

Therapie kutaner Tumoren

Identifizierung molekularer Biomarker der *ex vivo*

Chemosensitivität des malignen Melanoms und

Evaluierung der Wirkungsweise von Interferonen und

Artemisininen auf das Merkelzellkarzinom



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christoph Willmes

aus Arnsberg

Würzburg im Juli 2013

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Rössler

Gutachter: Prof. Dr. J. C. Becker

Gutachter: Prof. Dr. M. Engstler

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Tumoren der Haut.....	5
1.2 Das Melanom.....	5
1.2.1 Therapie des Melanoms	6
1.2.2 Der ATP-basierte Chemosensitivitätsassay	8
1.3 Das Merkelzellkarzinom.....	10
1.3.1 Das Merkelzellpolyomavirus.....	11
1.4 Entwicklung neuer Therapieoptionen für Melanom und Merklezellkarzinom...	13
1.4.1 Identifikation und Evaluierung von molekularen Biomarkern der <i>ex vivo</i> Chemosensitivität und des klinischen Chemotherapieerfolgs beim malignen Melanom.....	13
1.4.2 Neue Therapieoptionen für das Merkelzellkarzinom	16
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Versuchstiere	20
2.1.2 Material.....	20
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Zellkultur und zellbiologische Methoden.....	35
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	42
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	44
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	49
2.2.5 Histologische Methoden	51
2.2.6 Tierexperimentelle Methoden	52
3. Ergebnisse	54
3.1 Chemosensitivität beim Melanom	54
3.1.1 Korrelation zwischen der Genexpression der Kandidatenmarker und des <i>ex vivo</i> Chemosensitivitätsindex (ICSI)	54

3.1.2 Korrelation zwischen der SERPINB1 Expression und dem ICSI der Zytostatika-Kombination Paclitaxel plus Cisplatin	58
3.1.3 <i>In vitro</i> Korrelation zwischen <i>SERPINB1</i> Expression und dem ICSI der Zytostatika-Kombination von Paclitaxel plus Cisplatin.....	60
3.1.4 <i>Knockdown</i> von SERPINB1 in Melanomzelllinien	62
3.1.5 Korrelation zwischen <i>SERPINB1</i> Expression und Überlebenszeit	63
3.2 Merkelzellkarzinom	66
3.2.1 Interferon	66
3.2.2 Artemisinine.....	77
4. Diskussion.....	83
4.1 <i>Chemosensitivität</i>	83
4.1.1 Die Rolle von SERPINB1 bei der Chemosensitivität des Melanoms	84
4.1.2 Ist SERPINB1 ein potentieller zukünftiger Biomarker der Chemosensitivität beim Melanom?.....	88
4.2 <i>Merkelzellkarzinom</i>	89
4.2.1 Wirkungsweise von Interferon auf das MCC	89
4.2.2 Wirkungsweise von Artemisininen auf das MCC	94
4.2.3 Interferon und Artesunate als Therapieoptionen beim MCC.....	97
5. Zusammenfassung	98
5. Abstract	100
6. Literaturverzeichnis	102
7. Abbildungsverzeichnis	116
8. Tabellenverzeichnis	118
9. Abkürzungen.....	119
10. Publikationen	122
11. Lebenslauf.....	124
12. Eidesstattliche Erklärung	125
13. Danksagung	126

1. Einleitung

1.1 Tumoren der Haut

Hautkrebs gehört zu den am häufigsten auftretenden Krebsarten, besonders in der hellhäutigen Bevölkerung (105, 114). Dies umfasst an erster Stelle nicht-melanozytäre Hauttumoren (*non-melanoma skin cancer*; NMSC), wie das Basalzellkarzinom (BCC) und das Plattenepithelkarzinom (*squamous cell carcinoma*; SCC), gefolgt vom malignen Melanom. Weitere NMSC sind die kutanen Lymphome und das Merkelzellkarzinom (MCC), wobei das MCC einen der aggressivsten Hauttumoren darstellt. Diese beiden letzteren Tumoren sind jedoch recht selten und nur für ca. 1% aller Hauttumoren verantwortlich (144). BCC und SCC sind dagegen die Hautkrebsarten mit der höchsten Inzidenz, die für ca. 95% der NMSC verantwortlich sind, deren Inzidenz ca 100 Patienten/100.000 Personen in Deutschland beträgt (zusammengefasst aus (180)). Die Mortalitätsrate für BCC und SCC ist glücklicherweise sehr gering. Dies erklärt auch, warum das Melanom mit nur etwa 10% aller Hautkrebsfälle für 80% der Hautkrebs-verursachten Todesfälle verantwortlich ist (83). Weltweit zeigt der Hautkrebs über die letzten Jahre im Allgemeinen eine steigende Inzidenz (114, 183). Einer der Hauptgründe hierfür ist eine zunehmend hohe Belastung mit ultravioletter (UV) Strahlung, die über DNA-Schäden zu genetischen Mutationen und letzten Endes zur Entwicklung eines Tumors führen kann (105, 131). Das häufige Vorkommen und die steigende Inzidenz zeigen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapieformen für Hauttumoren. In der vorliegenden Arbeit wurden daher für das maligne Melanom und das Merkelzellkarzinom, die beiden aggressivsten Hauttumoren, für die gerade in fortgeschrittenen Stadien nur wenige Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen, neue Optionen zur Auswahl an Therapien und Behandlungsmöglichkeiten genauer untersucht.

1.2 Das Melanom

Im Jahr 2006 gehörte das maligne Melanom deutschlandweit zu den zehn häufigsten Krebsneuerkrankungen (145). In der Tat konnten bei den Frauen 4,3% und bei den

Männern 3,2% aller bösartigen Neubildungen dem Melanom zugeschrieben werden, und das Melanom war für 1% aller Krebstodesfälle verantwortlich (145). Der hoch aggressive Tumor entwickelt sich aus Melanozyten und tritt in erster Linie in der Haut auf, aber auch Melanome der Schleimhäute (119, 138) und des Auges (137, 169) sind bekannt. Es sind verschiedene Stadien der Tumorgenese und Progression beschrieben (108). Modellhaft steht dort als Ausgangspunkt der Entwicklung eines Melanoms ein gutartiger Nävus, der zