* in D05 (p53wt) und D14 (p53mt) Melanom-Zelllinien mit und ohne FM-Behandlung. (A) Die Kinetik der Expression oben genannter DNA-Reparatur-Gene nach FM-Behandlung (32 µM) wurde mittels RT-PCR untersucht. Das Gen *GAPDH* („Housekeeping gene“) diente als interne Kontrolle für die eingesetzte cDNA-Menge. (B) Die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Regulation der *DDB2*-, *XPC*- und *BRCA1*-Genexpression wurde 24 h nach FM-Behandlung (32 µM) mittels RT-PCR untersucht. Die Induktionsfaktoren (IF) beschreiben die mRNA-Menge des jeweiligen Gens nach FM-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Das Gen *GAPDH* („Housekeeping gene“) diente als interne Kontrolle zur Normalisierung auf die eingesetzte cDNA-Menge. (C)

Western Blot-Analyse der XPC- und DDB2-Proteinmengen in Kernextrakten von D05- und D14-Zellen 24 bis 72 h nach FM-Behandlung (32 μ M). ERK2 diente als Ladekontrolle.

Die in **Abb. 8D** und **Abb. 9** gezeigten Daten zeigen eine FM-abhängige Regulation der Gene *BRCA1*, *XPC* und *DDB2* in malignen Melanomzellen auf, welche ab 24 h nach FM-Behandlung und bereits bei niedrigen Dosen von 16 μ M nachweisbar war.

5.1.4 Analyse der DDB2- und XPC-Induktion auf Proteinebene in weiteren p53wt und p53mt Zelllinien

Da das Tumorsuppressorprotein p53 ein wichtiger Transkriptionsfaktor für *DDB2* und *XPC* ist (s. 2.3.2.1), sollte seine Rolle bei der Transaktivierung dieser beiden Gene in Melanomzellen noch detaillierter untersucht werden. Die bereits in **Abb. 8** aufgeführten D05 p53shRNA-Klone bieten die Möglichkeit, die p53-Abhängigkeit der *DDB2*- und *XPC*-Induktion in einem isogenen Zellsystem zu bestätigen.

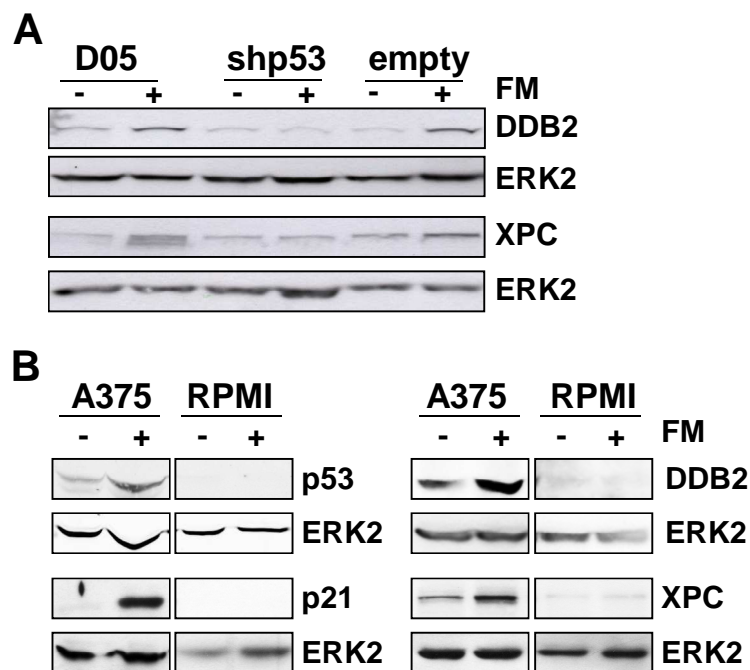


Abb. 10: Untersuchung der p53-Abhängigkeit der DDB2- und XPC-Induktion nach FM-Behandlung. (A) Mittels Western Blot wurden die Proteinmengen in Kernextrakten von unbehandelten und FM-behandelten (64 μ M, 48 h) D05-Zellen sowie p53shRNA-exprimierenden Zellen und ihren entsprechenden Leervektor-transfizierten Kontrollzellen (*empty*) analysiert. ERK2 diente als Ladekontrolle. **(B)** Western Blot-Analyse von p53-, p21-, DDB2 und XPC-Proteinmengen 24 h nach FM-Behandlung (32 μ M) in Gesamtzellextrakten von A375 (p53wt) und RPMI-7951 (p53mt)-Zellen. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Hierzu wurden die parentale Zelllinie, der *empty*-Klon und der shp53-Klon bezüglich ihrer FM-induzierten Transaktivierung von DDB2 und XPC untersucht. Während die parentale Zelllinie und der *empty*-Klon einen Anstieg der DDB2- und XPC-

Proteinmengen nach FM-Behandlung (64 μ M, 48 h) aufwiesen, konnte dieser im shp53-Klon nicht beobachtet werden (**Abb. 10A**).

Zusammenfassend lässt sich aus den in **Abb. 10** vorgestellten Daten schließen, dass die durch FM induzierte Transaktivierung von *DDB2* und *XPC* p53-vermittelt und eine generelle Reaktion von p53wt Melanomzellen ist.

5.1.5 Untersuchung der Rolle von XPC bei der Vermittlung der Resistenz gegenüber FM

5.1.5.1 Charakterisierung von A375 XPC shRNA- und *empty*-Zellen

Um die biologische Funktion der XPC-Induktion in p53wt Zellen genauer zu untersuchen, wurden A375-Klone etabliert, welche shRNA gegen *XPC* exprimieren und daher einen stabilen XPC *Knockdown* aufweisen. Diese Zellen werden im Folgenden als „shXPC“ bezeichnet. Ihre als Kontrollzellen fungierenden Pendanten wurden lediglich mit dem Leervektor transfiziert und werden als „*empty*“ bezeichnet. Diese beiden Klone wurden zunächst bezüglich ihrer XPC-Expression, ihres p53-Status und der Funktionalität des *Knockdowns* charakterisiert.

Die **Abb. 11A** präsentiert die mittels Western Blot analysierten XPC-Proteinmengen der beiden Klone. Der shXPC-Klon zeigt einen XPC *Knockdown*; die densitometrische Vermessung der Banden ergab nach Normalisierung auf die Intensität der ERK2-Banden, dass die XPC-Proteinmenge um 70% reduziert wurde. Die *Real-time* PCR-Analysen der *XPC* mRNA-Menge bestätigten die im Western Blot erhaltenen Ergebnisse (**Abb. 11B**): Die basale *XPC* mRNA-Menge beträgt im shXPC Klon nur noch 55%. Die Behandlung des *empty*-Klons mit FM (32 μ M, 24 h) resultierte in einer Erhöhung der *XPC* mRNA-Menge auf das 2,1-fache der basalen Expression. Im shXPC-Klon führte die FM-Behandlung ebenfalls zu einer XPC-Induktion; die *XPC* mRNA-Menge blieb aber unter dem des behandelten *empty*-Klons.

XPC ist ein bedeutender Faktor bei der Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden (s. 2.3.2); eine Verminderung der XPC-Proteinmengen sollte folglich zu einer Sensitivierung gegenüber UV-Licht führen. Diese Tatsache wurde zu Nutze gemacht, um die Funktionalität des *Knockdowns* durch Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht zu verifizieren. Der shXPC-Klon sowie der *empty*-Klon wurden mit UVC-Licht (20 J/m^2) bestrahlt. 72 h später wurde die SubG1-Fraktion durchflusszytometrisch ermittelt. Wie erwartet reagierten die XPC *Knockdown*-Zellen sensitiver auf die Bestrahlung (**Abb. 11C**): Sie induzierten 1,7x so viel Apoptose wie die *empty*-Zellen.

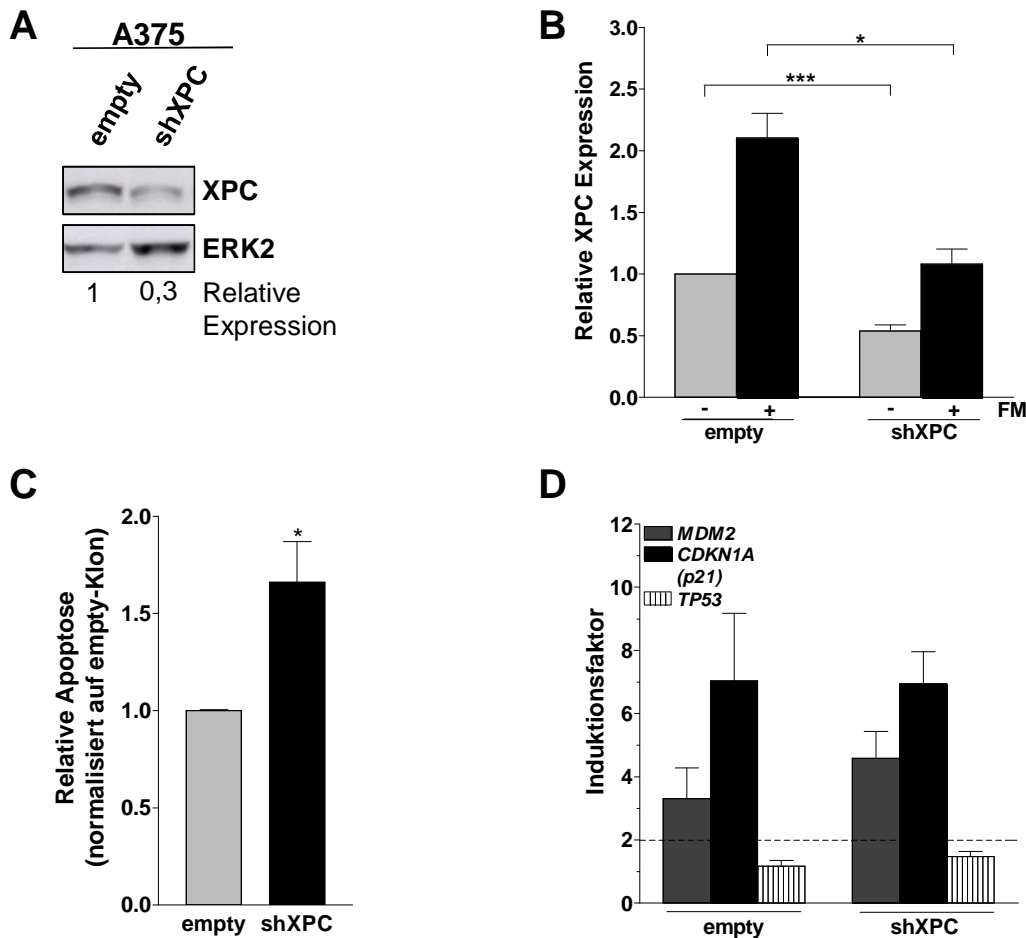


Abb. 11: Charakterisierung der A375 empty- und XPC shRNA-Klone. (A) Verifizierung des *Knockdowns* von XPC auf Proteinebene mittels Western Blot. Die relative XPC-Expression ergibt sich durch Vergleich der XPC-Signalintensität der shXPC-Zellen mit der XPC-Signalintensität der empty-Kontrollzellen nach Normalisierung auf die eingesetzte Proteinmenge mithilfe der ERK2-Signalintensität der jeweiligen Probe. **(B)** Verifizierung des *Knockdowns* auf mRNA-Ebene mittels *Real-time* PCR in sowohl unbehandelten als auch in FM-behandelten empty- und shXPC-Zellen. Dargestellt sind die relativen XPC mRNA-Mengen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (IF = 1) des empty-Klons nach Normalisierung auf die eingesetzte cDNA-Menge mithilfe der Gene („Housekeeping genes“) *GAPDH* und *ACTB*. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. **(C)** Die induzierte Apoptose in empty- und shXPC-Zellen nach Bestrahlung mit 20 J/m^2 UVC wurde durch Messung der SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer ermittelt. Die Daten wurden auf die in empty-Zellen induzierte Apoptose normalisiert und repräsentieren drei unabhängige Experimente. * $P < 0,05$. **(D)** Verifizierung des p53wt-Status des empty- und shXPC-Klons durch Überprüfung der FM-induzierten Transaktivierung der p53-Zielgene *MDM2* und *CDKN1A* (p21) mittels *Real-time* PCR. *TP53* diente als Negativkontrolle. Die Induktionsfaktoren (IF) beschreiben die mRNA-Mengen der verschiedenen Gene nach FM-Behandlung im Vergleich zur mRNA-Menge in den jeweiligen unbehandelten Kontrollen (IF = 1, nicht dargestellt) nach Normalisierung auf die eingesetzte cDNA-Menge mithilfe der Gene *GAPDH* und *ACTB*. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren sollte sichergestellt werden, dass keine Mutationen (beispielsweise während der klonalen Selektion) im *TP53*-Gen aufgetreten sind. Hierzu wurde mittels *Real-time PCR* die Induktion der beiden p53-Zielgene *CDKN1A* (p21) und *MDM2* nach FM-Behandlung überprüft. **Abb. 11D** zeigt, dass sowohl die *CDKN1A* als auch die *MDM2* mRNA-Mengen in beiden Klons nach FM-Behandlung ($32 \mu\text{M}$,

24 h) anstiegen. Im *empty*-Klon erhöhte sich die *CDKN1A* mRNA-Menge auf das 7-fache des basalen Werts, die *MDM2*-Menge auf das 3,3-fache. Im shXPC-Klon stieg die *CDKN1A* mRNA-Menge ebenfalls auf das 7-fache, die *MDM2*-Menge auf das 4,6-fache. *TP53* mRNA konnte in beiden Klonen nachgewiesen werden und diente als Negativkontrolle. Die in **Abb. 11D** vorgestellten Ergebnisse lassen auf einen p53wt-Status beider Klone schließen.

Aus den in **Abb. 11** vorgestellten Experimenten lässt sich schließen, dass die A375 shXPC-Zellen und ihre *empty*-Kontrollzellen einen funktionalen XPC *Knockdown* aufweisen. Sie sind somit für weitere Untersuchungen zur Rolle von XPC bei der Resistenzvermittlung gegenüber FM geeignet.

5.1.5.2 Untersuchung der Sensitivität der A375 XPCshRNA-exprimierenden Zellen gegenüber FM

Nachdem die shXPC-Zellen und ihre *empty*-Kontrollzellen charakterisiert waren, sollte eine mögliche erhöhte Sensitivität der shXPC-Zellen gegenüber FM untersucht werden. Hierzu wurden shXPC- und ihre *empty*-Kontroll-Zellen für 96 h mit FM behandelt. Hierbei wurden neben der üblichen Dosis von 32 μM auch zwei höhere FM-Dosen (80 μM und 128 μM) eingesetzt, die allerdings klinisch nicht relevant sind.

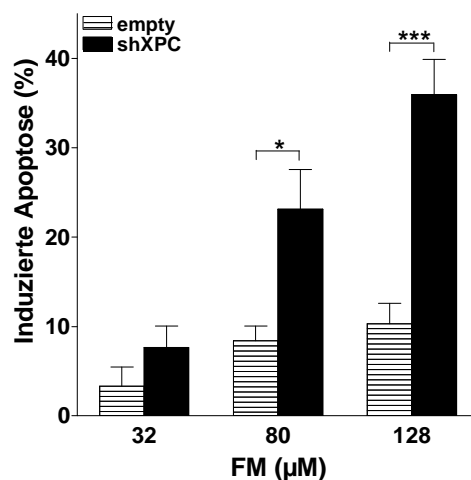


Abb. 12: Untersuchung der Apoptose-Induktion in A375 *empty*- und XPCshRNA-Zellen nach Behandlung mit FM (32, 80, 128 μM). 96 h nach FM-Behandlung wurden die SubG1-Fractionen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Die Bestimmung der SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer ergab, dass beide Klone resistent gegenüber der FM-Dosis von 32 μM waren (**Abb. 12**). Die apoptotische Fraktion des *empty*-Klons nach Behandlung mit 32 μM FM deckt sich mit der in **Abb. 7A** dargestellten apoptotischen Fraktion der parentalen Zelllinie von

2,6%. Ab einer Dosis von 80 μM reagierten shXPC-Zellen sensitiver auf FM als die *empty*-Zellen. Bei der FM-Dosis von 128 μM erreicht die Apoptose-Rate der shXPC-Zellen 35,9%, während sie in den *empty*-Zellen nur 10,3% beträgt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Reduktion der XPC-Menge im hier untersuchten Melanom-Zellsystem zu einer Sensitivierung der Zellen führt. Dies war allerdings erst bei höheren FM-Dosen als die üblich verwendete (32 μM) zu beobachten.

5.1.6 Untersuchung der Dauer der durch FM ausgelösten Induktion von XPC und DDB2

Ein in der Klinik angewendetes Therapieschema zur Behandlung des metastasierten Melanoms mit FM umfasst die wiederholte Verabreichung des Medikaments in einem Abstand von einer Woche (Avril et al., 2004; Gill et al., 2007; Mornex et al., 2003; Siegel et al., 2007). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die durch FM ausgelöste Induktion von XPC und DDB2 ein mehrere Tage anhaltender Effekt ist, welcher Resistenz gegenüber einer weiteren Behandlungsdosis verursachen könnte (*Adaptive response*).

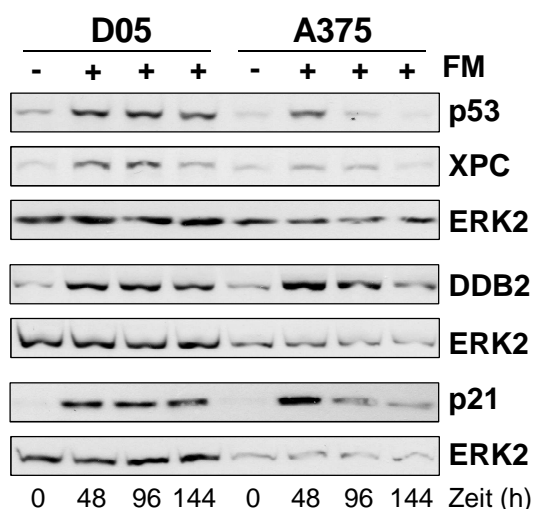


Abb. 13: Untersuchung der Persistenz der durch FM ausgelösten Aktivierung von p53 und Induktion von XPC, DDB2 und p21. Mittels Western Blot-Analyse wurden die Proteinmengen in Gesamtzellextrakten 48, 96 und 144 h nach Behandlung (20 $\mu\text{g/ml}$) bestimmt. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Die in **Abb. 13** dargestellten Western Blots zeigen in D05-Zellen bis zu 144 h nach FM-Behandlung eine Stabilisierung von p53, welche mit verstärkter Expression der p53-Zielgene XPC, DDB2 und p21 einherging. In A375-Zellen ließ sich bis 96 h nach FM-Behandlung eine Induktion aller vier untersuchten Proteine feststellen. 144 h nach Behandlung befanden sich die Proteinmengen von p53, XPC und DDB2

wieder auf Kontrollniveau. Nur im Falle von p21 wurden 144 h nach Behandlung noch erhöhte Proteinmengen nachgewiesen.

Zusammenfassend zeigen die in **Abb. 13** dargestellten Daten, dass die durch FM ausgelöste Induktion von XPC und DDB2 lang andauernd ist und sogar bis zu 144 h persistieren kann.

5.1.7 Untersuchung der Expression von DNA-Reparatur-Genen *in vivo*

Zur Bearbeitung der Fragestellung, ob die in Melanom-Zelllinien gewonnenen Daten zur FM-vermittelten Stabilisierung von p53 und Transaktivierung seiner DNA-Reparatur-Zielgene *XPC* und *DDB2* auch auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind, wurde ein A375 Xenograft-Mausmodell etabliert.

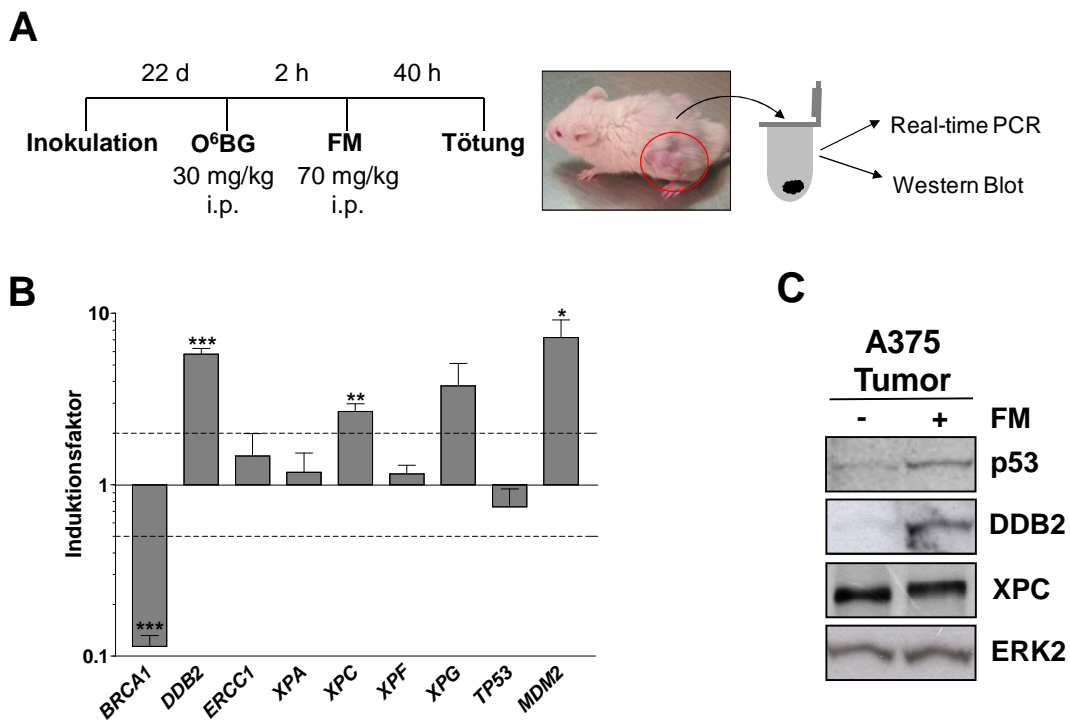


Abb. 14: Untersuchung der FM-induzierten DNA-Schadensantwort *in vivo* mithilfe eines A375 (p53wt) Xenograft-Modells. (A) Übersicht über das durchgeführte Tierexperiment. A375-Zellen wurden subkutan in die Flanken von 4 Mäusen injiziert, so dass sowohl die Kontroll- als auch die FM-Gruppe je zwei Tiere mit je zwei Tumoren enthielt. 22 Tage nach Inokulation der Zellen hatten die Tumore eine geeignete Größe erreicht. Eine systemische MGMT-Depletion wurde durch die Injektion von O⁶BG erzielt. 2 h nach O⁶BG-Behandlung wurde FM i.p. injiziert. 40 h später erfolgte die Entnahme der Tumore für *Real-time* PCR- und Western Blot-Analysen. **(B)** Untersuchung der FM-abhängigen Regulation der DNA-Reparatur-Gene *BRCA1*, *DDB2*, *ERCC1*, *XPA*, *XPC*, *XPF* und *XPG*. *TP53* diente als Negativkontrolle, *MDM2* als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier Wiederholungen mit zufällig gepaarten Proben der je vier Kontroll- und je vier behandelten Tumoren. Die Induktionsfaktoren (IF) beschreiben die mRNA-Mengen der verschiedenen Gene nach FM-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (IF = 1) nach Normalisierung auf die eingesetzte cDNA-Menge mithilfe der Gene *GAPDH* und *ACTB* („Housekeeping genes“). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. **(C)** p53-, DDB2 und XPC-Proteinmengen in unbehandelten und FM-behandelten A375-Tumorproben. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Eine Übersicht über den Zeitverlauf des Tierversuchs findet sich in **Abb. 14A**.

Die A375-Tumore wurden 40 h nach Behandlung der Mäuse mit FM entnommen. Mittels *Real-time* PCR wurde die Expression der DNA-Reparatur-Gene *BRCA1*, *DDB2*, *ERCC1*, *XPA*, *XPC*, *XPF* und *XPG* nach FM-Behandlung der Tiere in den Tumoren bestimmt. Als Positivkontrolle wurde das p53-Zielgen *MDM2*, als Negativkontrolle *TP53* selbst untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 14B** dargestellt. Die Behandlung mit FM hatte auf die Expression der Gene *ERCC1*, *XPA* und *XPF* keinen Effekt. Auch die Negativkontrolle *TP53* blieb wie erwartet unbeeinflusst. Die FM-Behandlung verursachte eine Zunahme der *XPG* mRNA-Menge (IF = 3,8), welche jedoch nicht signifikant ist. Zudem führte FM zu einer Reduktion der *BRCA1* mRNA-Menge (IF = 0,1) und einer Steigerung der mRNA-Menge der p53-responsiven Gene *MDM2* (Positivkontrolle, IF = 7,2), *DDB2* (IF = 5,8) und *XPC* (IF = 2,7).

Per Western Blot wurde überprüft, ob die Induktion von *DDB2* und *XPC* und eine gleichzeitige Stabilisierung von p53 auch auf Proteinebene stattfinden. In **Abb. 14C** ist gezeigt, dass die FM-Behandlung zu einem Anstieg der Menge sowohl von p53- als auch von *DDB2* führte. Für *XPC* konnte allerdings keine verstärkte Expression detektiert werden. Der in **Abb. 14** vorgestellte Tierversuch belegt, dass die Behandlung von Tumoren mit FM *in situ* durch systemische Gabe des Zytostatikums zu einer Heraufregulation der DNA-Reparatur-Gene *DDB2* und *XPC* in den Tumoren führt.

5.2 Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Sensitivität von menschlichen malignen Melanom-Zelllinien gegenüber alkylierenden Agenzien

Zur Therapie des metastasierenden malignen Melanoms werden häufig die alkylierenden Agenzien Temozolomid und Fotemustin eingesetzt. Jedoch beträgt das Ansprechen der Tumore auf diese Medikamente je nach Studie maximal 25% (s. 2.1.3.4). Die mediane Überlebenszeit der Patienten beträgt bei dieser Therapie nur 6 Monate. Aus diesen Gründen kommt der Suche nach Substanzen, welche das Ansprechen der Melanomzellen auf alkylierende Agenzien verbessern ohne gleichzeitig die Toxizität für den Gesamtorganismus zu erhöhen, eine große Bedeutung zu.

Für die Wirkstoffgruppe der Histondesacetylase-Inhibitoren ist solch ein für Tumorzellen spezifischer Effekt der Sensitivierung gegenüber DNA-schädigenden Chemotherapeutika nachgewiesen worden (s. 2.4.3). Zu ihrer Gruppe zählt

Valproinsäure, ein in der Epilepsie-Therapie etabliertes Medikament mit guter Verträglichkeit (s. 2.4.4).

Im folgenden Kapitel werden die Untersuchungen zum Effekt von VPA auf menschliche maligne Melanomzellen und deren Sensitivierung gegenüber alkylierenden Agenzien vorgestellt. Zum besseren Verständnis der Experimente wird in

Abb. 15 eine allgemeine Übersicht über den Versuchsaufbau gegeben:

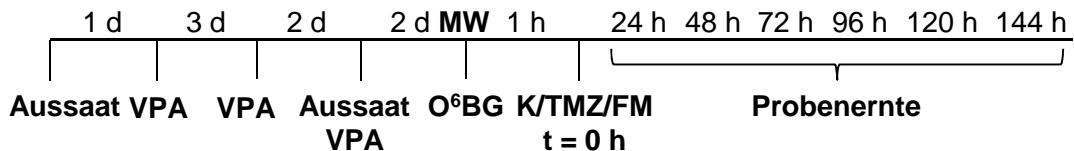


Abb. 15: Übersicht über den Experiment-Aufbau. Nach siebentägiger Vorbehandlung mit VPA (1 mM) erfolgte ein Mediumwechsel und je nach Versuchsaufbau die Behandlung mit O⁶BG und/oder dem Alkylanz.

5.2.1 Untersuchung des Einflusses von VPA auf p53

p53 ist ein bedeutendes Zielprotein von HDACs. Die Inhibition von HDACs führt zur Stabilisierung von „wildtypischem“ p53 und zur Degradation der mutierten Form des Proteins (Blagosklonny et al., 2005; Li et al., 2011; Spange et al., 2009). Zur Überprüfung der Aktivität von VPA in D05- und D14-Zellen wurde daher die p53-Proteinmenge nach VPA-Behandlung per Western Blot analysiert.

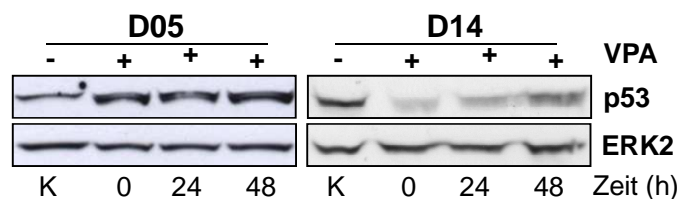


Abb. 16: Untersuchung des Einflusses von VPA auf p53. Western Blot-Analyse der p53-Mengen in D05- und D14-Kernextrakten. Die Proben waren entweder unbehandelt (K) oder wurden zum Ende der Vorbehandlung (t = 0 h) oder 24 bzw. 48 h danach geerntet. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Während in D05-Zellen ein Anstieg der p53-Proteinmenge zu beobachten war, der auch noch 48 h nach Auswaschen der VPA anhielt, führte die VPA-Behandlung von D14-Zellen zu einer Degradation des mutierten p53-Proteins. 48 h nach Behandlungsende wurden die ursprünglichen p53-Mengen wieder erreicht. Die hier dargestellten Ergebnisse stimmen mit denen der Literatur überein: der allgemein beschriebene Effekt von VPA auf p53 konnte sowohl in der p53wt (D05)- als auch in der p53mt (D14)-Zelllinie nachgewiesen werden.

5.2.2 Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Sensitivität von D05-Zellen gegenüber TMZ und FM

Zur Identifizierung eines möglichen Effekts von VPA auf die Sensitivität von D05-Zellen wurde sowohl die Kinetik der Apoptose-Induktion nach Behandlung mit klinisch relevanten Dosen von TMZ (50 μM) und FM (32 μM) als auch die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Alkylanzien-Konzentration und Zelltod-Induktion untersucht.

Zunächst ist festzuhalten, dass VPA in D05-Zellen nur schwach toxisch war: die Toxizität schwankte in den gewählten Untersuchungszeitpunkten (24 – 144 h nach Ende der Vorbehandlung) bei D05-Zellen zwischen 2,5 und 7,5%.

Wie in **Abb. 17A** und **Abb. 17B** indirekt über Ermittlung der SubG1-Fraktion gezeigt, verursachte VPA keine biologisch relevante Verminderung der MGMT-Aktivität in der MGMT-profizienten Zelllinie D05: Das Fehlen der O⁶BG-Vorbehandlung ging mit einer Resistenz gegenüber TMZ und FM einher. Bei gleichzeitiger MGMT-Depletion führt die VPA-Vorbehandlung zu einer signifikanten Sensitivierung von D05-Zellen gegenüber TMZ, welche ab 72 h nach Behandlung zu beobachten war (**Abb. 17A**). 120 h nach Behandlung war der Unterschied zwischen der Apoptose-Rate der nur TMZ-behandelten Zellen im Vergleich zu den VPA und TMZ-behandelten Zellen am größten: Die Apoptose-Rate der VPA-vorbehandelten Zellen war mit 29,6% 2,7-mal so hoch wie die der nur mit TMZ behandelten Zellen.

Ähnliches zeigte sich für FM (**Abb. 17B**): 48 h nach Behandlung war eine signifikante VPA-vermittelte Sensitivierung der Zellen zu beobachten. 120 h nach Behandlung war die Apoptose-Rate der VPA-vorbehandelten Zellen mit 34,5% 2,3-mal so hoch wie die der alleinig mit FM behandelten Zellen. In den **Abb. 17C** und **Abb. 17D** sind die mittels AnnexinV/PI-Färbung gewonnenen Dosis-Wirkungs-Kurven für TMZ und FM dargestellt, welche die in **Abb. 17A** und **Abb. 17B** mittels SubG1-Messung gewonnenen Ergebnisse bestätigen.

Ab einer TMZ-Dosis von 15 μM war eine VPA-induzierte Sensitivierung der D05-Zellen zu beobachten, welche bis zur maximal untersuchten Dosis von 70 μM erhalten blieb (**Abb. 17C**). Die Erhöhung der TMZ-Konzentration ging bis 50 μM mit einem Anstieg der Zelltod-Raten der sowohl nur TMZ-behandelten Zellen als auch der VPA- und TMZ-behandelten Zellen einher. Die Zelltod-Raten der VPA-vorbehandelten Zellen erreichte hier 30,7% und war damit doppelt so hoch wie die der nur mit TMZ behandelten Zellen. Bei einer Dosis von 70 μM war in beiden Behandlungsgruppen ein Absinken der Zelltod-Raten zu beobachten. Die VPA-vermittelte Sensitivierung der D05-Zellen gegenüber FM trat ab einer FM-Dosis von 15 μM auf und war über den gesamten untersuchten Dosisbereich bis 50 μM FM zu

beobachten (**Abb. 17D**). Die Zelltod-Raten beider Behandlungsgruppen erreichten bei einer Dosis von etwa 22 μM ein Plateau, ab welchem sich die Zelltod-Induktion kaum weiter steigerte. Bei einer FM-Konzentration von 50 μM erreichte die Zelltod-Fraktion der VPA- und FM-behandelten Zellen das Maximum von 37,5% und war damit 2,5-mal so groß wie die der alleinig mit FM behandelten Zellen.

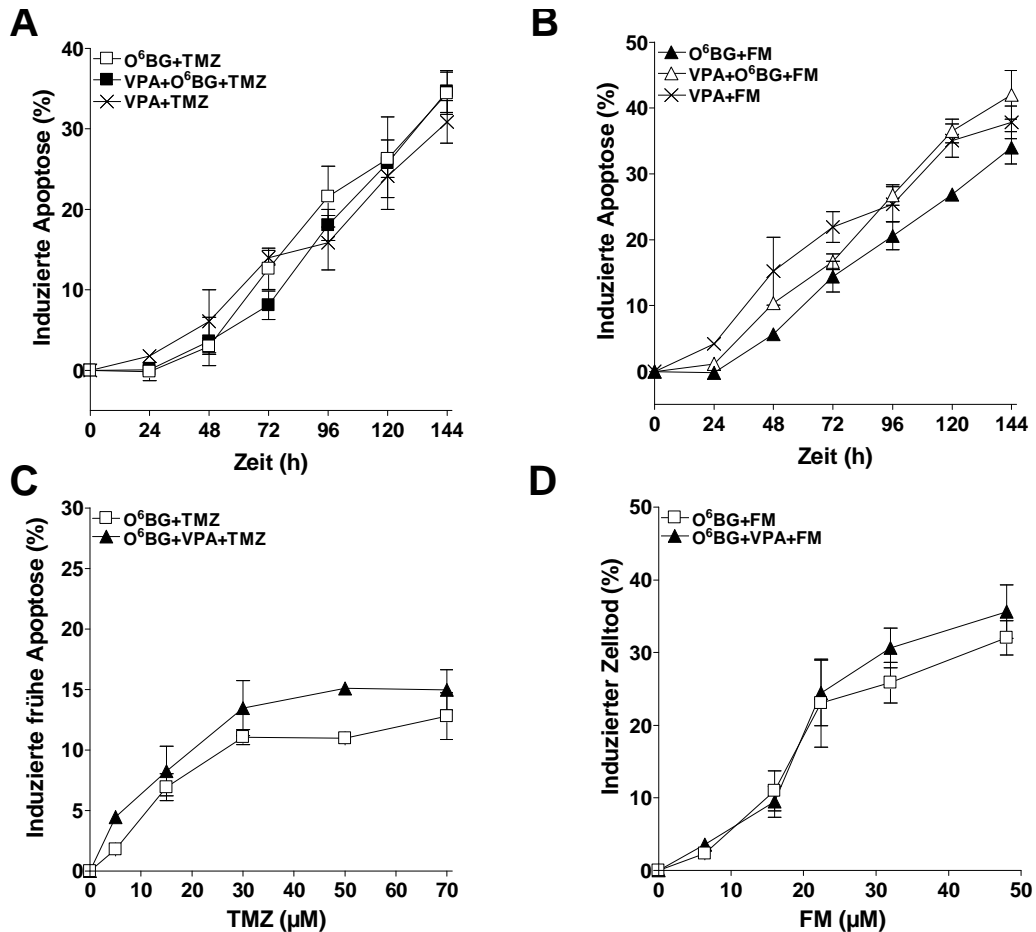


Abb. 17: Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Zelltod-Induktion in D05-Zellen nach TMZ- und FM-Behandlung. Kinetik der Apoptose-Induktion 24 – 144 h nach Behandlung mit (A) TMZ (50 μM) mit und ohne O⁶BG-Vorbehandlung, (B) FM (32 μM) mit und ohne O⁶BG-Vorbehandlung. Die jeweiligen SubG1-Fractionen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Die in (C) und (D) dargestellte Dosis-Wirkungs-Kurve wurde 96 h nach Alkylanzien-Behandlung mithilfe der AnnexinV/PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Daten ergeben sich aus der Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die in **Abb. 17** vorgestellten Ergebnisse belegen eine signifikante VPA-vermittelte Sensitivierung von D05-Zellen gegenüber TMZ und FM. Ein biologisch relevanter Effekt von VPA auf die Aktivität von MGMT konnte nicht identifiziert werden.

5.2.3 Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Sensitivität von D14-Zellen gegenüber TMZ und FM

Nach der erfolgreichen VPA-induzierten Sensitivierung von p53 „wildtypischen“ D05-Zellen gegenüber TMZ und FM (siehe **Abb. 17**) sollte untersucht werden, ob VPA auch in p53mt Zellen eine Sensitivierung bewirkt und ob eine Steigerung der MGMT-Aktivität nach VPA-Behandlung zu beobachten ist.

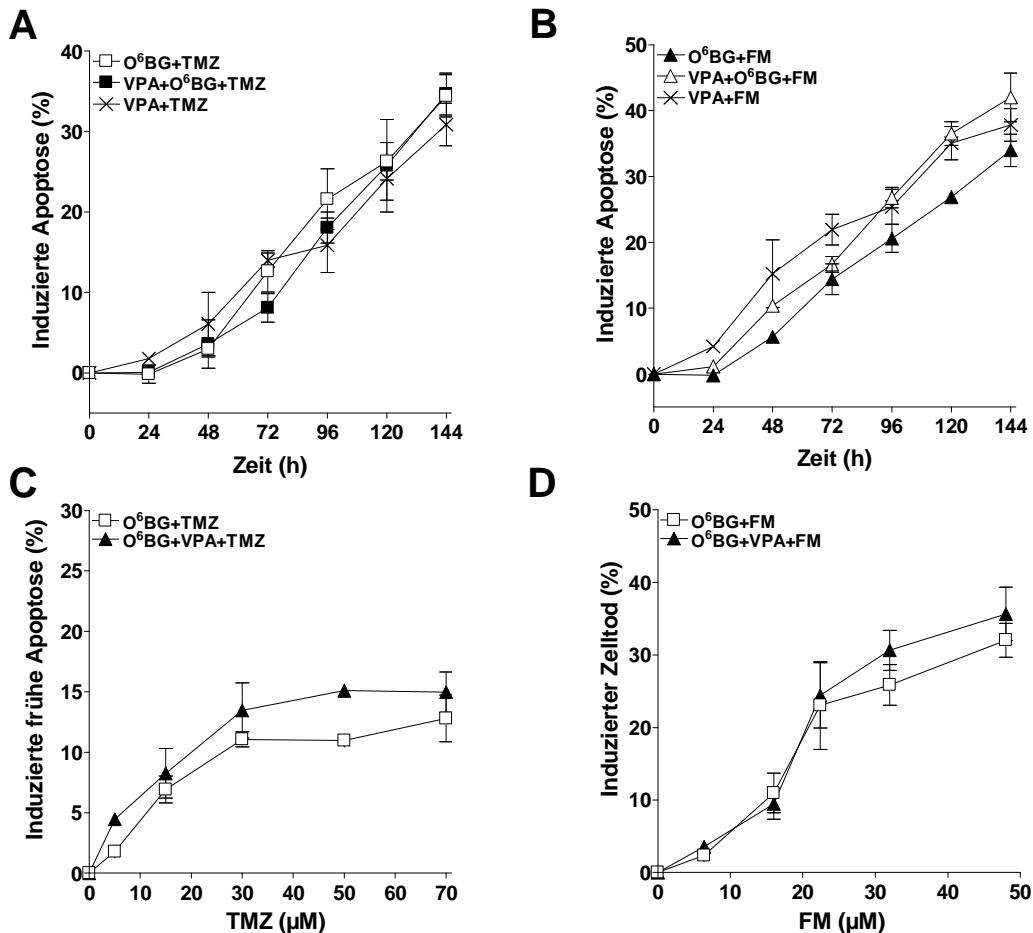


Abb. 18: Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Zelltod-Induktion in D14-Zellen nach TMZ- und FM-Behandlung. Kinetik der Apoptose-Induktion 24 – 144 h nach Behandlung mit **(A)** TMZ (50 µM) mit und ohne O⁶BG-Vorbehandlung, **(B)** FM (32 µM) mit und ohne O⁶BG-Vorbehandlung. Die jeweiligen SubG1-Fractionen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die in **(C)** und **(D)** dargestellte Dosis-Wirkungs-Kurve wurde 96 h nach Alkylanzien-Behandlung mithilfe der Annexin/PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Daten ergeben sich aus der Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Analog zu den in D05-Zellen durchgeführten Experimenten wurden p53mt und MGMT-defiziente D14-Zellen bezüglich a) der Kinetik der Apoptose-Induktion nach Behandlung mit klinisch relevanten Dosen von TMZ (50 µM) und FM (32 µM) und b) bezüglich der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Alkylanzien-Konzentration und Zelltod-Induktion untersucht. In D14-Zellen hatte VPA eine nur geringe Toxizität, die

sich 24 – 144 h nach Ende der VPA-Vorbehandlung zwischen 4,3 und 7,2% bewegte. Die durch TMZ oder FM induzierten Apoptose-Raten stiegen im Zeitverlauf kontinuierlich an und erreichten nach 144 h 34,4% bzw. 34% (**Abb. 18A** und **Abb. 18B**). Jedoch konnte keine VPA-induzierte Sensitivierung von D14-Zellen gegenüber TMZ nachgewiesen werden (**Abb. 18A**). VPA verursachte eine schwache Sensitivierung gegenüber FM, welche jedoch nicht signifikant war.

VPA bewirkte keine biologisch relevante Steigerung der MGMT-Aktivität in der MGMT-defizienten Zelllinie D14 (**Abb. 18A** und **Abb. 18B**): die Vorbehandlung der Zellen mit O⁶BG verursachte keine Erhöhung der Apoptose-Rate im Vergleich mit den O⁶BG-unbehandelten Zellen.

In **Abb. 18C** und **Abb. 18D** sind die mittels AnnexinV/PI-Färbung gewonnenen Dosis-Wirkungs-Kurven für TMZ und FM dargestellt. Sie bestätigen die in **Abb. 18A** und **Abb. 18B** mittels SubG1-Messung gewonnenen Ergebnisse. Während im gesamten untersuchten Alkylanzien-Konzentrationsbereich die Erhöhung der Konzentration mit der Zelltod-Induktion einhergeht, war auch hier ein nur sehr leichter Effekt von VPA auf den TMZ- und FM-induzierten Zelltod nachweisbar, welcher jedoch nicht statistisch signifikant ist.

Die in **Abb. 18** dargestellten Ergebnisse belegen, dass VPA keine Sensitivierung von D14-Zellen gegenüber TMZ und FM bewirkt. Ein biologisch relevanter Effekt von VPA auf die Aktivität von MGMT wurde nicht beobachtet.

5.2.4 Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Induktion von Apoptose und Nekrose in D05-Zellen

Nachdem die sensitivierende Wirkung von VPA auf D05-Zellen gegenüber TMZ und FM bewiesen war, sollte anhand der in **Abb. 17** dargestellten Daten untersucht werden, ob die Sensitivierung der Zellen durch VPA-Vorbehandlung auf Induktion von Apoptose oder später Apoptose/Nekrose beruht.

Die Sensitivierung von D05-Zellen gegenüber TMZ wurde durch eine Erhöhung sowohl der Apoptose- als auch der Nekrose-Raten verursacht (**Abb. 19A** und **Abb. 19B**), wobei der Effekt von VPA auf die apoptotische Fraktion ausgeprägter ausfiel (**Abb. 19A**). Beide Fraktionen stiegen bis zu einer Konzentration von 50 µM TMZ kontinuierlich an. Bei einer Konzentration von 70 µM war eine Reduktion der Apoptose- und Nekrose-Raten zu beobachten.

Auch nach FM-Behandlung beruht die Sensitivierung der Zellen durch VPA auf der Induktion von Apoptose und Nekrose (**Abb. 19C** und **Abb. 19D**). Der Effekt auf die apoptotische Fraktion war auch hier stärker ausgeprägt (**Abb. 19C**). Während für

die nekrotische Fraktion bis zu einer Konzentration von 50 μM TMZ ein Anstieg zu verzeichnen war, wurde das Maximum der Apoptose-Rate bereits bei 50 μM TMZ erreicht.

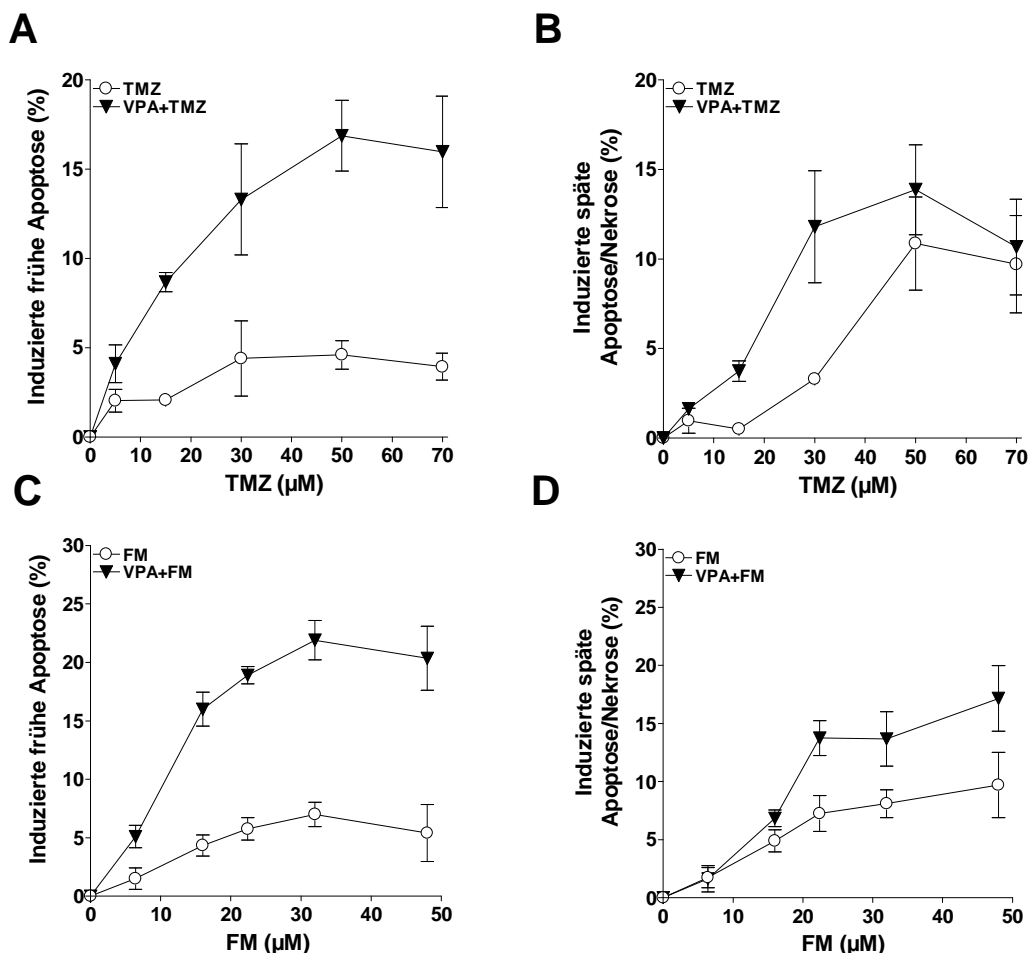


Abb. 19: Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Apoptose- und Nekrose-Induktion in D05-Zellen nach TMZ- und FM-Behandlung. Die Dosis-Wirkungs-Kurve wurde 96 h nach Behandlung mithilfe der AnnexinV/PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. **(A)** Induzierte frühe Apoptose und **(B)** induzierte späte Apoptose/Nekrose von nicht vorbehandelten und VPA-vorbehandelten Zellen im angegebenen TMZ-Konzentrationsbereich. **(C)** Induzierte frühe Apoptose und **(D)** induzierte späte Apoptose/Nekrose von nicht vorbehandelten und VPA-vorbehandelten Zellen im angegebenen FM-Konzentrationsbereich. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse in **Abb. 19** zeigen, dass VPA in D05-Zellen einen fördernden Einfluss sowohl auf die TMZ- und FM-induzierte Apoptose als auch auf die Nekrose hat; die Förderung der Apoptose ist jedoch stärker ausgeprägt.

5.2.5 Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Induktion von Apoptose und Nekrose in D14-Zellen

Obwohl in D14-Zellen kein signifikanter Effekt von VPA auf die Sensitivität gegenüber TMZ oder FM zu beobachten war sollte untersucht werden, ob die VPA-

Vorbehandlung zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Apoptose und Nekrose führt. Hierzu wurden die bereits in **Abb. 18** dargestellten Daten herangezogen.

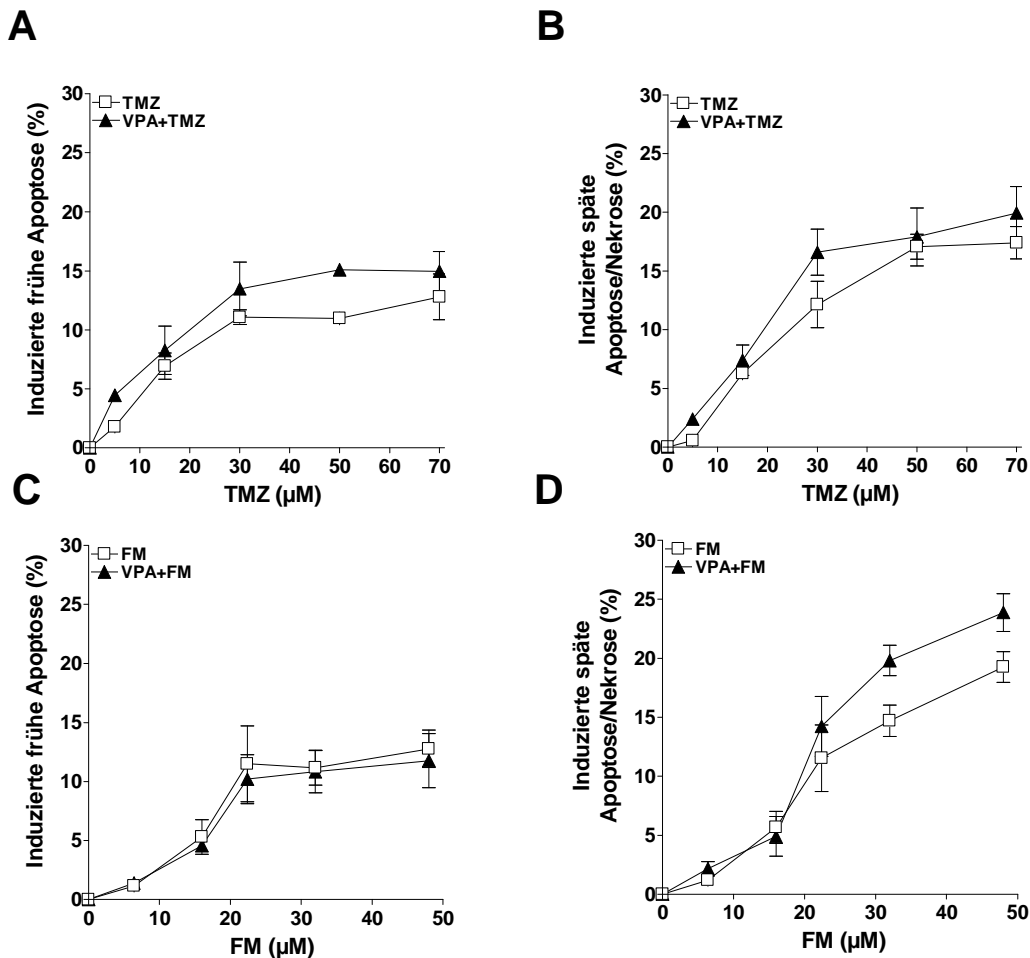


Abb. 20: Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Apoptose- und Nekrose-Induktion in D14-Zellen nach TMZ- und FM-Behandlung. Die Dosis-Wirkungs-Kurve der Zelltod-Induktion wurde 96 h nach Behandlung mithilfe der AnnexinV/PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. **(A)** Induzierte frühe Apoptose und **(B)** induzierte späte Apoptose/Nekrose von nicht vorbehandelten und VPA-vorbehandelten Zellen im angegebenen TMZ-Konzentrationsbereich. **(C)** Induzierte frühe Apoptose und **(D)** induzierte späte Apoptose/Nekrose von nicht vorbehandelten und VPA-vorbehandelten Zellen im angegebenen FM-Konzentrationsbereich. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Während die durch TMZ-Behandlung induzierten Apoptose- und Nekrose-Raten weitestgehend unverändert blieben (**Abb. 20A** und **Abb. 20B**), wurde der in **Abb. 18B** dargestellte leichte VPA-vermittelte Sensitivierungseffekt hauptsächlich durch eine verstärkte Induktion von Nekrose ausgelöst (**Abb. 20C** und **D**).

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der in **Abb. 20** präsentierten Ergebnisse die Aussage treffen, dass die VPA-Vorbehandlung in D14-Zellen generell zu keiner signifikanten Verschiebung des Verhältnisses zwischen Apoptose- und Nekrose-Rate führt.

5.2.6 Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Sensitivität von A375- und RPMI-7951-Zellen gegenüber TMZ und FM

Zur Untersuchung der biologischen Relevanz der für D05 und D14 gewonnenen Ergebnisse zur VPA-vermittelten Sensitivierung gegenüber TMZ und FM wurden zwei weitere menschliche Melanom-Zelllinien in die Studie eingeschlossen: Die Zelllinien A375 (p53wt, MGMT-profizient) und RPMI-7951 (p53mt, MGMT-profizient).

Zunächst ist festzuhalten, dass die Toxizität von VPA selbst auf beide Zelllinien gering war: für A375 betrug die Apoptose-Rate zum Zeitpunkt $t = 120\text{h}$ 1,6%; in RPMI-7951-Zellen betrug sie 72 h nach Alkylanzien-Zugabe 1,7%. Die apoptotische Fraktion wurde in nicht vorbehandelten und VPA-vorbehandelten Zellen nach Behandlung mit 50 μM TMZ bzw. 32 μM FM durch Messung der SubG1-Fraktion durchflusszytometrisch bestimmt. In **Abb. 21A** sind die für A375-Zellen gewonnenen Ergebnisse dargestellt. Die VPA-Vorbehandlung hatte keinen biologisch relevanten Einfluss auf die Aktivität von MGMT, da die Zellen auch nach VPA-Vorbehandlung gegenüber beiden Alkylanzien resistent sind. Nach MGMT-Depletion resultierte die VPA-Vorbehandlung in einer signifikanten Sensitivierung der Zellen gegenüber TMZ. Die apoptotische Fraktion stieg von 11,2% nach TMZ-Behandlung auf 36,5% nach VPA- und TMZ-Behandlung an. Dies entspricht einer 3,3-fachen Induktion. Im Falle von FM bewirkte die VPA-Vorbehandlung eine leichte Sensitivierung der Zellen von 4,0 auf 9,6%, welche allerdings nicht signifikant war.

Aufgrund der relativ hohen Sensitivität der RPMI-7951-Zellen gegenüber TMZ und FM (Naumann et al., 2009) wurden die Proben bereits 96 h nach TMZ- und 72 h nach FM-Behandlung ausgewertet. Dies sollte verhindern, dass eine mögliche VPA- ausgelöste Sensitivierung der Zellen durch die hohen Alkylanzien-induzierten Apoptose-Raten überlagert wird und somit nicht erkennbar ist. Die **Abb. 21B** zeigt die für RPMI-7951 gewonnenen Ergebnisse. Wie in den MGMT-profizienten A375- und D05-Zellen, bewirkte die VPA-Vorbehandlung keine biologisch relevante Reduktion der MGMT-Aktivität: MGMT-profiziente RPMI-7951-Zellen sind ohne O⁶BG-Vorbehandlung resistent gegenüber TMZ und FM.

Die hier für A375-Zellen erhaltenen Ergebnisse decken sich im Falle von TMZ mit denen der D05-Zellen: beide Zelllinien konnten durch VPA sensitiviert werden. Im Gegensatz zu D05-Zellen verursachte die VPA-Vorbehandlung in A375-Zellen keine signifikante Sensitivierung gegenüber FM. Die Zelllinie RPMI-7951 reagierte ähnlich wie die D14-Zelllinie. Weder für TMZ noch für FM konnte eine Sensitivierung durch eine VPA-Vorbehandlung erzielt werden. In beiden MGMT-profizienten Zelllinien

konnte kein biologisch relevanter Effekt von VPA auf die MGMT-Aktivität nachgewiesen werden.

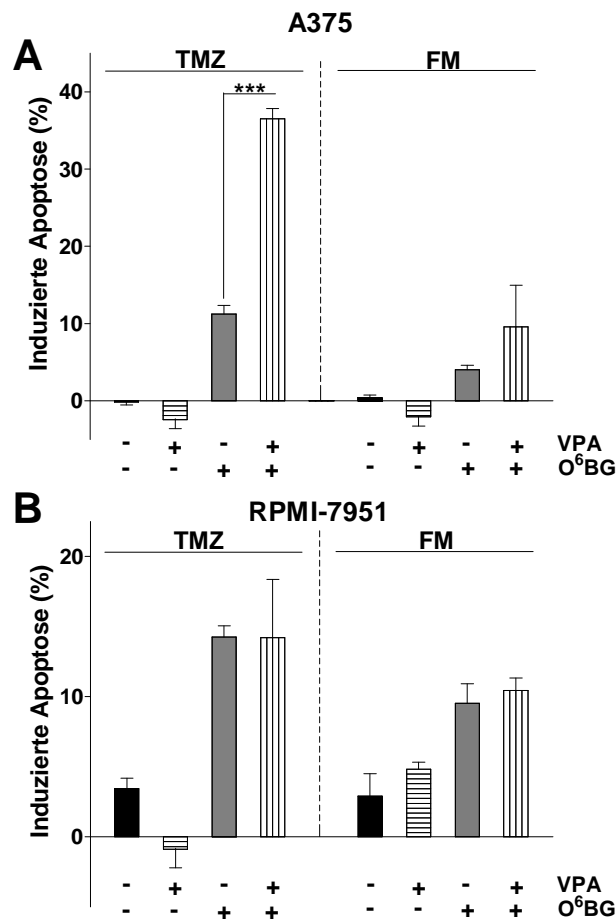


Abb. 21: Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Apoptose-Induktion durch TMZ (50 μ M) und FM (32 μ M) in A375 (p53wt)- und RPMI-7951 (p53mt)-Melanomzellen mit und ohne MGMT-Depletion durch O⁶BG. Nicht-vorbehandelte und VPA-vorbehandelte **(A)** A375-Zellen wurden 120 h nach FM- oder TMZ-Behandlung, **(B)** RPMI-7951-Zellen wurden 96 h nach TMZ-Behandlung und 72 h nach FM-Behandlung analysiert. Die SubG1-Fractionen wurden durchfluss-zytometrisch ermittelt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten. *** P < 0,001

5.2.7 Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Proliferation und Zellzyklusverteilung von D05-, D14-, A375- und RPMI-7951-Zellen

Da die Toxizität von alkylierenden Agenzien durch Entstehung von DSB in der S-Phase vermittelt wird, könnte eine Sensitivierung gegenüber Alkylanzien auf einer Erhöhung der Proliferation beruhen. Im Umkehrschluss würde ein Zellzyklusarrest eine Resistenz gegenüber Alkylanzien verursachen. Aus diesen Gründen sollte der Effekt von VPA auf Proliferation und Zellzyklus der vier Melanom-Zelllinien D05, D14, A375 und RPMI-7951 untersucht werden.

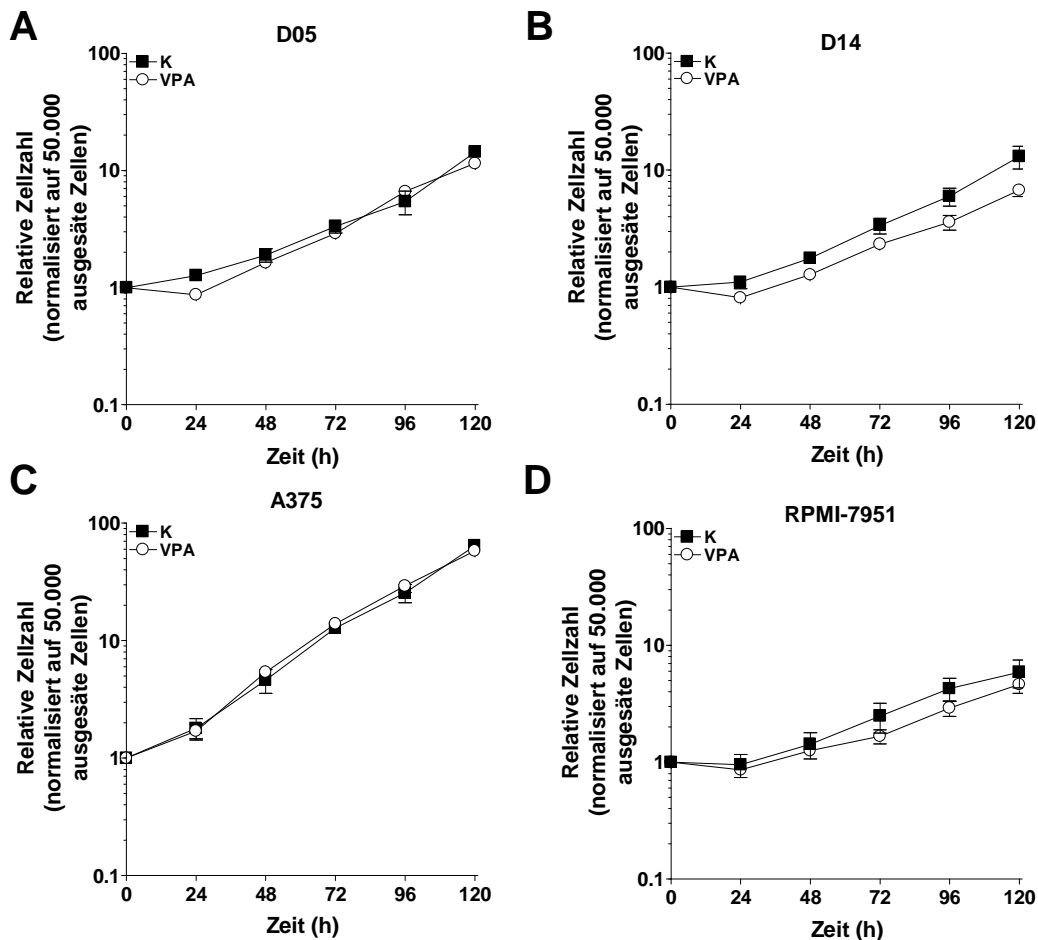


Abb. 22: Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Proliferation von malignen Melanom-Zelllinien. Für die Erstellung der Wachstumskurven von **(A)** D05-Zellen, **(B)** D14-Zellen, **(C)** A375-Zellen und **(D)** RPMI-7951-Zellen wurden 5×10^4 nicht behandelte und VPA-behandelte Zellen ausgesät ($t = 0$ h). 24 bis 120 h nach Aussaat wurde die Anzahl adhärent wachsender Zellen bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von sechs Experimenten.

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden die Zellen wie vorhergehend dargestellt mit VPA behandelt. Am Ende der Behandlung ($t = 0$ h) wurden VPA-behandelte und unbehandelte Kontrollzellen ausgesät. An den darauffolgenden fünf Tagen wurde die Zahl der adhärent wachsenden Zellen bestimmt. In **Abb. 22A** ist zu sehen, dass VPA keinen Einfluss auf das Wachstum von D05-Zellen hatte. In D14-Zellen verursachte die VPA-Behandlung eine schwache Wachstumsverminderung, welche allerdings nicht statistisch signifikant ist (**Abb. 22B**). Die Graphen der A375- und RPMI-7951-Zellen zeigen keinen Effekt von VPA auf das Wachstum der Zellen (**Abb. 22C** und **D**).

Zusammenfassend lässt sich aus den in **Abb. 22** vorgestellten Daten schließen, dass VPA nach 7-tägiger (chronischer) Behandlung keinen Einfluss auf das Wachstum der vier untersuchten Melanom-Zelllinien hat.

Die Analyse der Zellzyklusverteilung wurde am Ende der VPA-Vorbehandlung ($t = 0$ h, nach 7-tägiger Vorbehandlung), also zum Zeitpunkt der eigentlichen Alkylanzien-Gabe, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 23** dargestellt und belegen, dass VPA keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der vier verwendeten Melanom-Zelllinien hat.

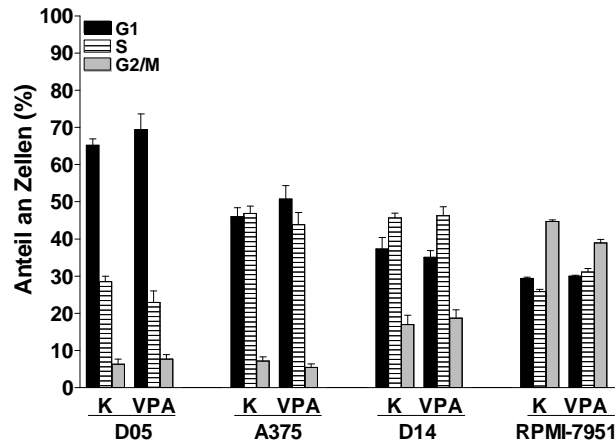


Abb. 23: Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Zellzyklusverteilung maligner Melanom-Zelllinien. Am Ende der VPA-Vorbehandlung ($t = 0$ h) wurde der DNA-Gehalt der vier Zelllinien mit und ohne VPA-Behandlung nach Färbung der DNA mit PI durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse wurden mithilfe der ModFit-Software ausgewertet. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.2.8 Untersuchung der Rolle des extrinsischen Apoptose-Signalwegs bei der Sensitivierung von D05-Zellen gegenüber TMZ und FM

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine Vorbehandlung von p53wt Melanomzellen mit IFN- β eine Sensitivierung gegenüber TMZ bewirkt. Diese Sensitivierung beruht auf einer IFN- β -induzierten Verstärkung der Expression der in Melanomzellen schwach exprimierten Procaspase-8 (Roos et al., 2011). Da die mit VPA-induzierte Sensitivierung von D05-Zellen ebenfalls auf einer Induktion der Procaspase-8 beruhen könnte, sollte die Rolle des extrinsischen Apoptose-Signalwegs bei der VPA-induzierten Sensitivierung von D05-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden D05-Klone verwendet, welche dominant negatives FADD (DN-FADD) stabil exprimieren und daher eine Beeinträchtigung im extrinsischen Apoptose-Signalweg haben (s. 2.5.1). Diese Zellen werden im Folgenden als D05-DNFADD bezeichnet.

Vor Durchführung des eigentlichen Experiments wurde zunächst die Expression von DN-FADD per Western Blot analysiert. Die DN-FADD-Mengen von D05- und D05

DN-FADD-Zellen sind in **Abb. 24A** dargestellt. Während in der parentalen D05-Zelllinie kein Signal detektierbar war, ist DN-FADD im DN-FADD-Klon sichtbar. **Abb. 24B** zeigt die mittels SubG1-Messung ermittelte apoptotische Fraktion von nicht vorbehandelten und VPA-vorbehandelten D05- und D05 DN-FADD-Zellen 120 h nach Zugabe von TMZ (50 μ M) und FM (32 μ M). Die durch die Alkylanzien induzierte Apoptose war in den D05 DN-FADD-Zellen niedriger als in D05-Zellen. Während die DN-FADD-Zellen sowohl gegen TMZ als auch gegen FM resistent waren, bewirkte die Vorbehandlung mit VPA wie in der parentalen D05-Zelllinie eine signifikante Sensitivierung gegenüber beiden Alkylanzien. Im Falle von TMZ wurde eine Apoptose-Rate von 24,8%, im Falle von FM von 27,9% erreicht. Per Western Blot-Analyse wurde die Procaspase-8-Menge in D05-Zellen nach VPA-Behandlung untersucht (**Abb. 24C**). VPA hatte keinen Einfluss auf die Expression von Procaspase-8.

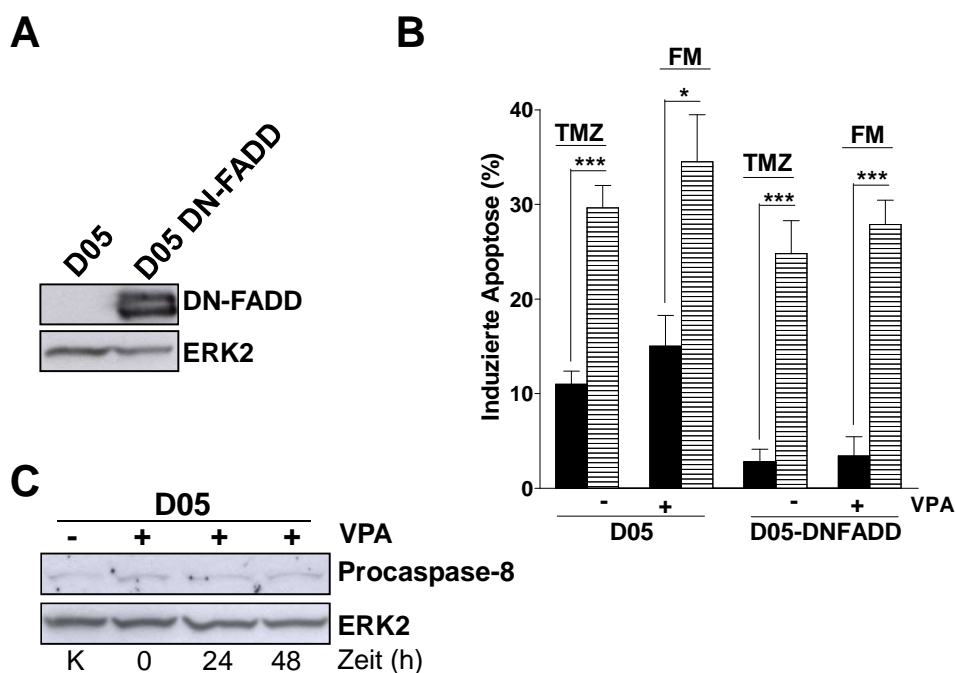


Abb. 24: Untersuchung der Rolle des extrinsischen Apoptosesignalwegs bei der Sensitivierung gegenüber TMZ (50 μ M) und FM (32 μ M). (A) Überprüfung der Expression von DN-FADD per Western Blot. (B) Die Apoptose-Induktion von nicht vorbehandelten und VPA-vorbehandelten D05- und D05 DN-FADD-Zellen wurde 120 h nach FM- oder TMZ-Behandlung durchflusszytometrisch durch Messung der SubG1-Fraktion bestimmt. Die Daten repräsentieren sechs unabhängige Experimente. *** $P < 0,001$ (C) Western Blot-Analyse der Procaspase-8-Menge in D05-Cytoplasmaextrakten. Die Proben waren entweder unbehandelt (K) oder wurden zum Ende der Vorbehandlung ($t = 0$ h) oder 24 bzw. 48 h danach geerntet. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend lässt sich aus den in **Abb. 24** präsentierten Ergebnissen schließen, dass die durch VPA vermittelte Sensitivierung von D05-Zellen nicht auf

eine verstärkte Aktivierung des FADD-assoziierten extrinsischen Apoptose-Signalwegs zurückzuführen ist.

5.2.9 Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Genexpression in D05-Zellen

Die Zelllinie D05 konnte mithilfe von VPA gegenüber TMZ und FM sensitiviert werden. Daher sollten die Wirkungen von VPA auf die Genexpression in diesen Zellen untersucht werden und VPA-regulierte Gene, welche für die Sensitivierung von D05-Zellen gegenüber Alkylanzien verantwortlich sein könnten, identifiziert werden. Hierzu wurden mithilfe eines auf *Real-time* PCR basierenden PCR-Arrays mehr als 90 Gene bezüglich ihrer Expression nach Behandlung mit VPA und Alkylanzien untersucht. Eine Liste der untersuchten Gene befindet sich in Kapitel 3.10.1.

In der **Abb. 25A** sind alle durch alleinige 7-tägige VPA-Behandlung regulierten Gene dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden sie vier Gruppen zugeordnet. Während die Gene *CCNA1* (IF = 23,0; *Cyclin A1*), *CYP1A1* (IF = 3,8, *Cytochrom P 450 1A1*), *CXCR4* (IF = 10,8; *Chemokin (C-X-C motif) Rezeptor 4*) und *MMP13* (IF = 3,5, *Matrixmetallopeptidase 13*) eine starke Induktion erfuhren, war für *CCNE1* (*Cyclin E1*), *BAX* (*Breakpoint cluster-2-associated x protein*), *LIG4* (*Ligase IV*) und *GSTM1* (*Glutathion S-Transferase mu 1*) eine nur etwa 2-fache Induktion nachzuweisen. Die Behandlung mit VPA verursachte eine Repression der Gene *CYP1B1* (IF = 0,2; *Cytochrom P450 1B1*), *XRCC1* (IF = 0,1; *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*), *FASLG* (IF = 0,1; *FAS Ligand*) und *MMP3* (IF = 0,1; *Matrixmetallopeptidase 3*). Die Induktionsfaktoren von *PCNA* (*Proliferating cell nuclear antigen*) und *POLE* (*Polymerase epsilon*) betragen knapp 0,5.

Die **Abb. 25B** zeigt die Veränderung der Genexpression durch VPA-Vorbehandlung in TMZ-behandelten D05-Zellen. Die Expression der Gene *FAS* (*FAS Rezeptor*, CD95, Apo-1) und *CXCR4* wurde am stärksten durch VPA beeinflusst: Die Induktionsfaktoren betragen 3,1 und 3,3. Die VPA-Behandlung bewirkte eine Repression von *ARHGDI1A* (*Rho GDP dissociation inhibitor alpha*) und *NOS2* (*Nitric oxide synthase 2*). In FM-behandelten D05-Zellen verursachte die VPA-Vorbehandlung keine ausgeprägte Aktivierung der Genexpression (**Abb. 25C**): die IF von *CXCR4*, *MMP13* und *POLE* betragen 2,7, 2,3 bzw. ebenfalls 2,3. *MMP7* (*Matrixmetallopeptidase 7*) erfuhr mit einem IF von 0,3 eine Verminderung der Expression.

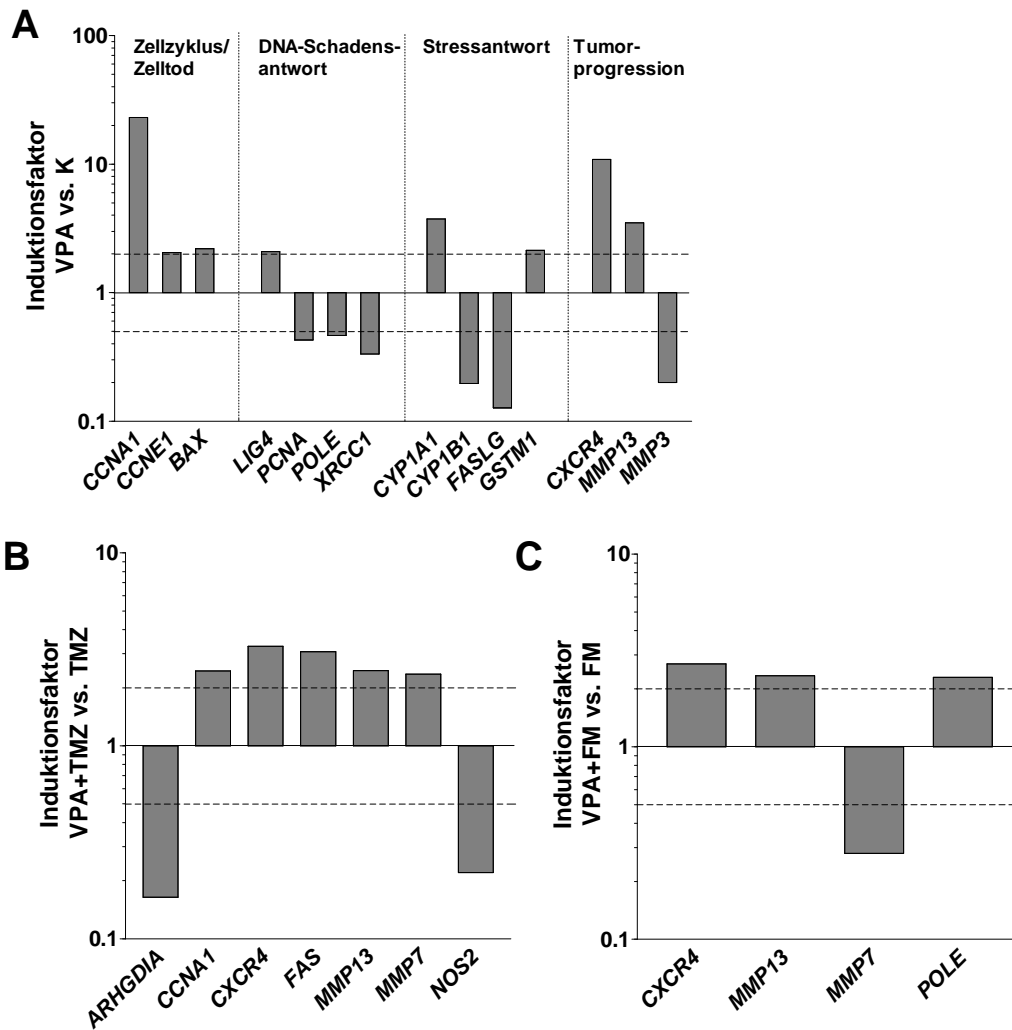


Abb. 25: Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Genexpression in D05-Zellen mit und ohne Alkylanzien-Behandlung. Mithilfe eines auf *Real-time* PCR basierenden PCR-Arrays wurden > 90 Gene bezüglich eines Effektes von VPA auf ihre Expression untersucht. **(A)** Vergleich einer VPA-behandelten Probe am Ende der Vorbehandlung ($t = 0$ h) mit einer unbehandelten Kontrollprobe. **(B)** Vergleich einer VPA+TMZ-behandelten mit einer TMZ-behandelten Kontrollprobe 96 h nach TMZ-Behandlung. **(C)** Vergleich einer VPA+FM-behandelten mit einer FM-behandelten Kontrollprobe 72 h nach FM-Behandlung. Dargestellt sind die relativen mRNA-Mengen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollprobe (IF = 1) nach Normalisierung auf die eingesetzte cDNA-Menge mithilfe der Gene *GAPDH* und *ACTB* („*Housekeeping genes*“). Generell werden solche Gene als reguliert betrachtet, deren mRNA-Menge um das 2-fache von der jeweiligen Kontrolle abweicht.

Zusammenfassend zeigen die in **Abb. 25** dargestellten Ergebnisse eine durch VPA verursachte Induktion und Repression der Genexpression. Die alleinige VPA-Behandlung beeinflusste Gene der Gruppen Zellzyklus und Zelltod, DNA-Schadensantwort, Stressantwort und Tumorprogression. BAX stellt ein offensichtliches Kandidatengen für eine Sensitivierung von D05-Zellen gegenüber Alkylanzien dar. Bemerkenswert ist ebenfalls die Induktion des ROS-detoxifizierenden Proteins GSTM1. Die Induktion von FAS (CD95, Apo-1) durch VPA+TMZ-Behandlung hat aufgrund der in **Abb. 24** vorgestellten Ergebnisse zur

Rolle des apoptotischen FAS (CD95, Apo-1)-Signalwegs bei der Sensitivierung gegenüber Alkylanzien fragliche Bedeutung.

6 Diskussion

6.1 Untersuchungen zur Resistenz von menschlichen malignen Melanomzellen gegenüber Fotemustin

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein wichtiger Angelpunkt in der Detektion von zellulären DNA-Schäden und wird daher auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Seine Aktivierung induziert einen Zellzyklusarrest, um Zeit für die Reparatur des Schadens zu gewinnen, bevor die Zelle in die nächste Zellzyklusphase übertritt. Es fördert die DNA-Reparatur durch direkte Protein-Protein-Interaktion mit DNA-Reparatur-Faktoren und durch Transaktivierung von DNA-Reparatur-Genen. Ist der detektierte Schaden zu verheerend und irreparabel, vermittelt p53 die Induktion von Apoptose, um beispielsweise die Entstehung von malignen Zellen zu unterbinden und so den Gesamtorganismus zu schützen. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen p53 eine überraschende Rolle in menschlichen malignen Melanomzellen zu: das Tumorsuppressor-Protein p53 vermittelt Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Fotemustin, in dem es DNA-Reparatur-Gene induziert.

6.1.1 p53 vermittelt in menschlichen malignen Melanom-Zelllinien Resistenz gegenüber Fotemustin

Bei der Untersuchung der Resistenz von sieben Melanom-Zelllinien gegenüber FM fiel auf, dass p53wt Zelllinien wie p53wt Gliomzellen (Batista et al., 2007), resistenter waren als p53mt Zelllinien (**Abb. 7A**). Während p53mt Zelllinien 144 h nach FM-Behandlung eine durchschnittliche Apoptose-Rate von 40,7% aufwiesen, war in p53wt Zelllinien im Allgemeinen nur eine schwache Reaktion auf die Behandlung zu beobachten. Der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von p53 und der Resistenz gegenüber FM konnte mithilfe von D05 shp53-Zellen, welchen einen stabilen *Knockdown* von p53 aufweisen, bestätigt werden: Der *Knockdown* bewirkte eine Sensitivierung der Zellen gegenüber FM (**Abb. 8A und B**). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung ist bekannt, dass Melanome eine auffallend geringe p53 Mutations-Rate von 0 – 25% aufweisen (Bennett, 2008; Hocker and Tsao, 2007; Lubbe et al., 1994; Papp et al., 1996; Straume and Akslen, 1997), während p53 in etwa 50 – 60% aller menschlichen Neoplasien mutiert ist (Bourdon, 2007; Toledo and Wahl, 2006; Vousden and Lane, 2007).

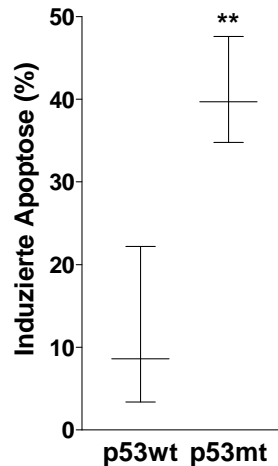


Abb. 26: Apoptose-Raten der p53wt Zellen A375, G361, Malme-3M und D05 sowie der p53mt Zellen D14, RPMI-7951 und MeWo 144 h nach FM-Behandlung (32 μ M). ** P < 0,01.

Diese in Melanom-Zellen geringe p53-Mutations-Rate könnte mit der Bedeutung von p53 für ihre Vorläuferzellen, die Melanozyten, zusammenhängen: p53 ist für das Überleben und die Funktion von Melanozyten unabdingbar. Die Hauptfunktion von Melanozyten besteht in der Photoprotektion der Haut durch die Synthese von Melanin. p53 fördert die Melanin-Synthese, indem es das Enzym Tyrosinase induziert. Aufgrund dessen ist p53 essenziell für die Erfüllung der Hauptfunktion dieser Zellen. Des Weiteren hat p53 eine große Bedeutung für die Resistenz von Melanozyten gegenüber UV-induzierten DNA-Schäden. Sie benötigen eine hohe NER-Kapazität, um große Mengen an Photoläsionen, welche in benachbarten Keratinozyten bereits Apoptose (Sonnenbrand) induzieren, reparieren zu können. Da p53 *XPC* und *DDB2* transaktiviert und somit bestimmend ist für die zelluläre NER-Kapazität (Adimoolam and Ford, 2002; Emmert et al., 2000; Hwang et al., 1999), ist die Erhaltung von p53 eine wichtige Voraussetzung für das Überleben von Melanozyten. Diese Tatsachen könnten einen Selektionsdruck erzeugen, welcher die Erhaltung des p53wt Status von Melanozyten bewirkt.

Überträgt man diese Überlegungen auf das maligne Melanom, so verursacht die Erhaltung des p53wt-Status eine hohe DNA-Reparaturkapazität, welche ursächlich für die Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Chemotherapeutika wie Fotemustin sein könnte. Und da in Melanomzellen die tumorsuppressiven Eigenschaften (Induktion von Apoptose und Zellzyklus-Kontrolle) von p53 häufig „stromabwärts „ inaktiviert werden (s. 2.1.5), bietet ihnen die Erhaltung des p53wt Status hauptsächlich die oben genannten Vorteile.

Der in **Abb. 8C** dargestellte ICL-Reparatur-Assay bestätigte die Vermutung, dass p53 eine hohe DNA-Reparaturkapazität vermittelt: Die p53wt Zelllinie D05 hatte FM-induzierte *Crosslinks* 48 h nach Behandlung weitgehend aus der DNA entfernt,

während in D14-Zellen auch 48 h nach Behandlung keine ICL-Reparatur beobachtet werden konnte. In Übereinstimmung hiermit war die DNA-Schadensantwort in D14-Zellen stärker als in D05-Zellen. Da ATR der zentrale Regulator des S-Phase-*Checkpoints* ist, spiegelt die in **Abb. 8D** dargestellte Phosphorylierung von ATR an Serin 428 in D14-Zellen möglicherweise den Kollaps der durch ICL blockierten Replikationsgabeln wieder. Die ebenfalls in **Abb. 8D** gezeigte Induktion und Phosphorylierung von BRCA1 an Serin 1524 in D14-Zellen wird durch ATM katalysiert (Matsuoka et al., 2007) und ist wahrscheinlich ebenfalls Folge der starken DNA-Schadensantwort. Da BRCA1 direkt und als Transkriptionsfaktor für XPC und DDB2 in der Reparatur von ICL involviert ist (s. 2.3.3 und 2.3.4), könnte der Anstieg der BRCA1-Proteinmenge und der -Phosphorylierung eine spezifische Reaktion der Zelle sein, welche der Verbesserung der ICL-Reparatur dienen soll (Huen et al., 2010).

6.1.2 FM induziert die Expression der Gene DDB2, XPC und BRCA1

Die Stabilisierung und nukleäre Translokation von p53 nach genotoxischem Angriff ist eine generell beobachtete zelluläre Reaktion. Smith und Fornace haben bereits 1995 beschrieben, dass p53 in der Reparatur von Photoläsionen involviert ist (Smith et al., 1995). Adimoolam und Ford haben entdeckt, dass der Schädigung der DNA durch UV-Licht eine p53-abhängige adaptive Antwort (*Adaptive response*) folgt, welche in der Induktion von DDB2 und XPC besteht (Adimoolam and Ford, 2002, 2003). Diese Beobachtung konnte in unserer Arbeitsgruppe mit Glioblastomzellen bestätigt werden: eine Behandlung mit den Chemotherapeutika BCNU und ACNU wie auch mit UV-Licht resultierte in einer p53-vermittelten Transaktivierung von XPC und DDB2 (Batista et al., 2007; Batista et al., 2009). XPC und DDB2 sind Schlüsselproteine der GG-NER und, wie auch viele andere NER-Proteine und BRCA1, an der Reparatur von ICL beteiligt (s. 2.3.4 und Muniandy et al., 2012). Die Untersuchung der Expression der DNA-Reparatur-Gene BRCA1, DDB2, ERCC1, XPA, XPB, XPC, XPD, XPF und XPG in D05- und D14-Zellen nach FM-Behandlung zeigte, dass in p53wt Melanomzellen wie auch in p53wt Glioblastomzellen eine Induktion von DDB2 und XPC zu beobachten ist (**Abb. 9**). Die Induktion von BRCA1 auf mRNA-Ebene erfolgte ausschließlich in D14-Zellen. Da Hartman und Kollegen gezeigt haben, dass BRCA1 p53-unabhängig DDB2 und XPC transaktivieren kann (Hartman and Ford, 2002), legt die Induktion und Phosphorylierung von BRCA1 die Vermutung nahe, dass dies der Kompensation des p53-Verlustes und damit der

Induktion von *XPC* und *DDB2* dienen soll. Allerdings konnte keine *DDB2*- und nur eine schwache *XPC*-Induktion in D14-Zellen beobachtet werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen von Navaraj *et al.* sowie Takimoto *et al.*, die eine induktionsfördernde Wirkung von BRCA1 auf *DDB2* nur in Anwesenheit von p53 beobachten konnten (Navaraj *et al.*, 2005; Takimoto *et al.*, 2002).

6.1.3 Die FM-vermittelte Induktion von *DDB2* und *XPC* ist p53-abhängig, persistierend und allgemein in Melanomzellen zu beobachten

Die ersten Experimente zur Induktion von *DDB2* und *XPC* wurden mit nur einem Melanomzelllinien-Paar, bestehend aus einer p53wt und einer p53mt Zelllinie, durchgeführt. Daher sollte verifiziert werden, ob eine Verbindung zwischen p53-Status und *DDB2*- und *XPC*-Induktion nicht zufällig auftritt, sondern tatsächlich auf dem Vorhandensein von p53 beruht. Die mithilfe von D05 shp53-Zellen gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die basalen Mengen von *DDB2* und *XPC* und ihre Induzierbarkeit durch FM tatsächlich abhängig von der p53-Menge sind (**Abb. 10A**). Die Ergebnisse besitzen eine hohe Validität, da sie in einem isogenen Zellsystem, basierend auf einem Leervektor-transfizierten D05-Klon und einem p53shRNA-transfizierten D05-Klon, durchgeführt wurden. Um die biologische Relevanz der mit D05- und D14-Zellen erhaltenen Ergebnisse festzustellen, sollte ermittelt werden, ob die *DDB2*- und *XPC*-Induktion eine generelle Reaktion von p53wt Melanomzellen auf die Behandlung mit FM ist. Mithilfe von zwei weiteren Zelllinien, A375 (p53wt) und RPMI-7951 (p53mt), konnte bestätigt werden, dass die für D05- und D14-Zellen nachgewiesene Induktion von *DDB2* und *XPC* nicht Zelllinien-spezifisch ist, sondern sich auch in weiteren Melanom-Zelllinien ereignet (**Abb. 10B**). Untersuchungen zur Dauer der Induktion von *XPC* und *DDB2* mit A375 und D05-Zellen zeigten einen lang anhaltenden Induktionseffekt. In D05-Zellen hielt die Induktion bis zu 144 h nach Behandlung an, in A375-Zellen bis zu 96 h (**Abb. 13**). Die Diskrepanz könnte auf die höhere Sensitivität der D05-Zellen und die kürzere Populations-Verdopplungszeit der A375-Zellen zurückzuführen sein. Dennoch deuten die Ergebnisse daraufhin, dass eine erste Verabreichung von FM bei Patienten eine Resistenz gegenüber einer zweiten, einige Tage später verabreichten Dosis verursachen könnte (*Adaptive response*).

6.1.4 Der *Knockdown* von XPC sensitiviert gegenüber hohen FM-Konzentrationen

Ob die Induktion von DDB2 und XPC tatsächlich biologische Konsequenzen hat und Resistenz gegenüber FM vermittelt, sollte durch weitere Versuche geklärt werden. Es ist denkbar, dass diese Resistenzverleihung sowohl auf einer Verstärkung der Reparatur von FM-induzierten Monoaddukten (s. 2.2.2), welche sich zu ICL umlagern, als auch auf einer Verstärkung der Reparatur der durch FM-induzierten ICL beruht. Es wurden noch keine Daten bezüglich der Rolle von DDB2 oder XPC bei der Reparatur von CNU-induzierten Monoaddukten publiziert. Da ICL die ultimativ toxischen Läsionen sind und die in der Literatur auffindbaren Daten dem Reparatur-Protein XPC eine wichtigere Rolle als DDB2 bei der Reparatur von ICL zuschreiben (Chen et al., 2003; Muniandy et al., 2009; Zheng et al., 2003), sollte zunächst die Rolle von XPC bei der Resistenz von Melanomzellen gegenüber FM untersucht werden.

Die erste Strategie bestand in dem Versuch, durch einen *Rescue* den Mangel an XPC in p53mt Melanomzellen auszugleichen und so eine Resistenz gegenüber FM zu erzeugen. Hierzu sollten mithilfe eines XPC-Expressionsplasmids Klone etabliert werden, welche XPC überexprimieren. Leider starben die wenigen vorhandenen Klone aller drei transfizierten Zelllinien D14, RPMI-7951 und D03-Mel kurz nach der Transfektion oder während der Selektionsphase ab. Dieser Fehlversuch beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass diese drei Zelllinien erfahrungsgemäß anfällig gegenüber der Toxizität der Transfektion selbst sind. In der Literatur existieren keine Daten zu der Frage, ob eine massive Überexpression von XPC, wie sie wahrscheinlich durch das transfizierte Konstrukt verursacht wurde, zytotoxisch ist.

Die zweite Strategie zielte darauf ab, die XPC-Expression in p53wt Zellen zu vermindern, um so möglicherweise eine Sensitivierung gegenüber FM zu verursachen. Durch Transfektion von A375-Zellen mit einem Vektor, welcher eine shRNA gegen XPC kodiert, konnten Klone etabliert werden, welche einen stabilen *Knockdown* von XPC aufweisen. Die erfolgreiche Reduktion der XPC-Expression konnte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (**Abb. 11A** und **Abb. 11B**). Allerdings besteht eine leichte Diskrepanz zwischen der auf Protein- und auf mRNA-Ebene gemessenen XPC-Expression: während auf Protein-Ebene eine relative XPC-Expression von 0,3 (im Vergleich zum *empty*-Klon) gemessen werden konnte, betrug sie auf mRNA-Ebene 0,55. Dies könnte auf einer posttranskriptionellen Regulation beispielsweise durch miRNAs beruhen. Möglich

sind auch intraexperimentelle Schwankungen im Rahmen der Western Blot-Analyse als Ursache für die Diskrepanz.

Da der shRNA-vermittelte *Knockdown* nicht sehr stark ausfiel, war es wichtig, ihn auf funktionaler Ebene zu bestätigen. Als geeignete Positivkontrolle diente UV-Licht, da die essenzielle Funktion von XPC bei der Entfernung von Photoläsionen allgemein bekannt ist. Die **Abb. 11C** zeigt, dass der shXPC-Klon sensitiver auf UVC-Strahlung reagierte als der *empty*-Klon. Der XPC *Knockdown* zeigte bei den üblicherweise verwendeten FM-Konzentrationen von 32 μM keinen Effekt auf die Sensitivität der Zellen im Vergleich zu den *empty*-Zellen (**Abb. 12**). Bei höheren FM-Dosen von 80 μM und 128 μM bewirkte die Reduktion der XPC-Proteinmenge eine signifikante Sensitivierung der Zellen. Die Beobachtung, dass bei einer FM-Konzentration von 32 μM keine Sensitivierung der shXPC-Zellen nachweisbar war, könnte auf der geringen Effizienz des *Knockdowns* beruhen. Möglicherweise war noch genügend XPC Protein in den Zellen vorhanden, um die durch die niedrige FM-Dosis verursachten Schäden zu reparieren. Genauso wäre denkbar, dass DDB2 die Verminderung der XPC-Menge kompensiert und so bei moderaten FM-Konzentrationen eine „normale“ Reparaturkapazität gewährleistet.

Die Frage, ob die Sensitivierung sowohl durch verminderte basale XPC Mengen (wie sie auch in p53mt Zellen auftreten) oder durch eine Abschwächung der XPC-Induktion beruht, bleibt offen. Da die ICL und die Bildung der Sekundärläsionen (DSB) mit einer Verzögerung von mindestens 8 - 24 h auftreten (Brent et al., 1987a), ist zu vermuten, dass die Verminderung der basalen XPC-Menge einen Einfluss auf die Monoaddukt-Reparatur hat. 6 h nach FM-Behandlung konnte mittels PCR noch keine Transaktivierung von XPC und DDB2 beobachtet werden (**Abb. 9A**). Dies bedeutet, dass die durch die Behandlung verursachte Induktion von XPC einen Einfluss auf die ICL-Reparatur hat.

6.1.5 Eine einzige FM-Behandlung provoziert auch *in vivo* eine Induktion von XPC und DDB2

Zur Beantwortung der Frage, ob die Behandlung mit FM in einem Tumor *in situ* ebenfalls eine Induktion von DNA-Reparatur-Genen verursacht, wurde ein A375 Xenograft Mausmodell etabliert. Tatsächlich verursachte eine einzige Behandlung der Mäuse mit FM einen Anstieg der DDB2 und XPC mRNA-Mengen (**Abb. 14B**). Zudem war eine deutliche Reduktion der BRCA1 mRNA-Mengen zu beobachten, welche auf transkriptionelle Inhibition, verursacht durch die *Crosslinks*, zurückzuführen sein könnte. Diese Reduktion untermauert auch die Vermutung, dass BRCA1 in p53wt Melanomzellen keine Rolle bei der Induktion von DDB2 und XPC spielt (**Abb. 9** und 5.1.3). Auf Protein-Ebene war sowohl ein Anstieg der p53-

als auch der DDB2-Menge nachzuweisen (**Abb. 14C**). Die Diskrepanz zwischen der auf mRNA-Ebene beobachteten XPC-Induktion und dem Ausbleiben der Induktion auf Proteinebene wurde in allen durchgeführten Western Blots beobachtet. Jedoch konnte für diese Beobachtung keine logische Erklärung gefunden werden. Dass die XPC-Induktion zunächst nur auf mRNA-Ebene stattfindet und erst verzögert auf Proteinebene eintritt, kann ebenfalls ausgeschlossen werden: Western Blot-Analysen von Tumorproben, die 64 h nach FM-Injektion gewonnen wurden, zeigten ebenfalls keinen Anstieg der XPC-Proteinmenge.

6.1.6 Klinische Bedeutung der durch FM ausgelösten Induktion von XPC und DDB2

Zieht man die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse in Betracht, so ergibt sich zur Resistenz von p53wt Melanomzellen gegenüber FM das in **Abb. 27** dargestellte Modell.

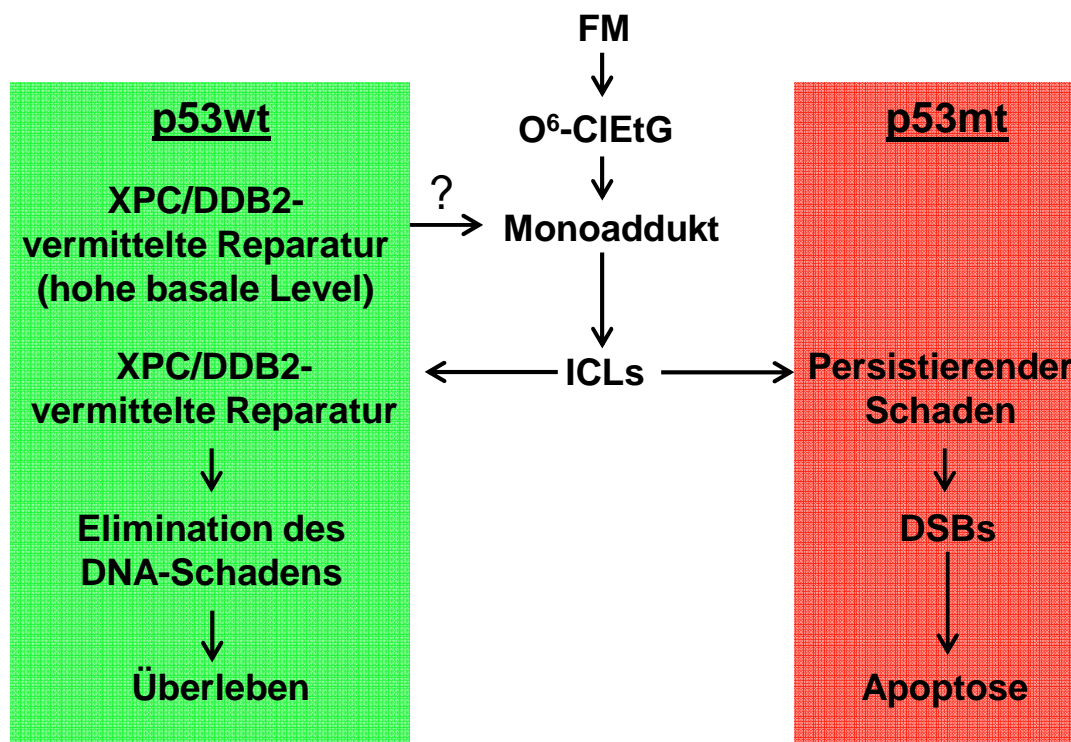


Abb. 27: Modell zur Resistenz von p53wt Melanomzellen gegenüber dem Alkylanz Ftemustin. Ein hochreaktives Ftemustin-Intermediat reagiert mit der DNA, wobei O⁶-CIEtG entsteht. Durch intramolekulare Umlagerung entsteht ein ringförmiges Monoaddukt, welches möglicherweise Substrat für die NER ist. Das instabile Monoaddukt konvertiert spontan zu einem GC-ICL. Dies führt in p53wt Melanomzellen zur Stabilisierung von p53 und Transaktivierung der p53-Zielgene XPC und DDB2, welche die Reparatur der ICL fördern. Dies reduziert die Entstehung von DSB als Sekundärläsion und ruft einen resistenten Phänotyp hervor. In p53mt Melanomzellen können die ICL nicht effizient repariert werden. Die Blockierung der Replikationsgabel durch ICL führt zur Entstehung von DSB und zur Induktion von Apoptose, welche vorwiegend über den mitochondrialen Signalweg ausgeführt wird. p53mt Melanomzellen weisen daher einen sensitiven Phänotyp auf.

Da die Induktion von XPC und DDB2 mithilfe eines Mausmodells ebenfalls *in vivo* nachgewiesen wurde, liegt nahe, dass das oben dargestellte Modell eine adaptive Antwort (*Adaptive response*) beschreibt, bei der eine Behandlung der Tumorzellen mit subletalen Konzentrationen eines DNA-schädigenden Chemotherapeutikums eine Erhöhung der DNA-Reparatur-Kapazität hervorruft, welche Resistenz vermittelt. Da der Großteil der Melanome p53wt-Status aufweisen, könnte es eine Erklärung für das schlechte Ansprechen von Melanomen auf eine Therapie mit CNU liefern und legt nahe, p53wt Melanome nicht mit chlorethylierenden Agenzien zu behandeln, da die erste Behandlung in den Tumorzellen Resistenz gegenüber den nachfolgenden Behandlungen hervorruft. Das oben gezeigte Modell erklärt zusammen mit bereits publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe zur Resistenz von Melanomen gegenüber dem Methylanz TMZ, welche auf einer Unfähigkeit zur Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs beruht (Roos et al., 2011), das generell schlechte Ansprechen von Melanomen gegenüber alkylierenden Agenzien wie TMZ oder FM.

Des Weiteren ist denkbar, dass der hier für Melanomzellen beschriebene Mechanismus auch auf andere Tumorarten übertragbar ist. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits publiziert, dass p53wt **Glioblastom**-Zellen resistenter gegenüber den CNU ACNU und BCNU sind als ihre p53mt Pendanten (Batista et al., 2007). Auch hier führte die Behandlung mit diesen beiden CNU zur Induktion von XPC und DDB2. Der endgültige Beweis, dass p53 bzw. XPC/DDB2 tatsächlich für die Resistenz der Glioblastom-Zellen verantwortlich sind, ist allerdings noch zu erbringen. Da Glioblastome jedoch deutlich mehr p53-Mutationen aufweisen als Melanome (bis zu 40% der Glioblastome weisen einen p53mt-Status auf), hat eine Resistenzvermittlung durch p53 gegenüber CNU für die Glioblastom-Therapie geringere klinische Bedeutung als für die Melanom-Therapie.

6.1.7 Ausblick

Drei Aspekte sollen hier erwähnt werden, die weiterer Untersuchung bedürfen:

1) Die biologische Relevanz der Induktion von DDB2 wurde nicht weiter spezifiziert. Mithilfe von DDB2 *Knockdown*-Klonen könnte analog zu den im Rahmen dieser Arbeit mit XPC *Knockdown*-Klonen durchgeführten Experimenten die Rolle von DDB2 bei der Resistenzvermittlung gegenüber FM untersucht werden. Zudem könnte analysiert werden, ob ein Doppel-*Knockdown* von DDB2 und XPC eine noch stärkere Sensitivierung von p53wt Melanomzellen verursacht. Neben einer resistenzvermittelnden Funktion bei der DNA-Reparatur wurde DDB2 auch eine

Rolle bei der Inhibition des extrinsischen Apoptose-Signalwegs zugeschrieben. So zeigten Sun und Kollegen, dass DDB2 c-FLIP heraufreguliert und so die Bildung des DISC (s. 2.5.1.1) unterbindet (Sun et al., 2010).

2) Ein weiterer interessanter Aspekt betrifft die Frage, ob sich die adaptive Antwort tatsächlich mithilfe von Zelltodmessungen am Durchflusszytometer nachweisen lässt. Hierbei soll geklärt werden, ob eine „Vorbehandlung“ von p53wt Melanomzellen mit der üblichen, nicht-toxischen FM-Dosis (32 μ M) eine persistierende Induktion von DDB2 und XPC verursacht und so tatsächlich vor der Zelltod-Induktion durch eine sich direkt daran anschließende Behandlung mit einer in diesen Zellen normalerweise toxischen FM-Dosis schützt.

Wie im vorherigen Abschnitt schon erwähnt, könnte man durch analoge Versuche mit Glioblastom-Zellen und anderen Tumorzelltypen klären, ob die im Rahmen dieser Arbeit für Melanomzellen gewonnenen Ergebnisse zur Resistenz gegenüber FM auch Gültigkeit für andere mit CNU behandelten Krebsarten besitzen.

6.2 VPA sensitiviert menschliche maligne Melanom-Zelllinien gegenüber alkylierenden Agenzien

In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Publikationen zu Wirkungen von HDACi auf Tumorzellen. Hierbei wurden auch positive Effekte der HDACi auf die Sensitivität gegenüber verschiedenen Arten von DNA-schädigenden Chemotherapeutika beobachtet, welche häufig spezifisch für transformierte Zellen waren. Beispielsweise sensitiviert TSA nichtkleinzellige Lungenkarzinomzellen gegenüber dem Topoisomerase-Hemmer Etoposid (Hajji et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Simone Fulda konnte durch Behandlung von Medulloblastomzellen mit dem HDACi MS-275 eine Sensitivierung gegenüber den beiden Chemotherapeutika Doxorubicin und Cisplatin erzielen (Hacker et al., 2011). Marchion und Kollegen haben nachgewiesen, dass VPA und Vorinostat verschiedene Tumorzelltypen gegenüber Epirubicin sensitivieren (Marchion et al., 2005b). Auch in Melanomen konnten sensitivierende Effekte beobachtet werden: so steigert VPA das Ansprechen von Melanomzellen auf Cisplatin und Etoposid (Valentini et al., 2007). Die Kombinationsbehandlung von Melanomzellen mit VPA und Karenitecin, einem Topoisomerase I Inhibitor, erwies sich als so erfolgreich, dass im Jahr 2009 eine klinische Studie der Phase I/II durchgeführt wurde (Daud et al., 2009). Hierbei beruht die Wirkung von VPA auf der Verstärkung der Induktion von DSB durch Karenitecin.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die Vorbehandlung von Melanomzellen mit VPA sensitivierend gegenüber Alkylanzien

wirkt. Allerdings wurde dies unter den gewählten Bedingungen nur für zwei von vier untersuchten Zelllinien beobachtet. Wodurch diese Sensitivierung vermittelt wird, konnte bisher nicht aufgedeckt werden. Dies beruht u. a. auf den vielfältigen Wirkweisen von VPA auf Zellen (s. 2.4). So aktiviert VPA beispielsweise durch epigenetische Mechanismen wie die Verstärkung der Histon-Acetylierung die Genexpression einer unbekannt Anzahl von Genen, welche wahrscheinlich auf verschiedenste zelluläre Prozesse wirken. Durch Hyperacetylierung von Transkriptionsfaktoren, was deren Inhibition oder Aktivierung zur Folge haben kann, übt VPA weitere positive und negative regulatorische Effekte auf die Genexpression aus. Des Weiteren umfasst das Acetylom zahlreiche zytoplasmatische und nukleäre Proteine, welche in verschiedenste zelluläre Prozesse involviert sind. Die Behandlung von Zellen mit HDACi kann beispielsweise zu Veränderungen von Aktivität, subzellulärer Lokalisation oder Protein-Protein-Interaktionen führen. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Sensitivierung von Melanomzellen durch VPA beruht wahrscheinlich auf einer Überlappung aller eben beschriebenen Wirkungen. Die Identifikation der „Schlüsseleffekte“ stellt sich aufgrund der Komplexität der möglichen VPA-Wirkungen als schwierig dar.

6.2.1 VPA hat im untersuchten Zellsystem einen Einfluss auf p53

Bisher sind sieben Lysine im p53-Protein bekannt, die acetyliert werden (Li et al., 2007; Tang et al., 2008). HDACi verursachen Hyperacetylierung dieser Lysine und bewirken so beispielsweise die Stabilisierung von p53, indem der kovalent gebundene Acetylrest vor Polyubiquitylierung durch MDM2 schützt und so die proteasomale Degradation verhindert (Spange et al., 2009; Tang et al., 2008). In den meisten Fällen bewirkt die Acetylierung von p53 eine Verbesserung der DNA-Bindung und eine Verstärkung der Induktion von proapoptotischen p53-Zielgenen (Glozak et al., 2005; Spange et al., 2009). Eine intrinsische Ursache für die Acetylierung von p53 ist beispielsweise die Anwesenheit von DSB. Hierbei vermittelt die HAT Tip60 die Acetylierung von p53 und fördert auf diesem Wege sowohl die transkriptionsunabhängigen, proapoptotischen Funktionen von p53 an den Mitochondrien als auch die Induktion von proapoptotischen p53-Zielgenen (Sykes et al., 2006; Tang et al., 2006; Yamaguchi et al., 2009). Im Gegensatz hierzu wurde gezeigt, dass HDACi die Degradation von mutiertem p53 verursachen können (Blagosklonny et al., 2005; Li et al., 2011), den dominant-negativen Effekt des mutierten Proteins aufheben und so die Transaktivierung von p53-Zielgenen bewirken (Blagosklonny et al., 2005). Die in **Abb. 16** gezeigten Effekte von VPA

stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen überein und bezeugen die HDACi-Wirkung von VPA in D05- und D14-Zellen.

6.2.2 VPA hat keinen biologisch relevanten Effekt auf die Aktivität von MGMT

Die meisten Melanome und Melanom-Zelllinien zeigen eine MGMT-Expression bzw. – Aktivität (Augustine et al., 2009; Egyhazi et al., 1995; Egyhazi et al., 1997). Diese sind jedoch im Vergleich mit anderen Tumorarten relativ gering (Chen et al., 1992). Der MGMT-Promotor ist je nach Studie in 0 – 50% der untersuchten Melanom-Zelllinien und 13 – 35% der Tumorproben hypermethyliert (Furuta et al., 2004; Tellez et al., 2009).

Da MGMT der bedeutendste Vermittler von Resistenz gegenüber Alkylanzien ist, war eine Beobachtung eines möglichen Effekts von VPA auf die MGMT-Aktivität von großer Wichtigkeit. Dass das MGMT-Protein selbst Ziel von Acetylierung und Desacetylierung ist, ist unwahrscheinlich, da das Acetylom in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde und MGMT nie als HAT/HDAC-Zielprotein beschrieben wurde. Nichtsdestotrotz konnte nicht ausgeschlossen werden, dass VPA einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt auf MGMT in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Melanomzellen hat. Aufgrund der Stilllegung von MGMT durch Promotormethylierung ist anzunehmen, dass Modulatoren epigenetischer Regulationsmuster wie DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und HDACi die Re-Expression von MGMT aktivieren bzw. diese verstärken. Tatsächlich wurde schon beschrieben, dass der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidin die Expression von MGMT fördert (Christmann et al., 2001; Danam et al., 2005; Meng et al., 2011; von Wronski and Brent, 1994), während der HDACi TSA keine oder nur schwache Effekte auf die MGMT-Expression hat (Danam et al., 2005; Meng et al., 2011).

In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Melanom-Zelllinien konnte keine biologisch relevante Reaktivierung (D14-Zellen) oder Verstärkung der MGMT-Aktivität (A375, D05, RPMI-7951) beobachtet werden. Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ist somit kein negativer Effekt von VPA auf den Therapie-Erfolg der Behandlung von Melanomen mit Alkylanzien zu erwarten. Allerdings konnte auch keine Verminderung der MGMT-Aktivität durch Behandlung der Zellen mit VPA nachgewiesen werden.

6.2.3 VPA hat auf die Sensitivität von Melanomzellen gegenüber TMZ und FM unterschiedliche Effekte

In **Abb. 17 bis Abb. 21** sind die Effekte von VPA auf die Sensitivität der malignen Melanom-Zelllinien D05, D14, A375 und RPMI-7951 gegenüber FM und TMZ dargestellt. Die

Tab. 4 fasst zusammen:

Zelllinie	p53-Status	TMZ	FM
D05	wt	+	+
D14	mt	-	-
A375	wt	+	-
RPMI-7951	p53 defizient	-	-

Tab. 4: Effekt von VPA auf die Sensitivität der Zelllinien D05, D14, A375 und RPMI-7951 auf die Sensitivität gegenüber TMZ und FM. +: sensitivierbar, -: nicht sensitivierbar.

Während die Zelllinie D05 sowohl gegenüber TMZ als auch FM sensitiviert werden konnte, zeigten A375-Zellen ausschließlich eine Sensitivierung gegenüber TMZ. Aufgrund der hohen Proliferationsrate der A375-Zellen (Verdopplungszeit ca. 19 h) ist ausgeschlossen, dass die Inkubationszeit mit FM zu kurz war, um einen sensitivierenden Effekt von VPA herauszustellen. Möglicherweise könnte die Erhöhung der VPA-Dosis, die dann allerdings außerhalb eines therapeutisch relevanten Bereichs liegen würde, den sich andeutenden Sensitivierungseffekt gegenüber FM verstärken. Eine VPA-Vorbehandlung hatte weder in D14- noch in RPMI-Zellen einen signifikanten sensitivierenden Effekt. Die in **Tab. 4** aufgeführten Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem p53-Status und der VPA-induzierten Sensitivierung hin. Allerdings wurden bisher noch keine Experimente durchgeführt, um diese Korrelation zu überprüfen.

In **Abb. 19** ist dargestellt, dass in D05-Zellen der sensitivierende Effekt gegenüber TMZ wie auch FM durch verstärkte Induktion von Apoptose und nicht von Nekrose vermittelt wird. Während keine Publikation gefunden werden konnte, die Effekte von HDACi auf Nekrose-assoziierte Mechanismen beschreiben, finden sich unzählige Publikationen zu Effekten von HDACi auf Komponenten des Apoptose-Apparats (Carew et al., 2008; Chateauvieux et al., 2010; Glozak et al., 2005; Sonnemann et al., 2005; Spange et al., 2009). Auch in Melanomzellen konnten diese Effekte beobachtet werden: beispielsweise wiesen Facchetti und Kollegen eine Reduktion von Survivin und Papi und Kollegen eine Induktion von BAX durch VPA nach (Facchetti et al., 2004; Papi et al., 2010). Der HDACi SBHA (Suberoyl-bis-

Hydroxamsäure) induziert in Melanomzellen proapoptotische BCL-2-Proteine wie BID, BAK, BAX und BIM (Gillespie et al., 2006; Zhang et al., 2003a). Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Beobachtung, dass VPA hauptsächlich einen fördernden Effekt auf die Apoptose und kaum einen Effekt auf die Nekrose-Rate nach Alkylanzien-Behandlung hat, stimmt folglich mit den publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen zur Wirkung von VPA überein.

6.2.3.1 VPA sensitiviert D05- und A375-Zellen gegenüber TMZ

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Behandlung der beiden p53wt Melanom-Zelllinien D05 und A375 mit IFN- β zu einer Sensitivierung gegenüber TMZ führt (Roos et al., 2011). Sie beruht auf einer IFN- β vermittelten Induktion der Procaspase-8, so dass die Apoptose-Induktion durch TMZ über den effektiveren extrinsischen Apoptose-Signalweg erfolgen kann. Voraussetzung ist das Vorhandensein und die Induzierbarkeit von FAS (CD95, Apo-1), was in p53wt Zellen normalerweise durch die Alkylanzien-Behandlung hervorgerufen wird. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die Sensitivierung der beiden p53wt Zelllinien D05 und A375 ebenfalls auf einer Verstärkung der Procaspase-8-Expression durch VPA beruht. In **Abb. 24B** wird allerdings gezeigt, dass FADD-assoziierte extrinsische Apoptose-Signalwege keine Rolle bei der Sensitivierung von D05-Zellen gegenüber TMZ spielen. Die Behandlung der D05-Zellen mit VPA führt nicht wie die Behandlung mit IFN- β zu einer Induktion der Procaspase-8 (**Abb. 24C**). Interessanterweise konnte allerdings für Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom-Zellen gezeigt werden, dass eine 48-stündige Behandlung mit VPA derselben Konzentration, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, eine Induktion der Procaspase-8 hervorruft (Kaminsky et al., 2011). Die Induktion von Procaspase-8 durch VPA scheint möglicherweise ein Zelltyp-spezifischer Effekt zu sein.

6.2.3.2 VPA sensitiviert D05-Zellen, nicht aber A375-Zellen, gegenüber FM

Die bisher in dieser Arbeit vorgestellten Daten lassen vermuten, dass eine VPA-vermittelte Aktivierung von p53 zur Induktion von DDB2 und XPC führt und so eine Resistenz gegenüber FM verursacht (**Abb. 10**). Aufgrund von publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen lässt sich vermuten, dass VPA gleichzeitig p53-abhängige und p53-unabhängige Mechanismen auslöst. Möglicherweise überwiegt in D05 der proapoptotische Effekt von VPA, während in A375-Zellen, die ohnehin sehr resistent

gegenüber jeglicher Form von genotoxischem Stress sind, der gegenüber FM schützende Effekt der DDB2- und XPC-Induktion überwiegt.

6.2.4 VPA hat in den untersuchten Melanom-Zelllinien keinen Einfluss auf den Zellzyklus und Populations-Verdopplungszeit

Es ist allgemein bekannt, dass HDACi Zellzyklus-Arrest induzieren. Dieser Effekt wird durch Beeinflussung von p21, RB und E2F vermittelt (Spange et al., 2009). Eine Reihe verschiedener HDACi führt p53-abhängig und unabhängig zur Induktion von p21, was einen G1-Arrest zur Folge hat (Abramova et al., 2006; Hirsch and Bonham, 2004; Ju and Muller, 2003; Li and Wu, 2004; Ocker and Schneider-Stock, 2007). Durch Repression von Cyclinen, CDC25A und c-Myc verhindern sie die E2F1-vermittelte G1-S-Transition (Abramova et al., 2006). Auch die durch HDACi verursachte Hyperacetylierung von RB unterbindet seine Phosphorylierung, bewirkt so die Sequestrierung von E2F durch RB und verursacht damit ebenfalls einen G1-Block (Nguyen et al., 2004; Zhang and Dent, 2005). Für Melanome wurde ebenfalls gezeigt, dass HDACi Zellzyklusarrest induzieren (Peltonen et al., 2005; Valentini et al., 2007).

Da alkylierende Agenzien S-Phase-abhängig hochtoxische DSB induzieren, würde eine Verstärkung der Proliferation eine Sensitivierung bewirken. Vice versa hätte eine Verminderung der Proliferation oder ein Zellzyklusarrest eine Resistenz von Zellen gegenüber Alkylanzien zur Folge. Um Gründe für die unterschiedlichen Effekte von VPA auf die untersuchten Melanom-Zelllinien zu finden, wurden Zellzyklusverteilung und Proliferation nach 7-tägiger VPA-Behandlung analysiert (Abb. 22 und Abb. 23). Die VPA-Vorbehandlung hatte in allen vier Zelllinien weder einen Effekt auf die Zellzyklusverteilung, noch auf die Proliferation.

Tab. 5 gibt die mithilfe des Programms Graph Pad Prism ermittelten Verdopplungszeiten (h) mit und ohne VPA-Vorbehandlung wieder.

	- VPA	+ VPA
D05	29,1	33,8
D14	28,2	32,4
A375	19	22,8
RPMI-7951	47,3	49,3

Tab. 5: Verdopplungszeiten (h) der Zelllinien D05, D14, A375 und RPMI-7951 mit und ohne VPA-Vorbehandlung.

Unterschiede zwischen den vier Zelllinien bezüglich Zellzyklusarrest und Proliferation können folglich nicht ursächlich für die beobachteten Sensitivierungseffekte sein. Bemerkenswert ist die offensichtliche Diskrepanz zwischen den in dieser Arbeit vorgestellten Daten und der häufig beschriebenen Induktion von Zellzyklus-Arrest durch HDACi. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass andere Arbeitsgruppen eine deutlich kürzere Behandlung mit HDACi durchführten als wir. Sie untersuchten die biologischen Folgen der HDACi-Behandlung in der Regel zwischen 6 und 48 h nach Zugabe (Cheng et al., 2007; Daud et al., 2009; Papi et al., 2010; Peltonen et al., 2005; Van Niffler et al., 2011). Wir haben dies erst 196 h nach Behandlungsbeginn mit VPA getan, wobei zu diesem Zeitpunkt die Alkylanzien-Zugabe erfolgte. Möglicherweise induzierte VPA in den hier untersuchten Zelllinien einen frühen Zellzyklusarrest, der 196 h nach Behandlung durch Adaption der Tumorzellen aber schon überwunden war und daher nicht detektiert werden konnte. Diese Adaption spiegelt sich möglicherweise in der im PCR-Array für D05-Zellen beobachteten Induktion von Cyclin A und E wider und könnte eine direkte Reaktion auf die häufig durch HDACi ausgelöste Induktion von p21 sein (**Abb. 25**). Cyclin E kontrolliert die späte G1-Phase und den Übergang zur S-Phase, während Cyclin A das S-Phase-dominierende Cyclin ist. Über die Induktion von p21 (*CDKN1A*) durch VPA konnte mithilfe des PCR-Arrays aufgrund von Zelllinien-spezifischen Problemen mit den *CDKN1A*-Primern leider keine Aussage getroffen werden.

6.2.5 VPA aktiviert und reprimiert die Genexpression

HDACi bewirken die Hyperacetylierung von Histonen, was ein epigenetischer Mechanismus zur Aktivierung der Genexpression ist (s. 2.4.1). Zudem zählen auch Transkriptionsfaktoren selbst zu den Zielproteinen von HDACs (Spange et al., 2009). Da die Acetylierung von Transkriptionsfaktoren auch deren Inhibition verursachen kann, kann die Behandlung mit HDACi auch zur Repression der Genexpression führen (s. 2.4.2).

Um einen generellen Eindruck zu erhalten, welche zellulären Prozesse durch VPA beeinflusst werden, wurde die Genexpression von D05-Zellen nach VPA-Behandlung bzw. nach Kobehandlung mit VPA und Alkylanz mithilfe eines PCR-Arrays untersucht. Hierbei konnte die Expression von mehr als 90 Genen gleichzeitig untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit VPA wie erwartet zur Induktion und Repression der Genexpression führt. Hierbei sind Gene betroffen, die mit verschiedensten zellulären Prozessen wie Zellzyklus, Zelltod,

DNA-Schadensantwort, Stressantwort und Tumorprogression assoziiert sind. Ein mögliches an der Sensitivierung von D05-Zellen beteiligtes Kandidatengen ist *BAX*, ein Schlüsselprotein des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs (s. 2.5.1.2). Es liegt am Ende der Vorbehandlung, also zum Zeitpunkt der Alkylanzien-Behandlung, induziert vor (IF = 2,2). Allerdings ist nicht bekannt, ob diese Induktion auch auf Proteinebene zu beobachten ist. Dennoch stellt diese Beobachtung einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zur VPA-vermittelten Sensitivierung gegenüber alkylierenden Agenzien dar. So wurde schon mehrfach publiziert, dass HDACi *BAX* induzieren und so antitumorigene Effekte auslösen können. Auch für VPA selbst wurde in der Literatur mehrfach ein *BAX*-induzierender Effekt beschrieben, der auch oftmals als sensitivierendes Ereignis identifiziert werden konnte (Hacker et al., 2011; Jones et al., 2009; Papi et al., 2010; Shen et al., 2005).

Die in **Abb. 25B** dargestellte Induktion von FAS (CD95, Apo-1) spielt aufgrund der bisher in unserer Arbeitsgruppe gewonnenen Erkenntnisse wahrscheinlich keine Rolle bei der beobachteten Sensitivierung durch VPA gegenüber TMZ. Die Procaspase-8-Menge sind in Melanomzellen sehr niedrig (Roos et al., 2011). Daher ist die Erhöhung der Procaspase-8-Menge eine Voraussetzung für die effiziente Nutzung des FAS (CD95, Apo-1)-assoziierten extrinsischen Apoptose-Signalwegs und somit auch für Induktion von Apoptose durch TMZ (Roos et al., 2007; Roos et al., 2011). Dies stimmt überein mit den in **Abb. 24C** präsentierten Ergebnissen, nach denen VPA keine Induktion der Procaspase-8 verursacht und die Störung des FAS (CD95, Apo-1)-assoziierten Apoptose-Signalwegs keine Aufhebung des sensitivierenden Effekts gegenüber TMZ in D05-Zellen bewirkt.

6.2.6 HDACi beeinflussen die DNA-Reparatur

Die Sensitivierung von D05- und A375-Zellen gegenüber TMZ und FM könnte auch auf einem Einfluss von VPA auf die DNA-Reparatur beruhen. Beispielsweise würde eine VPA-vermittelte Verstärkung der MMR-Kapazität oder eine Reduktion der HR-Kapazität eine Sensitivierung gegenüber TMZ verursachen. Genauso könnte eine Verminderung der ICL-Reparaturkapazität eine Sensitivierung gegenüber FM bewirken.

Berichte über Wirkungen von HDACi auf NER und BER sind nicht bekannt. Ein Effekt von VPA auf Fanconi-Proteine wurde ebenfalls noch nicht beschrieben. Interessanterweise existiert aber eine Reihe von Berichten vorwiegend über Kinder, welche VPA als Antikonvulsivum erhalten haben und an VPA-induziertem Fanconi-

Syndrom erkrankten (Dhillon and Hogler, 2011; Endo et al., 2010; Knorr et al., 2004; Lande et al., 1993; Watanabe et al., 2005; Yoshikawa et al., 2002). Leider enthalten die Publikationen keine Aussage darüber, ob die für das Fanconi-Syndrom übliche Sensitivität gegenüber dem ICL-induzierenden Agens MMC ebenfalls zu den beobachteten Symptomen gehört.

Häufig wird ein sensitivierender Effekt von HDACi auf Krebszellen gegenüber IR beschrieben. Dies wird auf eine Reduktion der NHEJ-Kapazität zurückgeführt (Camphausen et al., 2005; Chinnaiyan et al., 2008; Purrucker et al., 2010). Meistens wurde eine HDACi-induzierte Reduktion der Proteine KU70, KU80 und DNA-PK oder die Acetylierung von KU70 beschrieben, was dessen Funktion hemmt (Chen et al., 2007; Chen et al., 2009; Hacker et al., 2011; Munshi et al., 2006). Für VPA selbst wurden auch sensitivierende Effekte auf verschiedene Tumorarten wie z.B. Gliom- und Kolonkarzinomzellen nachgewiesen (Blattmann et al., 2010; Karagiannis et al., 2006; Van Niflerik et al., 2011). Auch für Melanomzellen wurde eine radiosensitivierende Wirkung der HDACi Vorinostat, Natriumbutyrat und Trichostatin A gezeigt (Munshi et al., 2005; Munshi et al., 2006).

Es existiert auch eine Reihe von Publikationen, die Effekte von VPA auf die HR gezeigt haben. VPA reduziert die Expression der Proteine SMC5 und SMC6, welche in der HR involviert sind (Marchion et al., 2005a). Des Weiteren verursacht VPA in Prostatakarzinomzellen eine Reduktion der HR-Kapazität, welche mit verminderten RAD51- und BRCA1-Mengen einhergeht (Kachhap et al., 2010). Adimoolam und Kollegen haben gezeigt, dass der HDACi PCI-24781 eine Reduktion der RAD51-Menge bewirkt und die HR inhibiert (Adimoolam et al., 2007). Zudem haben Lee und Kollegen nachgewiesen, dass Vorinostat spezifisch in transformierten Zellen zur Verminderung der MRE11- und RAD51-Mengen und zur Phosphorylierung von H2AX führt (Lee et al., 2010; Lee, 2007).

Eine VPA-vermittelte Reduktion der HR-Kapazität wäre eine schlüssige Erklärung für die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Sensitivierung von Melanomzellen gegenüber TMZ und FM. Sie würde eine Verminderung der Reparatur von DSB verursachen und so die durch TMZ und FM induzierte Toxizität verstärken.

6.2.7 HDACi verursachen oxidativen Stress

Einige HDACi, unter ihnen auch VPA, gelten als Induktoren von oxidativem Stress, was mit der Oxidation von Proteinen, Lipiden und der DNA einhergeht. Diese Vorschädigung der Zellen könnte einen weiteren Grund für die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete VPA-vermittelte Sensitivierung gegenüber Alkylanzien

darstellen: Die Vorschädigung der Melanomzellen durch oxidativen Stress könnte die Schwelle zur Induktion von Apoptose durch Alkylanzien senken.

Für einige HDACi wurde nachgewiesen, dass sie oxidative DNA-Schäden induzieren (Butler et al., 2002; Ruefli et al., 2001; Sha and Winn, 2010; Xu et al., 2007). Bei der Reparatur dieser oxidativen DNA-Schäden durch die BER kann es zur Überlappung von Reparaturbereichen beider Stränge kommen, was einem DSB entspricht. Spätestens wenn die Replikationsgabel auf BER-Intermediate trifft, führt deren Kollaps zur Bildung von DSB. Dies könnte die häufig beobachtete Phosphorylierung von H2AX nach HDACi-Behandlung erklären (Petrucci et al., 2011; Rosato et al., 2008). Allerdings sind DSB hochtoxische Läsionen. Schon eine geringe Anzahl von DSB kann Apoptose induzieren. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Melanom-Zelllinien konnte generell nur eine geringe Toxizität durch die VPA-Behandlung selbst beobachtet werden (s. 5.2.2 und 5.2.3). Möglicherweise beruht diese - wenn auch niedrige VPA-induzierte Toxizität - auf einer Induktion von ROS-getriggelter Apoptose in einer Subpopulation von Zellen. Durch Setzen eines zweiten Schadens in Form von O⁶-Alkylierungen in Zellen, welche bereits oxidative Schäden aufweisen, könnte im Rest der Population der Schwellenwert zur Apoptose-Induktion reduziert werden.

6.2.8 Zusammenfassung und Ausblick

Einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten und noch zu untersuchenden Parameter, welche eine Sensitivierung der Melanomzellen gegenüber alkylierenden Zytostatika verursachen könnten, gibt **Abb. 28**. So wurde gezeigt, dass zwei der vier untersuchten Melanom-Zelllinien mit VPA gegenüber den alkylierenden Agenzien TMZ oder FM sensitiviert werden konnten. Auch konnte ausgeschlossen werden, dass diese Sensitivierung auf einem Einfluss von VPA auf die Verdopplungszeit der Zellen, die MGMT-Aktivität oder die FADD-abhängige extrinsische Apoptose-Signalkaskade beruht. Weitere Parameter, die noch nicht untersucht wurden, sind Effekte von VPA auf den intrinsischen Apoptose-Signalweg, die DNA Reparatur und den Redox-Status der Zellen.

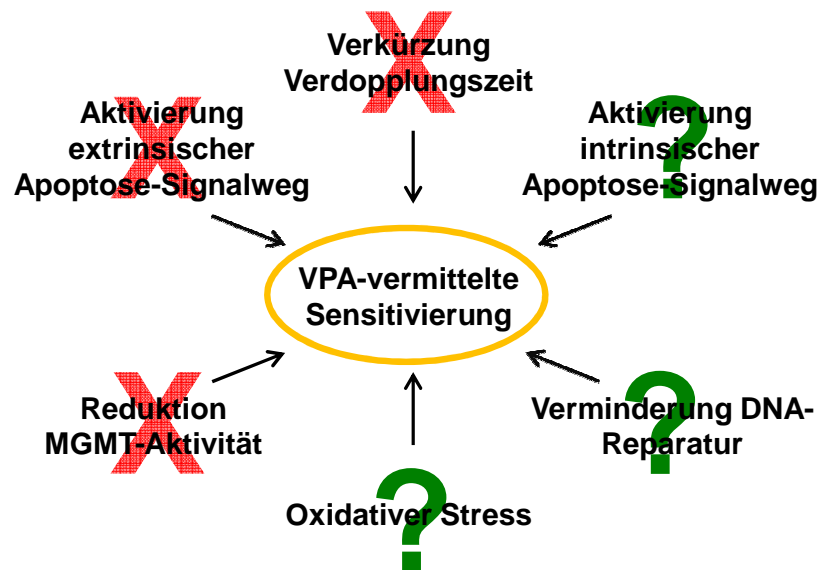


Abb. 28: Überblick über bereits untersuchte oder mögliche durch VPA beeinflusste Parameter, welche eine Sensitivierung von menschlichen Melanomzellen gegenüber alkylierenden Agenzien vermitteln könnten. X: Beteiligung konnte nicht belegt werden; ?: Beteiligung muss noch untersucht werden.

In **Abb. 29** sind die Effekte von VPA auf die DNA-Reparatur und Apoptose zusammengefasst. Es wird deutlich, dass VPA zahlreiche Proteine dieser beiden Prozesse reguliert. Diese Tatsache liefert sinnvolle Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen.

Durch die Untersuchungen der Zelllinie D05 mithilfe eines PCR-Arrays konnte die verstärkte Expression des proapoptotischen p53-Zielgens *BAX* als mögliche Ursache einer VPA-induzierten Sensitivierung identifiziert werden. Weitere Untersuchungen könnten sich zunächst mit der Bestätigung des Anstiegs von *BAX* auf Proteinebene befassen. Anschließend könnte mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen analysiert werden, ob in VPA-vorbehandelten Zellen nach Alkylanzien-Behandlung tatsächlich mehr *BAX* an der Mitochondrienmembran lokalisiert ist als in VPA-unvorbehandelten Zellen. Ergänzend hierzu könnte die verstärkte Induktion von Apoptose mithilfe von Fluorophoren, deren Fluoreszenz vom mitochondrialen Transmembran-Potenzial abhängt, verifiziert werden. Des Weiteren könnte mit bereits vorhandenen A375-Klonen, welche stabil dominant-negative Caspase-9 exprimieren, die Beteiligung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs bestätigt werden.

Da die meisten Melanome p53 „wildtypisch“ sind, wäre die Untersuchung der Korrelation zwischen dem p53-Status und der VPA-vermittelten Sensitivierung der Zellen von klinischer Bedeutung. Ein möglicher p53-abhängiger Sensitivierungseffekt könnte mithilfe von bereits etablierten D05-Klonen, welche einen stabilen p53 *Knockdown* aufweisen, untersucht werden.

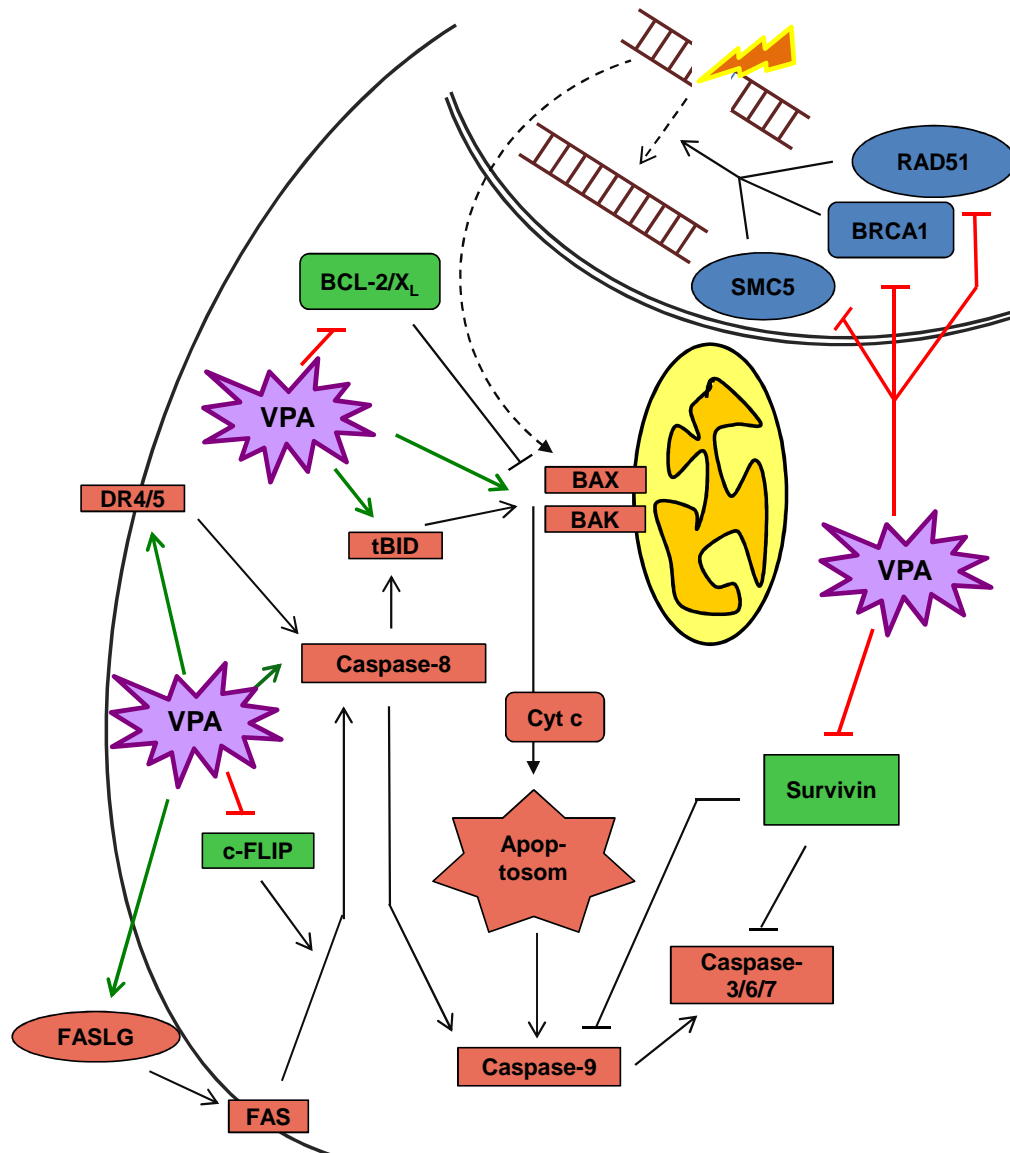


Abb. 29: Überblick über die Effekte von VPA auf die DNA-Reparatur und Apoptose
 VPA fördert die Apoptose durch Induktion der Todesrezeptoren DR4 und DR5, der Procaspase-8, des FAS-Liganden, BAX und BAK und Verminderung der Survivin-, BCL-2-, BCL-X_L- und c-FLIP-Proteinmengen. Zudem inhibiert VPA die Homologe Rekombination durch Reduktion der SMC5-, BRCA1- und RAD51-Proteinmengen; Verminderung der HR-Kapazität bei gleichzeitiger Entstehung von DSB (z. B. durch O⁶-AA) führt zur Verstärkung der apoptotischen Antwort. Quellen: Facchetti et al., 2004; Iacomino et al., 2008; Kachhap et al., 2010; Kaminsky et al., 2011; Lagneaux et al., 2007; Marchion et al., 2005a; Papi et al., 2010; Schuchmann et al., 2006; Ziauddin et al., 2006.

Das Vorhandensein von ROS, ausgelöst durch die Behandlung mit VPA, könnte mithilfe von Redox-sensitiven Fluorophoren nachgewiesen werden. Zusätzlich könnte per Immunfluoreszenzfärbung das Vorhandensein von oxidativen DNA-Addukten überprüft werden. Mithilfe von Radikalfängern wie N-Acetylcystein könnte der Einfluss von ROS auf die Sensitivierung der Melanomzellen gegenüber Alkylanzien identifiziert werden.

Die Untersuchungen zur Sensitivierung der Melanomzellen aufgrund einer Verstärkung der DNA-Schäden bzw. einer Verminderung der DNA-Reparatur könnten mit der Analyse der Phosphorylierung von H2AX, einem Marker für DSB,

beginnen. Des Weiteren könnten die Mengen von Proteinen, welche als durch HDACi reguliert beschrieben werden, bestimmt werden. Hierzu gehören RAD51, BRCA1, SMC5 und MRE11 (s. auch **Abb. 29**). Eine hierdurch verursachte Verminderung der HR-Kapazität könnte durch Detektion von DSB mit dem neutralen *Comet*-Assay bestätigt werden. Ob die VPA-Behandlung zu einer Induktion der DNA-Reparatur-Proteine XPC und DDB2 führt und damit das Ausbleiben der Sensitivierung von A375-Zellen gegenüber FM erklärbar ist, könnte ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, welche durch die in dieser Arbeit vorgestellten Daten gerechtfertigt sind.

7 Literaturverzeichnis

- Abramova, M.V., Pospelova, T.V., Nikulenkov, F.P., Hollander, C.M., Fornace, A.J., Jr., and Pospelov, V.A. (2006). G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* *281*, 21040-21051.
- Adimoolam, S., and Ford, J.M. (2002). p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 12985-12990.
- Adimoolam, S., and Ford, J.M. (2003). p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA repair* *2*, 947-954.
- Adimoolam, S., Sirisawad, M., Chen, J., Thiemann, P., Ford, J.M., and Buggy, J.J. (2007). HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 19482-19487.
- 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*, 8283-8289.
- Alonso, S.R., Ortiz, P., Pollan, M., Perez-Gomez, B., Sanchez, L., Acuna, M.J., Pajares, R., Martinez-Tello, F.J., Hortelano, C.M., Piris, M.A., *et al.* (2004). Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* *164*, 193-203.
- Ameisen, J.C. (1996). The origin of programmed cell death. *Science* *272*, 1278-1279.
- Amitani, I., Baskin, R.J., and Kowalczykowski, S.C. (2006). Visualization of Rad54, a chromatin remodeling protein, translocating on single DNA molecules. *Mol Cell* *23*, 143-148.
- Andersson, B.S., Sadeghi, T., Siciliano, M.J., Legerski, R., and Murray, D. (1996). Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs. *Cancer Chemother Pharmacol* *38*, 406-416.
- Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D., and Taniguchi, T. (2004). ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev* *18*, 1958-1963.
- Araujo, S.J., Nigg, E.A., and Wood, R.D. (2001). Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. *Mol Cell Biol* *21*, 2281-2291.
- Araujo, S.J., Tirode, F., Coin, F., Pospiech, H., Syvaioja, J.E., Stucki, M., Hubscher, U., Egly, J.M., and Wood, R.D. (2000). Nucleotide excision repair of DNA with

recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev* 14, 349-359.

Arce, C., Perez-Plasencia, C., Gonzalez-Fierro, A., de la Cruz-Hernandez, E., Revilla-Vazquez, A., Chavez-Blanco, A., Trejo-Becerril, C., Perez-Cardenas, E., Taja-Chayeb, L., Bargallo, E., *et al.* (2006). A proof-of-principle study of epigenetic therapy added to neoadjuvant doxorubicin cyclophosphamide for locally advanced breast cancer. *PLoS One* 1, e98.

Asahina, H., Kuraoka, I., Shirakawa, M., Morita, E.H., Miura, N., Miyamoto, I., Ohtsuka, E., Okada, Y., and Tanaka, K. (1994). The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage. *Mutat Res* 315, 229-237.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Atkins, M.B. (1997). The treatment of metastatic melanoma with chemotherapy and biologics. *Curr Opin Oncol* 9, 205-213.

Atmaca, A., Al-Batran, S.E., Maurer, A., Neumann, A., Heinzl, T., Hentsch, B., Schwarz, S.E., Hovelmann, S., Gottlicher, M., Knuth, A., *et al.* (2007). Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial. *British journal of cancer* 97, 177-182.

Augustine, C.K., Yoo, J.S., Potti, A., Yoshimoto, Y., Zipfel, P.A., Friedman, H.S., Nevins, J.R., Ali-Osman, F., and Tyler, D.S. (2009). Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. *Clin Cancer Res* 15, 502-510.

Avril, M.F., Aamdal, S., Grob, J.J., Hauschild, A., Mohr, P., Bonerandi, J.J., Weichenthal, M., Neuber, K., Bieber, T., Gilde, K., *et al.* (2004). Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol* 22, 1118-1125.

Ayer, D.E., Lawrence, Q.A., and Eisenman, R.N. (1995). Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* 80, 767-776.

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., *et al.* (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19, 3635-3648.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., *et al.* (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 27, 6199-6206.

- Bandyopadhyay, D., Mishra, A., and Medrano, E.E. (2004). Overexpression of histone deacetylase 1 confers resistance to sodium butyrate-mediated apoptosis in melanoma cells through a p53-mediated pathway. *Cancer research* 64, 7706-7710.
- Bartsch, H., and Montesano, R. (1984). Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis* 5, 1381-1393.
- 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 research* 67, 11886-11895.
- Batista, L.F., Roos, W.P., Kaina, B., and Menck, C.F. (2009). p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. *Molecular cancer research : MCR* 7, 237-246.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., *et al.* (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337-342.
- Baylin, S.B., and Ohm, J.E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6, 107-116.
- Beadling, C., Jacobson-Dunlop, E., Hodi, F.S., Le, C., Warrick, A., Patterson, J., Town, A., Harlow, A., Cruz, F., 3rd, Azar, S., *et al.* (2008). KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* 14, 6821-6828.
- Ben-Yehoyada, M., Wang, L.C., Kozekov, I.D., Rizzo, C.J., Gottesman, M.E., and Gautier, J. (2009). Checkpoint signaling from a single DNA interstrand crosslink. *Mol Cell* 35, 704-715.
- Bennett, D.C. (2008). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 27-38.
- Berger, S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-148.
- Bessho, T. (2003). Induction of DNA replication-mediated double strand breaks by psoralen DNA interstrand cross-links. *J Biol Chem* 278, 5250-5254.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
- Bitomsky, N., and Hofmann, T.G. (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *Febs J* 276, 6074-6083.
- Blagosklonny, M.V., Trostel, S., Kayastha, G., Demidenko, Z.N., Vassilev, L.T., Romanova, L.Y., Bates, S., and Fojo, T. (2005). Depletion of mutant p53 and cytotoxicity of histone deacetylase inhibitors. *Cancer research* 65, 7386-7392.

- Blattmann, C., Oertel, S., Ehemann, V., Thiemann, M., Huber, P.E., Bischof, M., Witt, O., Deubzer, H.E., Kulozik, A.E., Debus, J., *et al.* (2010). Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 78, 237-245.
- 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, 910-913.
- Bocangel, D., Sengupta, S., Mitra, S., and Bhakat, K.K. (2009). p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer research* 29, 3741-3750.
- Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature reviews* 5, 769-784.
- Boldogh, I., Ramana, C.V., Chen, Z., Biswas, T., Hazra, T.K., Grosch, S., Grombacher, T., Mitra, S., and Kaina, B. (1998). Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. *Cancer research* 58, 3950-3956.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P.N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., *et al.* (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467, 596-599.
- Bourdon, J.C. (2007). p53 and its isoforms in cancer. *British journal of cancer* 97, 277-282.
- Bowden, N.A., Ashton, K.A., Avery-Kiejda, K.A., Zhang, X.D., Hersey, P., and Scott, R.J. (2010). Nucleotide excision repair gene expression after Cisplatin treatment in melanoma. *Cancer research* 70, 7918-7926.
- Box, N.F., and Terzian, T. (2008). The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 525-533.
- Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M., and Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* 26, 5468-5476.
- Branch, P., Aquilina, G., Bignami, M., and Karran, P. (1993). Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature* 362, 652-654.
- Brent, T.P., Lestrud, S.O., Smith, D.G., and Remack, J.S. (1987a). 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 research* 47, 3384-3387.

Brent, T.P., Remack, J.S., and Smith, D.G. (1987b). Characterization of a novel reaction by human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-treated DNA. *Cancer research* 47, 6185-6188.

Brundrett, R.B. (1980). Chemistry of nitrosoureas. Intermediacy of 4,5-dihydro-1,2,3-oxadiazole in 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea decomposition. *J Med Chem* 23, 1245-1247.

Bug, G., Ritter, M., Wassmann, B., Schoch, C., Heinzl, T., Schwarz, K., Romanski, A., Kramer, O.H., Kampfmann, M., Hoelzer, D., *et al.* (2005). Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia. *Cancer* 104, 2717-2725.

Bugreev, D.V., Hanaoka, F., and Mazin, A.V. (2007). Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nature structural & molecular biology* 14, 746-753.

Butler, L.M., Zhou, X., Xu, W.S., Scher, H.I., Rifkind, R.A., Marks, P.A., and Richon, V.M. (2002). The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11700-11705.

Buzaid, A.C., and Legha, S.S. (1994). Combination of chemotherapy with interleukin-2 and interferon-alfa for the treatment of advanced melanoma. *Semin Oncol* 21, 23-28.

Calabrese, J.R., and Delucchi, G.A. (1989). Phenomenology of rapid cycling manic depression and its treatment with valproate. *The Journal of clinical psychiatry* 50 *Suppl*, 30-34.

Camphausen, K., Cerna, D., Scott, T., Sproull, M., Burgan, W.E., Cerra, M.A., Fine, H., and Tofilon, P.J. (2005). Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid. *Int J Cancer* 114, 380-386.

Cantley, L.C., and Neel, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240-4245.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Carew, J.S., Giles, F.J., and Nawrocki, S.T. (2008). Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* 269, 7-17.

- Castedo, M., Ferri, K., Roumier, T., Metivier, D., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2002). Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 265, 39-47.
- Caulfield, J.L., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (2003). Nitric oxide-induced interstrand cross-links in DNA. *Chem Res Toxicol* 16, 571-574.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., *et al.* (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364, 2507-2516.
- Chateauvieux, S., Morceau, F., Dicato, M., and Diederich, M. (2010). Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010.
- Chen, C.H., Chang, Y.J., Ku, M.S., Chung, K.T., and Yang, J.T. (2011). Enhancement of temozolomide-induced apoptosis by valproic acid in human glioma cell lines through redox regulation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 89, 303-315.
- Chen, C.S., Wang, Y.C., Yang, H.C., Huang, P.H., Kulp, S.K., Yang, C.C., Lu, Y.S., Matsuyama, S., Chen, C.Y., and Chen, C.S. (2007). Histone deacetylase inhibitors sensitize prostate cancer cells to agents that produce DNA double-strand breaks by targeting Ku70 acetylation. *Cancer research* 67, 5318-5327.
- 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, 1503-1507.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2001a). Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell* 8, 1105-1115.
- Chen, X., Wong, P., Radany, E., and Wong, J.Y. (2009). HDAC inhibitor, valproic acid, induces p53-dependent radiosensitization of colon cancer cells. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 24, 689-699.
- Chen, X., Zhang, Y., Douglas, L., and Zhou, P. (2001b). UV-damaged DNA-binding proteins are targets of CUL-4A-mediated ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 276, 48175-48182.
- Chen, Z., Xu, X.S., Yang, J., and Wang, G. (2003). Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis. *Carcinogenesis* 24, 1111-1121.
- Cheng, Y.-C., Lin, H., Huang, M.-J., Chow, J.-M., Lin, S., and Liu, H.E. (2007). Downregulation of c-Myc is critical for valproic acid-induced growth arrest and

myeloid differentiation of acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 31, 1403-1411.

Chinnaiyan, P., Cerna, D., Burgan, W.E., Beam, K., Williams, E.S., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2008). Postradiation sensitization of the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Clin Cancer Res* 14, 5410-5415.

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, 1396-1402.

Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 13, 994-1002.

Choi, J.H., Kwon, H.J., Yoon, B.I., Kim, J.H., Han, S.U., Joo, H.J., and Kim, D.Y. (2001). Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res* 92, 1300-1304.

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, 123-129.

Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W.P., and Kaina, B. (2011). O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta* 1816, 179-190.

Christofferson, D.E., and Yuan, J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 22, 263-268.

Chu, G., and Chang, E. (1988). Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* 242, 564-567.

Cipak, L., Watanabe, N., and Bessho, T. (2006). The role of BRCA2 in replication-coupled DNA interstrand cross-link repair in vitro. *Nature structural & molecular biology* 13, 729-733.

Colvin, M., Cowens, J.W., Brundrett, R.B., Kramer, B.S., and Ludlum, D.B. (1974). Decomposition of BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) in aqueous solution. *Biochemical and biophysical research communications* 60, 515-520.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Costello, J.F., Futscher, B.W., Kroes, R.A., and Pieper, R.O. (1994a). Methylation-related chromatin structure is associated with exclusion of transcription factors from and suppressed expression of the O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene in human glioma cell lines. *Mol Cell Biol* 14, 6515-6521.

- Costello, J.F., Futscher, B.W., Tano, K., Graunke, D.M., and Pieper, R.O. (1994b). Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J Biol Chem* 269, 17228-17237.
- Creagan, E.T., Dalton, R.J., Ahmann, D.L., Jung, S.H., Morton, R.F., Langdon, R.M., Jr., Kugler, J., and Rodrigue, L.J. (1995). Randomized, surgical adjuvant clinical trial of recombinant interferon alfa-2a in selected patients with malignant melanoma. *J Clin Oncol* 13, 2776-2783.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2), 233-249.
- Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 24, 4340-4346.
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., *et al.* (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-553.
- D'Andrea, A.D., and Grompe, M. (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3, 23-34.
- Dahl, C., and Guldborg, P. (2007). The genome and epigenome of malignant melanoma. *Apmis* 115, 1161-1176.
- Danam, R.P., Howell, S.R., Brent, T.P., and Harris, L.C. (2005). Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. *Molecular cancer therapeutics* 4, 61-69.
- Daud, A.I., Dawson, J., DeConti, R.C., Bicaku, E., Marchion, D., Bastien, S., Hausheer, F.A., 3rd, Lush, R., Neuger, A., Sullivan, D.M., *et al.* (2009). Potentiation of a topoisomerase I inhibitor, karenitecin, by the histone deacetylase inhibitor valproic acid in melanoma: translational and phase I/II clinical trial. *Clin Cancer Res* 15, 2479-2487.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370, 737-749.
- 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, 7980-7990.
- De Silva, I.U., McHugh, P.J., Clingen, P.H., and Hartley, J.A. (2002). Defects in interstrand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to cisplatin. *Nucleic Acids Res* 30, 3848-3856.

- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.
- DeMarini, D.M. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res* 567, 447-474.
- Dendouga, N., Gao, H., Moechars, D., Janicot, M., Vialard, J., and McGowan, C.H. (2005). Disruption of murine Mus81 increases genomic instability and DNA damage sensitivity but does not promote tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 25, 7569-7579.
- Dhillon, N., and Hogler, W. (2011). Fractures and Fanconi syndrome due to prolonged sodium valproate use. *Neuropediatrics* 42, 119-121.
- Dolan, M.E., Moschel, R.C., and Pegg, A.E. (1990). Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5368-5372.
- Dronkert, M.L., and Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* 486, 217-247.
- 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, 6443-6447.
- Duffy, D.L., Box, N.F., Chen, W., Palmer, J.S., Montgomery, G.W., James, M.R., Hayward, N.K., Martin, N.G., and Sturm, R.A. (2004). Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Human molecular genetics* 13, 447-461.
- Eggermont, A.M., Suci, S., MacKie, R., Ruka, W., Testori, A., Kruit, W., Punt, C.J., Delauney, M., Sales, F., Groenewegen, G., *et al.* (2005). Post-surgery adjuvant therapy with intermediate doses of interferon alfa 2b versus observation in patients with stage IIb/III melanoma (EORTC 18952): randomised controlled trial. *Lancet* 366, 1189-1196.
- Egyhazi, S., Hansson, J., and Ringborg, U. (1995). O6-methylguanine-DNA methyltransferase activities in biopsies of human melanoma tumours. *British journal of cancer* 71, 37-39.
- Egyhazi, S., Margison, G.P., Hansson, J., and Ringborg, U. (1997). Immunohistochemical examination of the expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human melanoma metastases. *Eur J Cancer* 33, 129-134.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Elwood, J.M., and Jopson, J. (1997). Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 73, 198-203.

- Emmert, S., Kobayashi, N., Khan, S.G., and Kraemer, K.H. (2000). The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2151-2156.
- Endo, A., Fujita, Y., Fuchigami, T., Takahashi, S., and Mugishima, H. (2010). Fanconi syndrome caused by valproic acid. *Pediatric neurology* 42, 287-290.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286-298.
- Esteve, P.O., Chin, H.G., and Pradhan, S. (2005). Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1000-1005.
- Ethell, D.W., and Buhler, L.A. (2003). Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J Clin Immunol* 23, 363-370.
- Eton, O., Legha, S.S., Bedikian, A.Y., Lee, J.J., Buzaid, A.C., Hodges, C., Ring, S.E., Papadopoulos, N.E., Plager, C., East, M.J., *et al.* (2002). Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 20, 2045-2052.
- Euvrard, S., Kanitakis, J., and Claudy, A. (2003). Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 348, 1681-1691.
- Euvrard, S., Kanitakis, J., Cochat, P., and Claudy, A. (2004). Skin cancers following pediatric organ transplantation. *Dermatol Surg* 30, 616-621.
- Evans, E., Moggs, J.G., Hwang, J.R., Egly, J.M., and Wood, R.D. (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *Embo J* 16, 6559-6573.
- Facchetti, F., Previdi, S., Ballarini, M., Minucci, S., Perego, P., and La Porta, C.A. (2004). Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 9, 573-582.
- Fayolle, C., Pourchet, J., de Fromentel, C.C., Puisieux, A., Dore, J.F., and Voeltzel, T. (2008). Gadd45a activation protects melanoma cells from ultraviolet B-induced apoptosis. *J Invest Dermatol* 128, 196-202.
- Ferguson, D.O., and Holloman, W.K. (1996). Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5419-5424.
- Fety, R., Lucas, C., Solere, P., Cour, V., and Vignoud, J. (1992). Hepatic intra-arterial infusion of fotemustine: pharmacokinetics. *Cancer Chemother Pharmacol* 31, 118-122.

- Fisher, L.A., Bessho, M., and Bessho, T. (2008). Processing of a psoralen DNA interstrand cross-link by XPF-ERCC1 complex in vitro. *J Biol Chem* 283, 1275-1281.
- Fitch, M.E., Cross, I.V., Turner, S.J., Adimoolam, S., Lin, C.X., Williams, K.G., and Ford, J.M. (2003a). The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. *DNA repair* 2, 819-826.
- Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A., and Ford, J.M. (2003b). In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J Biol Chem* 278, 46906-46910.
- Fiumicino, S., Martinelli, S., Colussi, C., Aquilina, G., Leonetti, C., Crescenzi, M., and Bignami, M. (2000). Sensitivity to DNA cross-linking chemotherapeutic agents in mismatch repair-defective cells in vitro and in xenografts. *Int J Cancer* 85, 590-596.
- Ford, J.M., and Hanawalt, P.C. (1997). Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J Biol Chem* 272, 28073-28080.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., *et al.* (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics* 37, 391-400.
- Friedberg, E.C. (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 22-33.
- Fritz, G., Tano, K., Mitra, S., and Kaina, B. (1991). Inducibility of the DNA repair gene encoding O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol Cell Biol* 11, 4660-4668.
- Fujiwara, Y., Masutani, C., Mizukoshi, T., Kondo, J., Hanaoka, F., and Iwai, S. (1999). Characterization of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein. *J Biol Chem* 274, 20027-20033.
- Furuta, J., Umebayashi, Y., Miyamoto, K., Kikuchi, K., Otsuka, F., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2004). Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer science* 95, 962-968.
- Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K.H., and Pommier, Y. (2002). Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer research* 62, 4899-4902.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14, 1237-1243.

- Garbe, C., Buttner, P., Weiss, J., Soyer, H.P., Stocker, U., Kruger, S., Roser, M., Weckbecker, J., Panizzon, R., Bahmer, F., *et al.* (1994). Associated factors in the prevalence of more than 50 common melanocytic nevi, atypical melanocytic nevi, and actinic lentigines: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 102, 700-705.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7, 249-262.
- Garcia-Manero, G., Kantarjian, H.M., Sanchez-Gonzalez, B., Yang, H., Rosner, G., Verstovsek, S., Rytting, M., Wierda, W.G., Ravandi, F., Koller, C., *et al.* (2006). Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood* 108, 3271-3279.
- Geacintov, N.E., Broyde, S., Buterin, T., Naegeli, H., Wu, M., Yan, S., and Patel, D.J. (2002). Thermodynamic and structural factors in the removal of bulky DNA adducts by the nucleotide excision repair machinery. *Biopolymers* 65, 202-210.
- Ghiorzo, P., Villaggio, B., Sementa, A.R., Hansson, J., Platz, A., Nicolo, G., Spina, B., Canepa, M., Palmer, J.M., Hayward, N.K., *et al.* (2004). Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic lesions from familial melanoma patients. *Hum Pathol* 35, 25-33.
- Gill, S., Shapiro, J., Westerman, D., and Prince, H.M. (2007). Long-term survival and secondary acute leukemia after fotemustine therapy for metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 25, 4493-4494.
- Gillespie, S., Borrow, J., Zhang, X.D., and Hersey, P. (2006). Bim plays a crucial role in synergistic induction of apoptosis by the histone deacetylase inhibitor SBHA and TRAIL in melanoma cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 11, 2251-2265.
- Glaser, K.B. (2007). HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochemical pharmacology* 74, 659-671.
- Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., and Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363, 15-23.
- Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1757, 639-647.
- Goldstein, A.M., Chan, M., Harland, M., Gillanders, E.M., Hayward, N.K., Avril, M.F., Azizi, E., Bianchi-Scarra, G., Bishop, D.T., Bressac-de Paillerets, B., *et al.* (2006).

- High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer research* 66, 9818-9828.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32, 37-43.
- 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 research* 52, 6052-6058.
- Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G., *et al.* (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20, 6969-6978.
- Grant, S., Easley, C., and Kirkpatrick, P. (2007). Vorinostat. *Nature reviews* 6, 21-22.
- Graves, R.J., Li, B.F., and Swann, P.F. (1987). Repair of synthetic oligonucleotides containing O6-methylguanine, O6-ethylguanine and O4-methylthymine, by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *IARC scientific publications*, 41-43.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Greenberg, R.A., Sobhian, B., Pathania, S., Cantor, S.B., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev* 20, 34-46.
- Gregoret, I.V., Lee, Y.M., and Goodson, H.V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 338, 17-31.
- Grenon, M., Gilbert, C., and Lowndes, N.F. (2001). Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell Biol* 3, 844-847.
- Grob, J.J., Dreno, B., de la Salmoniere, P., Delaunay, M., Cupissol, D., Guillot, B., Souteyrand, P., Sassolas, B., Cesarini, J.P., Lionnet, S., *et al.* (1998). Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma. *Lancet* 351, 1905-1910.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., and Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 113, 357-367.

- Grombacher, T., and Kaina, B. (1995). Constitutive expression and inducibility of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in rat liver cells exhibiting different status of differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1270, 63-72.
- Grombacher, T., Mitra, S., and Kaina, B. (1996). Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis* 17, 2329-2336.
- Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chemistry & biology* 9, 3-16.
- Guarente, L., and Picard, F. (2005). Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* 120, 473-482.
- Gudbjartsson, D.F., Sulem, P., Stacey, S.N., Goldstein, A.M., Rafnar, T., Sigurgeirsson, B., Benediktsdottir, K.R., Thorisdottir, K., Ragnarsson, R., Sveinsdottir, S.G., *et al.* (2008). ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nature genetics* 40, 886-891.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X., and Dunphy, W.G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 14, 2745-2756.
- Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 5-17.
- Hacker, S., Karl, S., Mader, I., Cristofanon, S., Schweitzer, T., Krauss, J., Rutkowski, S., Debatin, K.M., and Fulda, S. (2011). Histone deacetylase inhibitors prime medulloblastoma cells for chemotherapy-induced apoptosis by enhancing p53-dependent Bax activation. *Oncogene* 30, 2275-2281.
- Haigis, M.C., and Guarente, L.P. (2006). Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20, 2913-2921.
- Hajji, N., Wallenborg, K., Vlachos, P., Nyman, U., Hermanson, O., and Joseph, B. (2008). Combinatorial action of the HDAC inhibitor trichostatin A and etoposide induces caspase-mediated AIF-dependent apoptotic cell death in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncogene* 27, 3134-3144.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., *et al.* (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352.
- Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H.Y., Neal, D.E., and Robson, C.N. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59, 177-189.

- Hampson, R., Humbert, O., Macpherson, P., Aquilina, G., and Karran, P. (1997). Mismatch repair defects and O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in acquired resistance to methylating agents in human cells. *J Biol Chem* 272, 28596-28606.
- Hanada, K., Budzowska, M., Modesti, M., Maas, A., Wyman, C., Essers, J., and Kanaar, R. (2006). The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks. *Embo J* 25, 4921-4932.
- Hansson, J., Aamdal, S., Bastholt, L., Brandberg, Y., Hernberg, M., Nilsson, B., Stierner, U., and von der Maase, H. (2011). Two different durations of adjuvant therapy with intermediate-dose interferon alfa-2b in patients with high-risk melanoma (Nordic IFN trial): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 12, 144-152.
- Harris, L.C., Potter, P.M., Tano, K., Shiota, S., Mitra, S., and Brent, T.P. (1991). Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res* 19, 6163-6167.
- Hartman, A.R., and Ford, J.M. (2002). BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nature genetics* 32, 180-184.
- Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 789-829.
- Hauschild, A., Dummer, R., Ugurel, S., Kaehler, K.C., Egberts, F., Fink, W., Both-Skalsky, J., Laetsch, B., and Schadendorf, D. (2008). Combined treatment with pegylated interferon-alpha-2a and dacarbazine in patients with advanced metastatic melanoma: a phase 2 study. *Cancer* 113, 1404-1411.
- Hauschild, A., Weichenthal, M., Balda, B.R., Becker, J.C., Wolff, H.H., Tilgen, W., Schulte, K.W., Ring, J., Schadendorf, D., Lischner, S., *et al.* (2003). Prospective randomized trial of interferon alfa-2b and interleukin-2 as adjuvant treatment for resected intermediate- and high-risk primary melanoma without clinically detectable node metastasis. *J Clin Oncol* 21, 2883-2888.
- 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, 10646-10654.
- Hayward, N.K. (2003). Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 22, 3053-3062.

- Hejna, J., Holtorf, M., Hines, J., Mathewson, L., Hemphill, A., Al-Dhalimy, M., Olson, S.B., and Moses, R.E. (2008). Tip60 is required for DNA interstrand cross-link repair in the Fanconi anemia pathway. *J Biol Chem* 283, 9844-9851.
- Heyer, W.D., Li, X., Rolfsmeier, M., and Zhang, X.P. (2006). Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res* 34, 4115-4125.
- Hirsch, C.L., and Bonham, K. (2004). Histone deacetylase inhibitors regulate p21WAF1 gene expression at the post-transcriptional level in HepG2 cells. *FEBS letters* 570, 37-40.
- Ho, P.K., and Hawkins, C.J. (2005). Mammalian initiator apoptotic caspases. *Febs J* 272, 5436-5453.
- Hocker, T., and Tsao, H. (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat* 28, 578-588.
- Hocker, T.L., Singh, M.K., and Tsao, H. (2008). Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol* 128, 2575-2595.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hollenbeak, C.S., Todd, M.M., Billingsley, E.M., Harper, G., Dyer, A.M., and Lengerich, E.J. (2005). Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. *Cancer* 104, 1962-1967.
- Holliday, R. (2007). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical research* 89, 285-307.
- Holly, E.A., Kelly, J.W., Shpall, S.N., and Chiu, S.H. (1987). Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 17, 459-468.
- Hopfner, K.P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R.A., Usui, T., Owen, B.A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J.L., McMurray, C.T., *et al.* (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418, 562-566.
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell death. *N Engl J Med* 361, 1570-1583.
- 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 research* 45, 1737-1743.
- Huang, Y., Myers, S.J., and Dingledine, R. (1999). Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat Neurosci* 2, 867-872.

- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., and Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* *417*, 455-458.
- Huen, M.S., Sy, S.M., and Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 138-148.
- Hussain, S., Wilson, J.B., Medhurst, A.L., Hejna, J., Witt, E., Ananth, S., Davies, A., Masson, J.Y., Moses, R., West, S.C., *et al.* (2004). Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Human molecular genetics* *13*, 1241-1248.
- Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 424-428.
- Hwang, B.J., Toering, S., Francke, U., and Chu, G. (1998). p48 Activates a UV-damaged-DNA binding factor and is defective in xeroderma pigmentosum group E cells that lack binding activity. *Mol Cell Biol* *18*, 4391-4399.
- Iacomino, G., Medici, M.C., and Russo, G.L. (2008). Valproic acid sensitizes K562 erythroleukemia cells to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *Anticancer research* *28*, 855-864.
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* *102*, 463-473.
- Inga, A., Chen, F.X., Monti, P., Aprile, A., Campomenosi, P., Menichini, P., Ottaggio, L., Viaggi, S., Abbondandolo, A., Gold, B., *et al.* (1999). N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea tethered to lexitropsin induces minor groove lesions at the p53 cDNA that are more cytotoxic than mutagenic. *Cancer research* *59*, 689-695.
- Inoue, A., and Fujimoto, D. (1969). Enzymatic deacetylation of histone. *Biochemical and biophysical research communications* *36*, 146-150.
- Inoue, Y., Suzuki, T., Takimoto, M., Irei, M., Yoshioka, S., Shibuya, Y., Kato, M., Koike, M., and Takahashi, M. (2005). Treatment with valproic acid for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Ann Hematol* *84*, 833-834.
- Islas, A.L., Baker, F.J., and Hanawalt, P.C. (1994). Transcription-coupled repair of psoralen cross-links but not monoadducts in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* *33*, 10794-10799.
- Jacquillat, C., Khayat, D., Banzet, P., Weil, M., Fumoleau, P., Avril, M.F., Namer, M., Bonnetterre, J., Kerbrat, P., Bonerandi, J.J., *et al.* (1990). Final report of the French multicenter phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 evaluable patients

- with disseminated malignant melanoma including patients with cerebral metastases. *Cancer* 66, 1873-1878.
- Jagerstad, M., and Skog, K. (2005). Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res* 574, 156-172.
- Jagtap, P., and Szabo, C. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature reviews* 4, 421-440.
- Jammes, H., Junien, C., and Chavatte-Palmer, P. (2011). Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. *Reprod Fertil Dev* 23, 64-74.
- Janssen, K., Eichhorn-Grombacher, U., Schlink, K., Nitzsche, S., Oesch, F., and Kaina, B. (2001). Long-time expression of DNA repair enzymes MGMT and APE in human peripheral blood mononuclear cells. *Archives of toxicology* 75, 306-312.
- Javadov, S., and Karmazyn, M. (2007). Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 20, 1-22.
- Jeanmougin, F., Wurtz, J.M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* 22, 151-153.
- Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., *et al.* (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4, 321-328.
- Joenje, H., and Patel, K.J. (2001). The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2, 446-457.
- Johnstone, R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature reviews* 1, 287-299.
- Jones, J., Juengel, E., Mickuckyte, A., Hudak, L., Wedel, S., Jonas, D., and Blaheta, R.A. (2009). The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters growth properties of renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 2376-2385.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Joseph, E.W., Pratilas, C.A., Poulikakos, P.I., Tadi, M., Wang, W., Taylor, B.S., Halilovic, E., Persaud, Y., Xing, F., Viale, A., *et al.* (2010). The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14903-14908.
- Joza, N., Kroemer, G., and Penninger, J.M. (2002). Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* 18, 142-149.
- Ju, R., and Muller, M.T. (2003). Histone deacetylase inhibitors activate p21(WAF1) expression via ATM. *Cancer research* 63, 2891-2897.

- Kachhap, S.K., Rosmus, N., Collis, S.J., Kortenhorst, M.S., Wissing, M.D., Hedayati, M., Shabbeer, S., Mendonca, J., Deangelis, J., Marchionni, L., *et al.* (2010). Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. *PLoS One* 5, e11208.
- Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13, 2570-2580.
- 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* 6, 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 MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* 12, 1857-1867.
- Kaina, B., Margison, G.P., and Christmann, M. (2010). Targeting O-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 67, 3663-3681.
- 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, 227-241.
- Kaminsky, V.O., Surova, O.V., Vaculova, A., and Zhivotovsky, B. (2011). Combined inhibition of DNA methyltransferase and histone deacetylase restores caspase-8 expression and sensitizes SCLC cells to TRAIL. *Carcinogenesis* 32, 1450-1458.
- Kandel, E.S., and Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253, 210-229.
- Karagiannis, T.C., Kn, H., and El-Osta, A. (2006). The epigenetic modifier, valproic acid, enhances radiation sensitivity. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 1, 131-137.
- Karran, P., and Bignami, M. (1994). DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* 16, 833-839.
- Kaufmann, R., Spieth, K., Leiter, U., Mauch, C., von den Driesch, P., Vogt, T., Linse, R., Tilgen, W., Schadendorf, D., Becker, J.C., *et al.* (2005). Temozolomide in combination with interferon-alfa versus temozolomide alone in patients with

- advanced metastatic melanoma: a randomized, phase III, multicenter study from the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 23, 9001-9007.
- Kaye, J., Smith, C.A., and Hanawalt, P.C. (1980). DNA repair in human cells containing photoadducts of 8-methoxypsoralen or angelicin. *Cancer research* 40, 696-702.
- Keeney, S., and Neale, M.J. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans* 34, 523-525.
- Kennedy, B.K., Austriaco, N.R., Jr., Zhang, J., and Guarente, L. (1995). Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* 80, 485-496.
- Kennedy, R.D., and D'Andrea, A.D. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* 19, 2925-2940.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.
- Khan, O., and La Thangue, N.B. (2008). Drug Insight: histone deacetylase inhibitor-based therapies for cutaneous T-cell lymphomas. *Nature clinical practice* 5, 714-726.
- 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, 147-151.
- Khayat, D., Cour, V., Bizzari, J.P., Aigner, K., Borel, C., Cohen-Alloro, G., Weil, M., Auclerc, G., Buthiau, D., Bousquet, J.C., *et al.* (1991). Fotemustine (S 10036) in the intra-arterial treatment of liver metastasis from malignant melanoma. A phase II Study. *Am J Clin Oncol* 14, 400-404.
- Khayat, D., Giroux, B., Berille, J., Cour, V., Gerard, B., Sarkany, M., Bertrand, P., and Bizzari, J.P. (1994). Fotemustine in the treatment of brain primary tumors and metastases. *Cancer Invest* 12, 414-420.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8, 1348-1358.
- Kim, H.Y., Voehler, M., Harris, T.M., and Stone, M.P. (2002). Detection of an interchain carbinolamine cross-link formed in a CpG sequence by the acrolein DNA adduct gamma-OH-1,N(2)-propano-2'-deoxyguanosine. *Journal of the American Chemical Society* 124, 9324-9325.

- Kim, M.S., Blake, M., Baek, J.H., Kohlhagen, G., Pommier, Y., and Carrier, F. (2003). Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer research* 63, 7291-7300.
- Kirkwood, J.M., Ibrahim, J.G., Sondak, V.K., Richards, J., Flaherty, L.E., Ernstoff, M.S., Smith, T.J., Rao, U., Steele, M., and Blum, R.H. (2000). High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 18, 2444-2458.
- Kirkwood, J.M., Manola, J., Ibrahim, J., Sondak, V., Ernstoff, M.S., and Rao, U. (2004). A pooled analysis of eastern cooperative oncology group and intergroup trials of adjuvant high-dose interferon for melanoma. *Clin Cancer Res* 10, 1670-1677.
- Kirkwood, J.M., Strawderman, M.H., Ernstoff, M.S., Smith, T.J., Borden, E.C., and Blum, R.H. (1996). Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 14, 7-17.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Kleeberg, U.R., Suci, S., Brocker, E.B., Ruiters, D.J., Chartier, C., Lienard, D., Marsden, J., Schadendorf, D., and Eggermont, A.M. (2004). Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial. rIFN-alpha2b versus rIFN-gamma versus ISCADOR M versus observation after surgery in melanoma patients with either high-risk primary (thickness >3 mm) or regional lymph node metastasis. *Eur J Cancer* 40, 390-402.
- Knorr, M., Schaper, J., Harjes, M., Mayatepek, E., and Rosenbaum, T. (2004). Fanconi syndrome caused by antiepileptic therapy with valproic Acid. *Epilepsia* 45, 868-871.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kozekov, I.D., Nechev, L.V., Moseley, M.S., Harris, C.M., Rizzo, C.J., Stone, M.P., and Harris, T.M. (2003). DNA interchain cross-links formed by acrolein and crotonaldehyde. *Journal of the American Chemical Society* 125, 50-61.
- Kozekov, I.D., Nechev, L.V., Sanchez, A., Harris, C.M., Lloyd, R.S., and Harris, T.M. (2001). Interchain cross-linking of DNA mediated by the principal adduct of acrolein. *Chem Res Toxicol* 14, 1482-1485.

- Kramer, O.H., Baus, D., Knauer, S.K., Stein, S., Jager, E., Stauber, R.H., Grez, M., Pfitzner, E., and Heinzl, T. (2006). Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes Dev* 20, 473-485.
- Krebs in Deutschland 2005/06. Robert-Koch Institut (2010). Häufigkeiten und Trends.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., *et al.* (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1463-1467.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.
- Kuendgen, A., Schmid, M., Schlenk, R., Knipp, S., Hildebrandt, B., Steidl, C., Germing, U., Haas, R., Dohner, H., and Gattermann, N. (2006). The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 106, 112-119.
- Kuendgen, A., Strupp, C., Aivado, M., Bernhardt, A., Hildebrandt, B., Haas, R., Germing, U., and Gattermann, N. (2004). Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* 104, 1266-1269.
- Kumaresan, K.R., Hwang, M., Thelen, M.P., and Lambert, M.W. (2002). Contribution of XPF functional domains to the 5' and 3' incisions produced at the site of a psoralen interstrand cross-link. *Biochemistry* 41, 890-896.
- Kumaresan, K.R., and Lambert, M.W. (2000). Fanconi anemia, complementation group A, cells are defective in ability to produce incisions at sites of psoralen interstrand cross-links. *Carcinogenesis* 21, 741-751.
- Kumaresan, K.R., Sridharan, D.M., McMahon, L.W., and Lambert, M.W. (2007). Deficiency in incisions produced by XPF at the site of a DNA interstrand cross-link in Fanconi anemia cells. *Biochemistry* 46, 14359-14368.
- Kurbanov, B.M., Fecker, L.F., Geilen, C.C., Sterry, W., and Eberle, J. (2007). Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF-kappaB but is related to downregulation of initiator caspases and DR4. *Oncogene* 26, 3364-3377.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., and Kobayashi, Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171, 4672-4679.
- Kusumoto, R., Masutani, C., Sugasawa, K., Iwai, S., Araki, M., Uchida, A., Mizukoshi, T., and Hanaoka, F. (2001). Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. *Mutat Res* 485, 219-227.

- Lagneaux, L., Gillet, N., Stamatopoulos, B., Delforge, A., Dejeneffe, M., Massy, M., Meuleman, N., Kentos, A., Martiat, P., Willems, L., *et al.* (2007). Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Experimental hematology* 35, 1527-1537.
- Lai, J.C., Cheng, Y.W., Goan, Y.G., Chang, J.T., Wu, T.C., Chen, C.Y., and Lee, H. (2008). Promoter methylation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase in lung cancer is regulated by p53. *DNA repair* 7, 1352-1363.
- Laird, P.W. (2005). Cancer epigenetics. *Human molecular genetics* 14 Spec No 1, R65-76.
- Lamarche, B.J., Orazio, N.I., and Weitzman, M.D. (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS letters* 584, 3682-3695.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenamee, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14, 44-55.
- Lande, M.B., Kim, M.S., Bartlett, C., and Guay-Woodford, L.M. (1993). Reversible Fanconi syndrome associated with valproate therapy. *The Journal of pediatrics* 123, 320-322.
- Lavon, I., Fuchs, D., Zrihan, D., Efroni, G., Zelikovitch, B., Fellig, Y., and Siegal, T. (2007). Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer research* 67, 8952-8959.
- Lawley, P.D., and Phillips, D.H. (1996). DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res* 355, 13-40.
- Lebreton, S., Carraz, G., Behriel, H., and Meunier, H. (1964). [Pharmacodynamic Properties of 2,2-Dipropylacetic Acid. Iii]. *Therapie* 19, 457-467.
- Lee, J.H., Choy, M.L., Ngo, L., Foster, S.S., and Marks, P.A. (2010). Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14639-14644.
- Lee, J.H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-554.
- Lee, J.S. (2007). Activation of ATM-dependent DNA damage signal pathway by a histone deacetylase inhibitor, trichostatin A. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 39, 125-130.
- Legha, S.S., Ring, S., Bedikian, A., Plager, C., Eton, O., Buzaid, A.C., and Papadopoulos, N. (1996). Treatment of metastatic melanoma with combined

- chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann Oncol* 7, 827-835.
- Legha, S.S., Ring, S., Eton, O., Bedikian, A., Buzaid, A.C., Plager, C., and Papadopoulos, N. (1998). Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 16, 1752-1759.
- Legha, S.S., Ring, S., Eton, O., Bedikian, A., Plager, C., and Papadopoulos, N. (1997). Development and results of biochemotherapy in metastatic melanoma: the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer J Sci Am* 3 *Suppl* 1, S9-15.
- Li, A.G., Piluso, L.G., Cai, X., Gadd, B.J., Ladurner, A.G., and Liu, X. (2007). An acetylation switch in p53 mediates holo-TFIID recruitment. *Mol Cell* 28, 408-421.
- Li, D., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2011). SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death Differ* 18, 1904-1913.
- Li, H., and Wu, X. (2004). Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 324, 860-867.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998a). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, L., Lu, X., Peterson, C.A., and Legerski, R.J. (1995). An interaction between the DNA repair factor XPA and replication protein A appears essential for nucleotide excision repair. *Mol Cell Biol* 15, 5396-5402.
- Li, R.Y., Calsou, P., Jones, C.J., and Salles, B. (1998b). Interactions of the transcription/DNA repair factor TFIIH and XP repair proteins with DNA lesions in a cell-free repair assay. *J Mol Biol* 281, 211-218.
- Li, Y., and McClay, E.F. (2002). Systemic chemotherapy for the treatment of metastatic melanoma. *Semin Oncol* 29, 413-426.
- Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A., Wittenberg, C., and Russell, P. (2007). Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol Cell* 28, 134-146.
- Lin, P.S., McPherson, L.A., Chen, A.Y., Sage, J., and Ford, J.M. (2009). The role of the retinoblastoma/E2F1 tumor suppressor pathway in the lesion recognition step of nucleotide excision repair. *DNA repair* 8, 795-802.

- Ljungman, M. (2010). The DNA damage response--repair or despair? *Environ Mol Mutagen* *51*, 879-889.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487-501.
- Lubbe, J., Reichel, M., Burg, G., and Kleihues, P. (1994). Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* *102*, 819-821.
- 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*, 1722-1726.
- Marchion, D.C., Bicaku, E., Daud, A.I., Sullivan, D.M., and Munster, P.N. (2005a). Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer research* *65*, 3815-3822.
- Marchion, D.C., Bicaku, E., Turner, J.G., Daud, A.I., Sullivan, D.M., and Munster, P.N. (2005b). Synergistic interaction between histone deacetylase and topoisomerase II inhibitors is mediated through topoisomerase IIbeta. *Clin Cancer Res* *11*, 8467-8475.
- Margison, G.P., Povey, A.C., Kaina, B., and Santibanez Koref, M.F. (2003). Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* *24*, 625-635.
- Markovic, S.N., Erickson, L.A., Rao, R.D., Weenig, R.H., Pockaj, B.A., Bardia, A., Vachon, C.M., Schild, S.E., McWilliams, R.R., Hand, J.L., *et al.* (2007a). Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* *82*, 364-380.
- Markovic, S.N., Erickson, L.A., Rao, R.D., Weenig, R.H., Pockaj, B.A., Bardia, A., Vachon, C.M., Schild, S.E., McWilliams, R.R., Hand, J.L., *et al.* (2007b). Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* *82*, 490-513.
- Marnett, L.J., and Burcham, P.C. (1993). Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem Res Toxicol* *6*, 771-785.
- Matsunaga, T., Mu, D., Park, C.H., Reardon, J.T., and Sancar, A. (1995). Human DNA repair excision nuclease. Analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies. *J Biol Chem* *270*, 20862-20869.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and

ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.

Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., *et al.* (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J* 21, 6820-6831.

McCabe, K.M., Hemphill, A., Akkari, Y., Jakobs, P.M., Pauw, D., Olson, S.B., Moses, R.E., and Grompe, M. (2008). ERCC1 is required for FANCD2 focus formation. *Molecular genetics and metabolism* 95, 66-73.

McElroy, S.L., Keck, P.E., Jr., Pope, H.G., Jr., and Hudson, J.I. (1989). Valproate in psychiatric disorders: literature review and clinical guidelines. *The Journal of clinical psychiatry* 50 Suppl, 23-29.

McHugh, P.J., Spanswick, V.J., and Hartley, J.A. (2001). Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol* 2, 483-490.

Meng, C.F., Su, B., and Li, W. (2011). DNA demethylation is superior to histone acetylation for reactivating cancer-associated genes in ovarian cancer cells. *Molecular medicine reports* 4, 1273-1278.

Mesdjian, E., Ciesielski, L., Valli, M., Bruguerolle, B., Jadot, G., Bouyard, P., and Mandel, P. (1982). Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 6, 223-233.

Meyer, L.J., and Zone, J.H. (1994). Genetics of cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 103, 112S-116S.

Michalak, E., Villunger, A., Erlacher, M., and Strasser, A. (2005). Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 786-798.

Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C., and Horikawa, I. (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 16, 4623-4635.

Middleton, M.R., Grob, J.J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., Gore, M., Aamdal, S., Cebon, J., Coates, A., *et al.* (2000). Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 18, 158-166.

Minko, I.G., Harbut, M.B., Kozekov, I.D., Kozekova, A., Jakobs, P.M., Olson, S.B., Moses, R.E., Harris, T.M., Rizzo, C.J., and Lloyd, R.S. (2008). Role for DNA polymerase kappa in the processing of N2-N2-guanine interstrand cross-links. *J Biol Chem* 283, 17075-17082.

- Minucci, S., and Pelicci, P.G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 38-51.
- Mirchandani, K.D., and D'Andrea, A.D. (2006). The Fanconi anemia/BRCA pathway: a coordinator of cross-link repair. *Exp Cell Res* 312, 2647-2653.
- Mirchandani, K.D., McCaffrey, R.M., and D'Andrea, A.D. (2008). The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly. *DNA repair* 7, 902-911.
- Miyake, K., Yoshizumi, T., Imura, S., Sugimoto, K., Batmunkh, E., Kanemura, H., Morine, Y., and Shimada, M. (2008). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. *Pancreas* 36, e1-9.
- Mojas, N., Lopes, M., and Jiricny, J. (2007). Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev* 21, 3342-3355.
- Montgomery, J.A., James, R., McCaleb, G.S., Kirk, M.C., and Johnston, T.P. (1975). Decomposition of N-(2-chloroethyl)-N-nitrosoureas in aqueous media. *J Med Chem* 18, 568-571.
- Moore, J.K., and Haber, J.E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 2164-2173.
- Moquin, D., and Chan, F.K. (2010). The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem Sci* 35, 434-441.
- Mornex, F., Thomas, L., Mohr, P., Hauschild, A., Delaunay, M.M., Lesimple, T., Tilgen, W., Bui, B.N., Guillot, B., Ulrich, J., *et al.* (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, 97-103.
- Mosedale, G., Niedzwiedz, W., Alpi, A., Perrina, F., Pereira-Leal, J.B., Johnson, M., Langevin, F., Pace, P., and Patel, K.J. (2005). The vertebrate Hef ortholog is a component of the Fanconi anemia tumor-suppressor pathway. *Nature structural & molecular biology* 12, 763-771.
- Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L.H., and Fousteri, M.I. (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell* 27, 311-323.
- Moser, J., Volker, M., Kool, H., Alekseev, S., Vrieling, H., Yasui, A., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H. (2005). The UV-damaged DNA binding protein mediates

efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA repair* 4, 571-582.

Mouawad, R., Sebert, M., Michels, J., Bloch, J., Spano, J.P., and Khayat, D. (2010). Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit Rev Oncol Hematol* 74, 27-39.

Mu, D., Wakasugi, M., Hsu, D.S., and Sancar, A. (1997). Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease. *J Biol Chem* 272, 28971-28979.

Muniandy, P.A., Liu, J., Majumdar, A., Liu, S.T., and Seidman, M.M. (2010). DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45, 23-49.

Muniandy, P.A., Thapa, D., Thazhathveetil, A.K., Liu, S.T., and Seidman, M.M. (2009). Repair of laser-localized DNA interstrand cross-links in G1 phase mammalian cells. *J Biol Chem* 284, 27908-27917.

Munshi, A., Kurland, J.F., Nishikawa, T., Tanaka, T., Hobbs, M.L., Tucker, S.L., Ismail, S., Stevens, C., and Meyn, R.E. (2005). Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin Cancer Res* 11, 4912-4922.

Munshi, A., Tanaka, T., Hobbs, M.L., Tucker, S.L., Richon, V.M., and Meyn, R.E. (2006). Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci. *Molecular cancer therapeutics* 5, 1967-1974.

Munster, P., Marchion, D., Bicaku, E., Lacevic, M., Kim, J., Centeno, B., Daud, A., Neuger, A., Minton, S., and Sullivan, D. (2009). Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC. *Clin Cancer Res* 15, 2488-2496.

Munster, P., Marchion, D., Bicaku, E., Schmitt, M., Lee, J.H., DeConti, R., Simon, G., Fishman, M., Minton, S., Garrett, C., *et al.* (2007). Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *J Clin Oncol* 25, 1979-1985.

Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (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, 817-827.

- Myrnes, B., Giercksky, K.E., and Krokan, H. (1983). Interindividual variation in the activity of O6-methyl guanine-DNA methyltransferase and uracil-DNA glycosylase in human organs. *Carcinogenesis* 4, 1565-1568.
- Myrnes, B., Norstrand, K., Giercksky, K.E., Sjunneskog, C., and Krokan, H. (1984). A simplified assay for O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity and its application to human neoplastic and non-neoplastic tissues. *Carcinogenesis* 5, 1061-1064.
- Nakatani, Y. (2001). Histone acetylases--versatile players. *Genes Cells* 6, 79-86.
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W.R., and Gloor, G.B. (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol Cell Biol* 14, 1613-1625.
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., *et al.* (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* 20, 966-976.
- Naumann, S.C., Roos, W.P., Jost, E., Belohlavek, C., Lennerz, V., Schmidt, C.W., Christmann, M., and Kaina, B. (2009). Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *British journal of cancer* 100, 322-333.
- Navaraj, A., Mori, T., and El-Deiry, W.S. (2005). Cooperation between BRCA1 and p53 in repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Cancer biology & therapy* 4, 1409-1414.
- Nawrocki, S.T., Carew, J.S., Pino, M.S., Highshaw, R.A., Andtbacka, R.H., Dunner, K., Jr., Pal, A., Bornmann, W.G., Chiao, P.J., Huang, P., *et al.* (2006). Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer research* 66, 3773-3781.
- Nelson, C.J., Santos-Rosa, H., and Kouzarides, T. (2006). Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* 126, 905-916.
- Newlands, E.S., Blackledge, G.R., Slack, J.A., Rustin, G.J., Smith, D.B., Stuart, N.S., Quarterman, C.P., Hoffman, R., Stevens, M.F., Brampton, M.H., *et al.* (1992). Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *British journal of cancer* 65, 287-291.
- 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, 35-61.

- Ng, J.M., Vermeulen, W., van der Horst, G.T., Bergink, S., Sugasawa, K., Vrieling, H., and Hoeijmakers, J.H. (2003). A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev* 17, 1630-1645.
- Nguyen, D.X., Baglia, L.A., Huang, S.M., Baker, C.M., and McCance, D.J. (2004). Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *Embo J* 23, 1609-1618.
- Nichols, A.F., Itoh, T., Graham, J.A., Liu, W., Yamaizumi, M., and Linn, S. (2000). Human damage-specific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation. *J Biol Chem* 275, 21422-21428.
- Nichols, A.F., Ong, P., and Linn, S. (1996). Mutations specific to the xeroderma pigmentosum group E Ddb- phenotype. *J Biol Chem* 271, 24317-24320.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E., and Marnett, L.J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 278, 31426-31433.
- Niedernhofer, L.J., Lalai, A.S., and Hoeijmakers, J.H. (2005). Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell* 123, 1191-1198.
- 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., *et al.* (2004). The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 24, 5776-5787.
- Niedzwiedz, W., Mosedale, G., Johnson, M., Ong, C.Y., Pace, P., and Patel, K.J. (2004). The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. *Mol Cell* 15, 607-620.
- Nijhawan, D., Honarpour, N., and Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 23, 73-87.
- Nishi, R., Alekseev, S., Dinant, C., Hoogstraten, D., Houtsmuller, A.B., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W., Hanaoka, F., and Sugasawa, K. (2009). UV-DDB-dependent regulation of nucleotide excision repair kinetics in living cells. *DNA repair* 8, 767-776.
- Nishimura, E.K., Granter, S.R., and Fisher, D.E. (2005). Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307, 720-724.

- Nowak, S.J., and Corces, V.G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20, 214-220.
- O'Donovan, A., Davies, A.A., Moggs, J.G., West, S.C., and Wood, R.D. (1994). XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature* 371, 432-435.
- 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 research* 60, 5815-5824.
- Ocker, M., and Schneider-Stock, R. (2007). Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1367-1374.
- Orr-Weaver, T.L., and Szostak, J.W. (1983). Multiple, tandem plasmid integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 3, 747-749.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., and Rothstein, R.J. (1983). Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Methods in enzymology* 101, 228-245.
- 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, 3728-3736.
- Ostling, O., and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 123, 291-298.
- Papi, A., Ferreri, A.M., Rocchi, P., Guerra, F., and Orlandi, M. (2010). Epigenetic modifiers as anticancer drugs: effectiveness of valproic acid in neural crest-derived tumor cells. *Anticancer research* 30, 535-540.
- 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, 541-548.
- 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. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307, 816-823.
- Patel, K.J., and Joenje, H. (2007). Fanconi anemia and DNA replication repair. *DNA repair* 6, 885-890.
- Paull, T.T., and Lee, J.H. (2005). The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* 4, 737-740.

- Pegg, A.E. (1990). Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer research* 50, 6119-6129.
- Pehamberger, H., Soyer, H.P., Steiner, A., Kofler, R., Binder, M., Mischer, P., Pachinger, W., Aubock, J., Fritsch, P., Kerl, H., *et al.* (1998). Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol* 16, 1425-1429.
- Peltonen, K., Kiviharju, T.M., Jarvinen, P.M., Ra, R., and Laiho, M. (2005). Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 18, 196-202.
- Peterson, E.J., Bogler, O., and Taylor, S.M. (2003). p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer research* 63, 6579-6582.
- Petrucelli, L.A., Dupere-Richer, D., Pettersson, F., Retrouvey, H., Skoulikas, S., and Miller, W.H., Jr. (2011). Vorinostat induces reactive oxygen species and DNA damage in acute myeloid leukemia cells. *PLoS One* 6, e20987.
- 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, 1178-1187.
- Pilatrino, C., Cilloni, D., Messa, E., Morotti, A., Giugliano, E., Pautasso, M., Familiari, U., Cappia, S., Pelicci, P.G., Lo Coco, F., *et al.* (2005). Increase in platelet count in older, poor-risk patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome treated with valproic acid and all-trans retinoic acid. *Cancer* 104, 101-109.
- Platz, A., Egyhazi, S., Ringborg, U., and Hansson, J. (2008). Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* 1, 395-405.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics* 33, 19-20.
- Preuss, I., Haas, S., Eichhorn, U., Eberhagen, I., Kaufmann, M., Beck, T., Eibl, R.H., Dall, P., Bauknecht, T., Hengstler, J., *et al.* (1996). Activity of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. *Cancer detection and prevention* 20, 130-136.

- Preusser, M., de Ribaupierre, S., Wohrer, A., Erridge, S.C., Hegi, M., Weller, M., and Stupp, R. (2011). Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol* 70, 9-21.
- Punnett, A., Tsang, R.W., and Hodgson, D.C. (2010). Hodgkin lymphoma across the age spectrum: epidemiology, therapy, and late effects. *Semin Radiat Oncol* 20, 30-44.
- Purrucker, J.C., Fricke, A., Ong, M.F., Rube, C., Rube, C.E., and Mahlknecht, U. (2010). HDAC inhibition radiosensitizes human normal tissue cells and reduces DNA Double-Strand Break repair capacity. *Oncology reports* 23, 263-269.
- Qian, X., von Wronski, M.A., and Brent, T.P. (1995). Localization of methylation sites in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter: correlation with gene suppression. *Carcinogenesis* 16, 1385-1390.
- Qian, X.C., and Brent, T.P. (1997). Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer research* 57, 3672-3677.
- Quiros, S., Roos, W.P., and Kaina, B. (2010). Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle* 9, 168-178.
- Quirt, I., Verma, S., Petrella, T., Bak, K., and Charette, M. (2007). Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: a systematic review. *Oncologist* 12, 1114-1123.
- Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.
- Raffoux, E., Chaibi, P., Dombret, H., and Degos, L. (2005). Valproic acid and all-trans retinoic acid for the treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 90, 986-988.
- Rahmani, M., Yu, C., Dai, Y., Reese, E., Ahmed, W., Dent, P., and Grant, S. (2003). Coadministration of the heat shock protein 90 antagonist 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin with suberoylanilide hydroxamic acid or sodium butyrate synergistically induces apoptosis in human leukemia cells. *Cancer research* 63, 8420-8427.
- Rapic-Otrin, V., McLenigan, M.P., Bisi, D.C., Gonzalez, M., and Levine, A.S. (2002). Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation. *Nucleic Acids Res* 30, 2588-2598.
- Reardon, J.T., Mu, D., and Sancar, A. (1996). Overproduction, purification, and characterization of the XPC subunit of the human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 271, 19451-19456.

- Reardon, J.T., Nichols, A.F., Keeney, S., Smith, C.A., Taylor, J.S., Linn, S., and Sancar, A. (1993). Comparative analysis of binding of human damaged DNA-binding protein (XPE) and Escherichia coli damage recognition protein (UvrA) to the major ultraviolet photoproducts: T[c,s]T, T[t,s]T, T[6-4]T, and T[Dewar]T. *J Biol Chem* 268, 21301-21308.
- Reed, D.J., May, H.E., Boose, R.B., Gregory, K.M., and Beilstein, M.A. (1975). 2-chloroethanol formation as evidence for a 2-chloroethyl alkylating intermediate during chemical degradation of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(trans-4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea. *Cancer research* 35, 568-576.
- Ren, D., Tu, H.C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* 330, 1390-1393.
- Rich, T., Allen, R.L., and Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783.
- Rikiishi, H., Shinohara, F., Sato, T., Sato, Y., Suzuki, M., and Echigo, S. (2007). Chemosensitization of oral squamous cell carcinoma cells to cisplatin by histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid. *International journal of oncology* 30, 1181-1188.
- Rikimaru, T., Taketomi, A., Yamashita, Y., Shirabe, K., Hamatsu, T., Shimada, M., and Maehara, Y. (2007). Clinical significance of histone deacetylase 1 expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 72, 69-74.
- Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L., and Wolffe, A.P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature genetics* 25, 338-342.
- Rocca, A., Minucci, S., Tosti, G., Croci, D., Contegno, F., Ballarini, M., Nole, F., Munzone, E., Salmaggi, A., Goldhirsch, A., *et al.* (2009). A phase I-II study of the histone deacetylase inhibitor valproic acid plus chemoimmunotherapy in patients with advanced melanoma. *British journal of cancer* 100, 28-36.
- Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179-3184.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.

- 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, 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, 186-197.
- Roos, W.P., Jost, E., Belohlavek, C., Nagel, G., Fritz, G., and Kaina, B. (2011). Intrinsic anticancer drug resistance of malignant melanoma cells is abrogated by IFN-beta and valproic acid. *Cancer research* 71, 4150-4160.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12, 440-450.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2012). DNA damage-induced apoptosis: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.*
- Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Naumann, S.C., Kiedron, O., Zdzienicka, M.Z., and Kaina, B. (2009a). 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* 8, 72-86.
- Roos, W.P., Tsaalbi-Shtylik, A., Tsaryk, R., Guvercin, F., de Wind, N., and Kaina, B. (2009b). The translesion polymerase Rev3L in the tolerance of alkylating anticancer drugs. *Mol Pharmacol* 76, 927-934.
- Rosato, R.R., Almenara, J.A., Maggio, S.C., Coe, S., Atadja, P., Dent, P., and Grant, S. (2008). Role of histone deacetylase inhibitor-induced reactive oxygen species and DNA damage in LAQ-824/fludarabine antileukemic interactions. *Molecular cancer therapeutics* 7, 3285-3297.
- Rothfuss, A., and Grompe, M. (2004). Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol* 24, 123-134.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., and Baylin, S.B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature genetics* 25, 269-277.
- Rozan, L.M., and El-Deiry, W.S. (2007). p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution. *Cell Death Differ* 14, 3-9.
- Ruefli, A.A., Ausserlechner, M.J., Bernhard, D., Sutton, V.R., Tainton, K.M., Kofler, R., Smyth, M.J., and Johnstone, R.W. (2001). The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10833-10838.

- Rusciani, L., Petraglia, S., Alotto, M., Calvieri, S., and Vezzoni, G. (1997). Postsurgical adjuvant therapy for melanoma. Evaluation of a 3-year randomized trial with recombinant interferon-alpha after 3 and 5 years of follow-up. *Cancer* 79, 2354-2360.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gorp, M., van Loo, G., and Vandenameele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.
- Salvesen, G.S., and Riedl, S.J. (2008). Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 615, 13-23.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509-514.
- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Schaeffer, L., Moncollin, V., Roy, R., Staub, A., Mezzina, M., Sarasin, A., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H., and Egly, J.M. (1994). The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Embo J* 13, 2388-2392.
- Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., Chambon, P., and Egly, J.M. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* 260, 58-63.
- Scharer, O.D. (2005). DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 6, 27-32.
- Schuchmann, M., Schulze-Bergkamen, H., Fleischer, B., Schattenberg, J.M., Siebler, J., Weinmann, A., Teufel, A., Worns, M., Fischer, T., Strand, S., *et al.* (2006). Histone deacetylase inhibition by valproic acid down-regulates c-FLIP/CASH and sensitizes hepatoma cells towards CD95- and TRAIL receptor-mediated apoptosis and chemotherapy. *Oncology reports* 15, 227-230.
- Schuster, R., Lindner, M., Wacker, F., Krossin, M., Bechrakis, N., Foerster, M.H., Thiel, E., Keilholz, U., and Schmittel, A. (2010). Transarterial chemoembolization of liver metastases from uveal melanoma after failure of systemic therapy: toxicity and outcome. *Melanoma Res* 20, 191-196.
- Searle, J., Kerr, J.F., and Bishop, C.J. (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 17 Pt 2, 229-259.
- Sengupta, S., and Harris, C.C. (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 44-55.

- Sewack, G.F., Ellis, T.W., and Hansen, U. (2001). Binding of TATA binding protein to a naturally positioned nucleosome is facilitated by histone acetylation. *Mol Cell Biol* 21, 1404-1415.
- Sha, K., and Winn, L.M. (2010). Characterization of valproic acid-initiated homologous recombination. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 89, 124-132.
- Shapiro, R., Dubelman, S., Feinberg, A.M., Crain, P.F., and McCloskey, J.A. (1977). Isolation and identification of cross-linked nucleosides from nitrous acid treated deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* 99, 302-303.
- Shen, W.T., Wong, T.S., Chung, W.Y., Wong, M.G., Kebebew, E., Duh, Q.Y., and Clark, O.H. (2005). Valproic acid inhibits growth, induces apoptosis, and modulates apoptosis-regulatory and differentiation gene expression in human thyroid cancer cells. *Surgery* 138, 979-984; discussion 984-975.
- Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75, 243-269.
- Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- Shimizu, S., Shinohara, Y., and Tsujimoto, Y. (2000). Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19, 4309-4318.
- Shiyonov, P., Nag, A., and Raychaudhuri, P. (1999). Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. *J Biol Chem* 274, 35309-35312.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18, 134-147.
- Shuff, J.H., Siker, M.L., Daly, M.D., and Schultz, C.J. (2010). Role of radiation therapy in cutaneous melanoma. *Clin Plast Surg* 37, 147-160.
- Siegel, R., Hauschild, A., Kettelhack, C., Kahler, K.C., Bembenek, A., and Schlag, P.M. (2007). Hepatic arterial Fotemustine chemotherapy in patients with liver metastases from cutaneous melanoma is as effective as in ocular melanoma. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 33, 627-632.
- Sijbers, A.M., de Laat, W.L., Ariza, R.R., Biggerstaff, M., Wei, Y.F., Moggs, J.G., Carter, K.C., Shell, B.K., Evans, E., de Jong, M.C., *et al.* (1996). Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* 86, 811-822.

- Sims, R.J., 3rd, Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 19, 629-639.
- Skalicky, S.E., Holt, P.E., Giblin, M., Taylor, S., and Conway, R.M. (2008). Australian Cancer Network clinical practice guidelines for the management of ocular and periocular melanoma: an evidence-based literature analysis. *Clin Experiment Ophthalmol* 36, 646-658.
- Smith, K.J., Skelton, H.G., Heimer, W., Baxter, D., Angritt, P., Frisman, D., and Wagner, K.F. (1993). Melanocytic activation in HIV-1 disease: HMB-45 staining in common acquired nevi. Military Medical Consortium for the Advancement of Retroviral Research. *J Am Acad Dermatol* 29, 539-544.
- Smith, L.A., Cornelius, V.R., Azorin, J.M., Perugi, G., Vieta, E., Young, A.H., and Bowden, C.L. (2010). Valproate for the treatment of acute bipolar depression: systematic review and meta-analysis. *Journal of affective disorders* 122, 1-9.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., O'Connor, P.M., and Fornace, A.J., Jr. (1995). Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* 10, 1053-1059.
- Sobeck, A., Stone, S., Costanzo, V., de Graaf, B., Reuter, T., de Winter, J., Wallisch, M., Akkari, Y., Olson, S., Wang, W., *et al.* (2006). Fanconi anemia proteins are required to prevent accumulation of replication-associated DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 26, 425-437.
- Soengas, M.S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., *et al.* (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-211.
- Somasundaram, K. (2003). Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair--perhaps through transcription. *Journal of cellular biochemistry* 88, 1084-1091.
- Song, B., and Sung, P. (2000). Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem* 275, 15895-15904.
- Sonnemann, J., Gange, J., Kumar, K.S., Muller, C., Bader, P., and Beck, J.F. (2005). Histone deacetylase inhibitors interact synergistically with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to induce apoptosis in carcinoma cell lines. *Investigational new drugs* 23, 99-109.
- Soriano, A.O., Yang, H., Faderl, S., Estrov, Z., Giles, F., Ravandi, F., Cortes, J., Wierda, W.G., Ouzounian, S., Quezada, A., *et al.* (2007). Safety and clinical activity

of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 110, 2302-2308.

Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and de Villartay, J.P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26, 7780-7791.

Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., and Kramer, O.H. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 185-198.

Sparrow, L.E., Soong, R., Dawkins, H.J., Iacopetta, B.J., and Heenan, P.J. (1995). p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 5, 93-100.

Squatrito, M., Gorrini, C., and Amati, B. (2006). Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol* 16, 433-442.

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, 949-957.

Srivenugopal, K.S., Shou, J., Mullanpudi, S.R., Lang, F.F., Jr., Rao, J.S., and Ali-Osman, F. (2001). Enforced expression of wild-type p53 curtails the transcription of the O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene in human tumor cells and enhances their sensitivity to alkylating agents. *Clin Cancer Res* 7, 1398-1409.

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, 1328-1334.

Staresincic, L., Fagbemi, A.F., Enzlin, J.H., Gourdin, A.M., Wijgers, N., Dunand-Sauthier, I., Giglia-Mari, G., Clarkson, S.G., Vermeulen, W., and Scharer, O.D. (2009). Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *Embo J* 28, 1111-1120.

Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (1998). Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387, 17-31.

Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.

Stimson, L., and La Thangue, N.B. (2009). Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 280, 177-183.

- Strathern, J.N., Klar, A.J., Hicks, J.B., Abraham, J.A., Ivy, J.M., Nasmyth, K.A., and McGill, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell* 31, 183-192.
- Straume, O., and Akslen, L.A. (1997). Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 74, 535-539.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2, 223-232.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Maekawa, T., Uchida, A., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Rademakers, S., Visser, C., Aboussekhra, A., *et al.* (1997). Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. *Mol Cell Biol* 17, 6924-6931.
- Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2001). A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* 15, 507-521.
- Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., and Hanaoka, F. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121, 387-400.
- Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2002). A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA repair* 1, 95-107.
- Sugawara, N., Wang, X., and Haber, J.E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol Cell* 12, 209-219.
- Sun, N.K., Sun, C.L., Lin, C.H., Pai, L.M., and Chao, C.C. (2010). Damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) protects against UV irradiation in human cells and *Drosophila*. *Journal of biomedical science* 17, 27.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13182-13187.
- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., and McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 24, 841-851.

- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25-35.
- Takimoto, R., MacLachlan, T.K., Dicker, D.T., Niitsu, Y., Mori, T., and el-Deiry, W.S. (2002). BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation. *Cancer biology & therapy* 1, 177-186.
- Tang, J.Y., Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., and Chu, G. (2000). Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Mol Cell* 5, 737-744.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24, 827-839.
- Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., and Gu, W. (2008). Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 133, 612-626.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2002). S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100, 2414-2420.
- Tellez, C.S., Shen, L., Estecio, M.R., Jelinek, J., Gershenwald, J.E., and Issa, J.P. (2009). CpG island methylation profiling in human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 19, 146-155.
- Thoma, B.S., Wakasugi, M., Christensen, J., Reddy, M.C., and Vasquez, K.M. (2005). Human XPC-hHR23B interacts with XPA-RPA in the recognition of triplex-directed psoralen DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res* 33, 2993-3001.
- Thomas, C.B., Osieka, R., and Kohn, K.W. (1978). DNA cross-linking by in vivo treatment with 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea of sensitive and resistant human colon carcinoma xenografts in nude mice. *Cancer research* 38, 2448-2454.
- Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6, 909-923.
- 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 research* 42, 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, 1591-1597.
- Tornaletti, S., and Hanawalt, P.C. (1999). Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* 81, 139-146.

- Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., *et al.* (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3041-3046.
- Tsao, H., Atkins, M.B., and Sober, A.J. (2004). Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* *351*, 998-1012.
- Turner, B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* *22*, 836-845.
- Turner, B.M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* *111*, 285-291.
- Urnov, F.D., and Wolffe, A.P. (2001). Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance). *Oncogene* *20*, 2991-3006.
- Vairo, G., Soos, T.J., Upton, T.M., Zalvide, J., DeCaprio, J.A., Ewen, M.E., Koff, A., and Adams, J.M. (2000). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol* *20*, 4745-4753.
- Valentini, A., Gravina, P., Federici, G., and Bernardini, S. (2007). Valproic acid induces apoptosis, p16INK4A upregulation and sensitization to chemotherapy in human melanoma cells. *Cancer biology & therapy* *6*, 185-191.
- van den Boom, V., Citterio, E., Hoogstraten, D., Zotter, A., Egly, J.M., van Cappellen, W.A., Hoeijmakers, J.H., Houtsmuller, A.B., and Vermeulen, W. (2004). DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *The Journal of cell biology* *166*, 27-36.
- van Hoffen, A., Natarajan, A.T., Mayne, L.V., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H., and Venema, J. (1993). Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucleic Acids Res* *21*, 5890-5895.
- Van Nifterik, K.A., Van den Berg, J., Slotman, B.J., Lafleur, M.V., Sminia, P., and Stalpers, L.J. (2011). Valproic acid sensitizes human glioma cells for temozolomide and gamma-radiation. *J Neurooncol.*
- VanDongen, A.M., VanErp, M.G., and Voskuyl, R.A. (1986). Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance. *Epilepsia* *27*, 177-182.
- Veierod, M.B., Weiderpass, E., Thorn, M., Hansson, J., Lund, E., Armstrong, B., and Adami, H.O. (2003). A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. *J Natl Cancer Inst* *95*, 1530-1538.
- Venema, J., Mullenders, L.H., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A., and Mayne, L.V. (1990). The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 4707-4711.

- Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H.G. (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 19, 286-293.
- 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, 39-51.
- Voelter, V., Schalenbourg, A., Pampallona, S., Peters, S., Halkic, N., Denys, A., Goitein, G., Zografos, L., and Leyvraz, S. (2008). Adjuvant intra-arterial hepatic fotemustine for high-risk uveal melanoma patients. *Melanoma Res* 18, 220-224.
- Volker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* 8, 213-224.
- von Wronski, M.A., and Brent, T.P. (1994). Effect of 5-azacytidine on expression of the human DNA repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Carcinogenesis* 15, 577-582.
- Vos, J.M., and Hanawalt, P.C. (1987). Processing of psoralen adducts in an active human gene: repair and replication of DNA containing monoadducts and interstrand cross-links. *Cell* 50, 789-799.
- Voso, M.T., Santini, V., Finelli, C., Musto, P., Pogliani, E., Angelucci, E., Fioritoni, G., Alimena, G., Maurillo, L., Cortelezzi, A., *et al.* (2009). Valproic acid at therapeutic plasma levels may increase 5-azacytidine efficacy in higher risk myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* 15, 5002-5007.
- Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 275-283.
- Wakasugi, M., Reardon, J.T., and Sancar, A. (1997). The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 272, 16030-16034.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., *et al.* (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855-867.
- Wang, G.G., Allis, C.D., and Chi, P. (2007a). Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med* 13, 363-372.
- Wang, G.G., Allis, C.D., and Chi, P. (2007b). Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med* 13, 373-380.

- Wang, Q.E., Zhu, Q., Wani, G., El-Mahdy, M.A., Li, J., and Wani, A.A. (2005). DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation. *Nucleic Acids Res* 33, 4023-4034.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- Watanabe, T., Yoshikawa, H., Yamazaki, S., Abe, Y., and Abe, T. (2005). Secondary renal Fanconi syndrome caused by valproate therapy. *Pediatric nephrology* 20, 814-817.
- Watt, A.J., Kotsis, S.V., and Chung, K.C. (2004). Risk of melanoma arising in large congenital melanocytic nevi: a systematic review. *Plast Reconstr Surg* 113, 1968-1974.
- Weeda, G., van Ham, R.C., Vermeulen, W., Bootsma, D., van der Eb, A.J., and Hoeijmakers, J.H. (1990). A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell* 62, 777-791.
- 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, 727-730.
- Weichert, W., Roske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Ebert, M.P., Pross, M., Dietel, M., Denkert, C., and Rocken, C. (2008a). Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 9, 139-148.
- Weichert, W., Roske, A., Niesporek, S., Noske, A., Buckendahl, A.C., Dietel, M., Gekeler, V., Boehm, M., Beckers, T., and Denkert, C. (2008b). Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 14, 1669-1677.
- Weinert, T.A., and Hartwell, L.H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241, 317-322.
- Weiss, J., Heine, M., Arden, K.C., Korner, B., Pilch, H., Herbst, R.A., and Jung, E.G. (1995). Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas. *Recent Results Cancer Res* 139, 137-154.
- Weiss, J., Schwechheimer, K., Cavenee, W.K., Herlyn, M., and Arden, K.C. (1993). Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines. *Int J Cancer* 54, 693-699.

- Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C.J., and Marais, R. (2004). V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer research* 64, 2338-2342.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.
- Wilson, A.J., Byun, D.S., Popova, N., Murray, L.B., L'Italien, K., Sowa, Y., Arango, D., Velcich, A., Augenlicht, L.H., and Mariadason, J.M. (2006). Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 281, 13548-13558.
- Wilson, T.E., Grawunder, U., and Lieber, M.R. (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 388, 495-498.
- Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., and Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 277, 8-21.
- Wittschieben, B.O., Iwai, S., and Wood, R.D. (2005). DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *J Biol Chem* 280, 39982-39989.
- Wood, R.D. (2010). Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. *Environ Mol Mutagen* 51, 520-526.
- Wu, Q., Christensen, L.A., Legerski, R.J., and Vasquez, K.M. (2005). Mismatch repair participates in error-free processing of DNA interstrand crosslinks in human cells. *EMBO reports* 6, 551-557.
- Wu, Y.H., Tsai Chang, J.H., Cheng, Y.W., Wu, T.C., Chen, C.Y., and Lee, H. (2007). Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53 mutation in lung cancers. *Oncogene* 26, 4761-4773.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- 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, 823-830.

- Xu, W.S., Parmigiani, R.B., and Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26, 5541-5552.
- Yamaguchi, H., Woods, N.T., Piluso, L.G., Lee, H.H., Chen, J., Bhalla, K.N., Monteiro, A., Liu, X., Hung, M.C., and Wang, H.G. (2009). p53 acetylation is crucial for its transcription-independent proapoptotic functions. *J Biol Chem* 284, 11171-11183.
- Yang, X.J. (2004). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* 32, 959-976.
- Yang, X.J., and Gregoire, S. (2005). Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* 25, 2873-2884.
- Yang, X.J., and Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 206-218.
- Yang, Y.L., and Li, X.M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 10, 169-177.
- Yazdi, A.S., Palmedo, G., Flaig, M.J., Puchta, U., Reckwerth, A., Rutten, A., Mentzel, T., Hugel, H., Hantschke, M., Schmid-Wendtner, M.H., *et al.* (2003). Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 121, 1160-1162.
- Yee, K.S., and Vousden, K.H. (2005). Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* 26, 1317-1322.
- Yokoi, M., Masutani, C., Maekawa, T., Sugasawa, K., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. (2000). The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. *J Biol Chem* 275, 9870-9875.
- Yoshikawa, H., Watanabe, T., and Abe, T. (2002). Fanconi syndrome caused by sodium valproate: report of three severely disabled children. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society* 6, 165-167.
- You, A., Tong, J.K., Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2001). CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1454-1458.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Zaidi, M.R., Day, C.P., and Merlino, G. (2008). From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol* 128, 2381-2391.

- Zak, P., Kleibl, K., and Laval, F. (1994). Repair of O6-methylguanine and O4-methylthymine by the human and rat O6-methylguanine-DNA methyltransferases. *J Biol Chem* 269, 730-733.
- Zhang, K., and Dent, S.Y. (2005). Histone modifying enzymes and cancer: going beyond histones. *Journal of cellular biochemistry* 96, 1137-1148.
- Zhang, X.D., Gillespie, S.K., Borrow, J.M., and Hersey, P. (2003a). The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate: a potential sensitizer of melanoma to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis. *Biochemical pharmacology* 66, 1537-1545.
- Zhang, X.D., Gillespie, S.K., Borrow, J.M., and Hersey, P. (2004a). The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. *Molecular cancer therapeutics* 3, 425-435.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., and Matthias, P. (2003b). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J* 22, 1168-1179.
- Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hara, Y., Kobayashi, S., and Iwase, H. (2005). Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. *Breast Cancer Res Treat* 94, 11-16.
- Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S., and Iwase, H. (2004b). HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 6962-6968.
- Zhao, H., and Piwnicka-Worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 21, 4129-4139.
- 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, 754-761.
- Zhu, G., and Lippard, S.J. (2009). Photoaffinity labeling reveals nuclear proteins that uniquely recognize cisplatin-DNA interstrand cross-links. *Biochemistry* 48, 4916-4925.
- Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K.P., and Gottlicher, M. (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 5, 455-463.
- Ziauddin, M.F., Yeow, W.S., Maxhimer, J.B., Baras, A., Chua, A., Reddy, R.M., Tsai, W., Cole, G.W., Jr., Schrupp, D.S., and Nguyen, D.M. (2006). Valproic acid, an antiepileptic drug with histone deacetylase inhibitory activity, potentiates the

cytotoxic effect of Apo2L/TRAIL on cultured thoracic cancer cells through mitochondria-dependent caspase activation. *Neoplasia* 8, 446-457.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.

Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Walker, G.J., Hayward, N., and Dracopoli, N.C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature genetics* 12, 97-99.

8 Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-Aminoallyl-17-Demethoxygeldanamycin
A	Adenin
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
ACNU	Nimustin/ 3-[(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-Nitrosoureahydrochlorid
ACTB	Actin beta
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AKT	<i>a-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
alk.	Alkalisch
APAF1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
APEX1	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARHGDI2A	<i>Rho GDP dissociation inhibitor alpha</i>
AS	Aminosäure(n)
ASIP	<i>Agouti signaling protein</i>
AT	Ataxia telangiectasia
ATG3	<i>Autophagy-related 3 (yeast)</i>
ATG7	<i>Autophagy-related 3 (yeast)</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>AT- und Rad3-related</i>
ATRA	all-trans-Retinsäure (<i>All-trans-retinoic acid</i>)
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
BAD	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
BAK	<i>Bcl2-antagonist/killer</i>
BAX	<i>Breakpoint cluster-2-associated x protein</i>
BCL-2	<i>B-Cell CLL/lymphoma 2</i>
Bcl-X _L	<i>BCL2-like 1, lange Isoform</i>
BCNU	Carmustin/1,3-bis(2-chloroethyl)-1-Nitrosourea
Becn1	Beclin1
BER	Basenexzisionsreparatur
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIRC3	<i>baculoviral IAP repeat containing 3</i>

Abkürzungsverzeichnis

BRAF	<i>v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BRCA1/2	<i>Breast cancer 1/2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CASP2	Caspase 2
Caspase	<i>Cysteine-aspartic acid proteases</i>
CBP/p300	<i>CREB binding protein/p300</i>
CCNA1	Cyclin A1
CCNB1	CylinB1
CCNE1	CylinE1
CCNU	Lomustin/1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-Nitrosourea
CDC25A	<i>Cell division cycle 25 homolog A</i>
CDC25B	<i>Cell division cycle 25 homolog B</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CDKN1A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A = p21</i>
CDKN1B	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1B = p27 (KIP1)</i>
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A = p16 (INK4A)</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CHEK1/2	<i>Cell cycle checkpoint kinase 1/2</i>
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
c-Myc	<i>v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CNU	ChlorethylNitrosoharnstoff (<i>2-ChlorethylNitrosoureas</i>)
CoREST	<i>RE1-silencing transcripton factor corepressor</i>
CpG	über Phosphodiesterbindung verknüpftes Cytosin und Guanin
CS	Cockayne-Syndrom
Ct	Cycle threshold
CTBP	C-terminal binding protein
CTCL	Cutaneous T-cell lymphoma
CtiP	<i>CTBP (C-terminal binding protein) interactin protein</i>
CXCR4	Chemokin (C-X-C motif) Rezeptor 4
CYP1A1	Cytochrom P450 1A1

Abkürzungsverzeichnis

CYP1B1	Cytochrom P450 1B1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DDB1	<i>DNA-damage binding protein 1</i>
DDB2	<i>DNA-damage binding protein 2, XPE</i>
DDIT3	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>
DED	Todeseffektordomäne (<i>Death effector domain</i>)
DISC	<i>Death inducing signalling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PK _{cs}	<i>DNA dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB(s)	DNA-Doppelstrangbru(ü)ch(e)
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTIC	Dacarbazin/(5E)-5-dimethylaminohydrazinylidene)imidazole-4-carboxamid
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
eNOS	<i>epithelial nitric oxide synthase</i>
ERCCC1	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
<i>et al.</i>	<i>et alter</i> (und andere)
FADD	<i>FAS-associated death domain protein</i>
FANCD1	Fanconi-Protein
<i>FANCA</i>	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe A
<i>FANCB</i>	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe B
<i>FANCC</i>	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe C
<i>FANCD1</i>	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe D1 = BRCA2

Abkürzungsverzeichnis

FANCD2	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe D2
FANCE	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe E
FANCF	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe F
FANCG	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe G
FANCL	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe L
FANCM	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe M
FAS	FAS Rezeptor (<i>TNF receptor superfamily member 6</i>)
FASLG	FAS Ligand (<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6</i>)
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Behördliche Lebensmittel-überwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika (<i>Food and drug administration</i>)
FM	Fotemustin (Muphoran)/ 1-(2-chloroethyl)-3-(1-diethoxyphosphorylethyl)-1-nitrosourea
FEN1	<i>Flap structure specific endonuclease 1</i>
FITC	Flouresceinisothiocyant
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
G	Guanin
γH2AX	Gamma H2AX (Phosphoryliertes H2AX)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (<i>γ-Aminobutyric acid</i>)
GADD45A	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible alpha</i>
GAP	<i>GTPase accelerating protein</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GG-NER	Global genome NER
GNATs	<i>Gcn5-related N-acetyl transferases</i>
GPX1	Glutathion-Peroxidase 1
GSTM1	Glutathion S-Transferase mu 1
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP-spaltende Hydrolase
h	Stunde(n)
H2AX	Histon H2AX
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

Abkürzungsverzeichnis

HAT	Histon-Acetyltransferase
HDA1	<i>Histone deacetylase 1</i>
HDAC	Histon-Desacetylase
HDACi	Histon-Desacetylase-Inhibitor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HIF1A1	<i>Hypoxia-inducible factor-1α</i>
HMOX1	Hämoxygenase 1
HMT	Histon-Methyltransferase
HR	Homologe Rekombination
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HSP90	<i>Heatshock protein 90</i>
HSPA1B	<i>Heatshock protein 1B</i>
HSP90AA1	<i>Heatshock protein 90AA1</i>
HUS1	HUS1 <i>checkpoint</i> Homolog
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
IFN- β	Interferon- β
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IR	Ionisierende Strahlung (<i>Ionizing radiation</i>)
ITGB1	Integrin beta1
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KDAC	Lysin-Desacetylase
<i>KIT</i>	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
KU70 (XRCC6)	<i>X-ray repair cross complementing protein 6</i>
KU80 (XRCC5)	<i>X-ray repair cross complementing protein 5</i>
l	Liter
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LB-Medium	Luria-Broth –Medium
LIG 1/3/4	Ligase 1/3/4
Lsg.	Lösung
LMP	<i>Low melting point</i>
μ	mikro

Abkürzungsverzeichnis

m	milli
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMC	Mitomycin C
MMP3/7/13	Matrixmetallopeptidase 3/7/13
MMR	<i>Mismatch-Reparatur</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilisation</i>
MP	Milchpulver
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
MRE11	<i>Meiotic recombination 11 homolog 1</i>
MSH2	MutS Homolog 2
mt	mutiert
MYST	MOZ/YBF2/SAS2/TIP60
n	nano
N3-MeA	N3-Methyladenin
N7-MeG	N7-Methylguanin
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid oxidiert/reduziert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat reduziert
NBN	Nibrin, alias NBS-1
NCOR	<i>Nuclear receptor corepressor</i>
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
ng	Nanogramm
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (<i>Nonhomologous end joining</i>)
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

Abkürzungsverzeichnis

NO	Stickstoffmonoxid
NOS2/3	NO-Synthase 2/3
NOX1	NADPH Oxidase 1
NOXA	Latein für "Schaden"
NURF	<i>Nucleosome remodeling factor</i>
O ⁶ BG	O ⁶ -Benzylguanin
O ⁶ ClEtG	O ⁶ -Chlorethylguanin
O ⁶ MeG	O ⁶ -Methylguanin
O ⁴ MeT	O ⁴ -Methylthymidin
OD	Optische Dichte
p-	Phospho- [stellvertretend für eine Phosphatgruppe (PO ₃ ⁻)]
p53	Tumor Protein 53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PCZ	Procarbazin, 4-[(2-methylhydrazinyl)methyl]-N-propan-2-ylbenzamide
PEG	Polyethylenglykol
pH	Wasserstoffexponent (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumiodid
PIC	<i>Proteinase inhibitor cocktail</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POL	DNA-Polymerase
POLD1	DNA-Polymerase delta1
POLE	DNA-Polymerase epsilon
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
puro	Puromycin
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RAD50	Rad50 Homolog
RAD51	Rad51 Homolog

Abkürzungsverzeichnis

RAS	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RB	Retinoblastom-Protein
REV1	REV1 Homolog
REV3L	<i>REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta</i>
RHOA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RHOB	<i>Ras homolog gene family, member B</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RNAPII	RNA-Polymerase II
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPA	<i>Replication protein A</i>
RT	Raumtemperatur (20° - 25°C)
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamsäure (<i>Suberoylanilide Hydroxamic Acid, Vorinostat</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCE	Schwesterchromatidenaustausch (<i>Sister chromatid exchange</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfate</i>)
SELE	E-Selektin
Ser	Serin
shp53	D05-Zellen mit stabilem p53 <i>Knockdown</i> (shRNA)
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
shXPC	A375-Zellen mit stabilem XPC <i>Knockdown</i> (shRNA)
Sir2	<i>Silent information regulator 2</i>
SIRT	Sirtuin, <i>Sir "tu"-like protein</i>
Sirtuin	<i>Sir "tu"-like protein</i>
smac/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/ Direct IAP-binding protein with low pI</i>
SMC5	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 5</i>
SMC6	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 6</i>
SOD1	Superoxid-Dimutase 1
t	Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle

Abkürzungsverzeichnis

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
tBID	<i>truncated BID</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBST	TBS mit 0,1% (v/v) Tween
TC-NER	<i>Transcription coupled NER</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor 2H
Thr	Threonin
TIAM1	<i>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</i>
TIMP2	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 2</i>
TLS	Translasiions-Synthese
T _m	Schmelztemperatur
TM	<i>Tail Moment</i>
TMZ	Temozolomid
TNF	Tumornekrose-Faktor
TNFR	Tumornekrose-Faktor-Rezeptor
TNM-System	Tumor-Nodulae-Metastasen-System
TOP2A	Topoisomerase 2A
TOP2B	Topoisomerase 2B
TP53	Tumor Protein 53
TP63	Tumor Protein 63
TP73	Tumor Protein 73
TREX1	<i>Three prime repair exonuclease 1</i>
Tris	Tris[Hydroxymethyl]-Aminomethan
Tween 20	Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat/Polysorbat 20
TXNRD1	Thioredoxin-Reduktase 1
Tyr	Tyrosin
TYR	Tyrosinase
TYRP1	<i>Tyrosinase related protein 1</i>
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
u. a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Valin
V	Volt

Abkürzungsverzeichnis

VCAM1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
vgl.	vergleiche
VPA	Valproinsäure (<i>Valproic acid</i>)
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
WEE1	Wee1 Homolog
WRN	Werner-Syndrom ATP-abhängige Helikase
WRNIP	<i>Werner helicase interacting protein 1</i>
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
x	-mal/-fach
XIAP	<i>X-linked IAP</i>
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA	Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe A
XPB	Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe B
XPC	Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe C
XPE	Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe E
XPF	Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe F
XPG	Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe G
XRCC1	<i>XRCC1 X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
XRCC3	<i>XRCC1 X-ray repair cross-complementing protein 3</i>
XRCC4	<i>XRCC1 X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
z. B.	zum Beispiel

9 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Vereinfachtes Modell zur Prozessierung von O⁶MeG, welche – je nach physiologischem Kontext – zu verschiedenen Endpunkten führt. **15**
- Abb. 2:** Vereinfachtes Modell zur Prozessierung von O⁶CIeTG, welches - wird es nicht durch MGMT - repariert, DNA-Interstrang-Crosslinks (ICL) führt. **17**
- Abb. 3:** Schematisches Modell zur Entstehung eines offenen DSB an einer blockierten Replikationsgabel. **27**
- Abb. 4:** Schematisches Modell zur Entstehung der zweiten Inzision durch ERCC1-XPF, Entkopplung des ICL und Translesionssynthese (TLS, oranger Pfeil). **28**
- Abb 5:** Schematisches Modell des so genannten zweiten Reparaturzyklus. **28**
- Abb. 6:** Zusammenspiel von DNA-Methylierung, kovalenten Histon-Modifikationen und Chromatin-Remodeling bei der epigenetischen Regulation der Genexpression. **32**
- Abb. 7:** Untersuchung der Apoptose-Induktion und p53-Aktivierung nach FM-Behandlung (32 µM) in menschlichen malignen Melanom-Zelllinien. **80**
- Abb. 8:** Untersuchung des Einflusses von p53 auf maligne Melanom-Zelllinien bezüglich ihrer Resistenz gegenüber FM, ICL-Reparaturkapazität und DNA-Schadensantwort. **81**
- Abb. 9:** Analyse der Expression der DNA-Reparatur-Gene BRCA1, DDB2, ERCC1, XPA, XPB, XPC, XPF und XPG in D05 (p53wt) und D14 (p53mt) Melanom-Zelllinien mit und ohne FM-Behandlung. **84**
- Abb. 10:** Untersuchung der p53-Abhängigkeit der DDB2- und XPC-Induktion nach FM-Behandlung. **85**
- Abb. 11:** Charakterisierung der A375 empty- und XPC shRNA-Klone. **87**
- Abb. 12:** Untersuchung der Apoptose-Induktion in A375 empty- und XPCshRNA-Zellen nach Behandlung mit FM (32, 80, 128 µM). **88**
- Abb. 13:** Untersuchung der Persistenz der durch FM ausgelösten Aktivierung von p53 und Induktion von XPC, DDB2 und p21. **89**
- Abb. 14:** Untersuchung der FM-induzierten DNA-Schadensantwort in vivo mithilfe eines A375 (p53wt) Xenograft-Modells. **89**
- Abb. 15:** Übersicht über den Experiment-Aufbau. **91**
- Abb. 16:** Untersuchung des Einflusses von VPA auf p53. **91**
- Abb. 17:** Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Zelltod-Induktion in D05-Zellen nach TMZ- und FM-Behandlung. **93**
- Abb. 18:** Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Zelltod-Induktion in D14-Zellen nach TMZ- und FM-Behandlung. **94**
- Abb. 19:** Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Apoptose- und Nekrose-Induktion in D05-Zellen nach TMZ- und FM-Behandlung. **96**
- Abb. 20:** Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Apoptose- und Nekrose-Induktion in D14-Zellen nach TMZ- und FM-Behandlung. **97**

- Abb. 21:** Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Apoptose-Induktion durch TMZ (50 μ M) und FM (32 μ M) in A375 (p53wt)- und RPMI-7951 (p53mt)-Melanomzellen mit und ohne MGMT-Depletion durch O⁶BG. **99**
- Abb. 22:** Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Proliferation von malignen Melanom-Zelllinien. **100**
- Abb. 23:** Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Zellzyklusverteilung maligner Melanom-Zelllinien. **101**
- Abb. 24:** Untersuchung der Rolle des extrinsischen Apoptosesignalwegs bei der Sensitivierung gegenüber TMZ (50 μ M) und FM (32 μ M). **102**
- Abb. 25:** Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Genexpression in D05-Zellen mit und ohne Alkylanzien-Behandlung. **103**
- Abb. 26:** Apoptose-Raten der p53wt Zellen A375, G361, Malme-3M und D05 sowie der p53mt Zellen D14, RPMI-7951 und MeWo 144 h nach FM-Behandlung (32 μ M). **105**
- Abb. 27:** Modell zur Resistenz von p53wt Melanomzellen gegenüber dem Alkylanz Fotemustin. **111**
- Abb. 28:** Überblick über bereits untersuchte oder mögliche durch VPA beeinflusste Parameter.
- Abb. 29:** Überblick über die Effekte von VPA auf die DNA-Reparatur und Apoptose. **121**

10 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Stadieneinteilung des malignen Melanoms und 10-Jahres-Überlebensraten (10-JÜR). **5**
- Tab. 2:** Zielproteine von HDACs und HATs und biologische Bedeutung ihrer Acetylierung. **33**
- Tab. 3:** Während der Apoptose freigesetzte mitochondriale Proteine und ihre Funktionen. **40**
- Tab. 4:** Effekt von VPA auf die Sensitivität der Zelllinien D05, D14, A375 und RPMI-7951 auf die Sensitivität gegenüber TMZ und FM. **115**
- Tab. 5:** Verdopplungszeiten (h) der Zelllinien D05, D14, A375 und RPMI-7951 mit und ohne VPA-Vorbehandlung. **117**

11 Anhang

11.1 Veröffentlichungen

Naumann SC, Roos WP, Jost E, **Belohlavek C**, Lennerz V, Schmidt CW *et al* (2009). Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSB, and p53. *British Journal of Cancer* **100**: 322-333.

Belohlavek C, Roos WP, Jost E, Nagel G, Fritz G, Kaina B (2011). Intrinsic anticancer drug resistance of malignant melanoma cells is abrogated by IFN- β and valproic acid. *Cancer Research* **71**: 4150-4160.

Barckhausen C, Roos WP, Naumann SC, Kaina B. (2012) Acquired resistance of melanoma cells to anticancer drugs by p53-triggered up-regulation of DDB2/XPC mediated DNA repair. *Zur Publikation eingereicht*.

11.2 Kongressteilnahmen

11.2.1 Passive Teilnahmen

Internationaler ICAS/ApopTrain Trainingskurs, Fortschritte in der Zelltodforschung – Von fundamentalen Prinzipien zu neuen therapeutischen Konzepten, Juli 2008, Günzburg

Symposium der DFG-Forschergruppe 527 "Suszeptibilitätsfaktoren der Tumorgenese", Mai 2010, Mainz

2. Chinesisch-Deutsches Symposium zu DNA-Reparatur und menschlichen Krankheiten, Oktober 2011, Mainz

11.2.2 Aktive Teilnahme mit Posterpräsentation

51. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), März 2009, Mainz

C. Belohlavek, S.C. Naumann, W.P. Roos and B. Kaina. The p53 status determines the sensitivity of malignant melanoma cells to the DNA interstrand crosslinking anticancer drug fotemustine

11. Tagung der Deutschen Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung, Jena, September 2009

C. Belohlavek, S.C. Naumann, W.P. Roos and B. Kaina. XPC/DDB2 mediated interstrand crosslink repair causes resistance towards fotemustine induced apoptosis in p53wt malignant melanoma cell lines

1. Tagung der Gesellschaft für klinische Epigenetik (CLEPSO), März 2011, Homburg/Saar

C. Belohlavek, W. P. Roos, J. Hülsenbeck and B. Kaina. Valproic acid sensitizes malignant melanoma cells to the alkylating anticancer drugs temozolomide and fotemustine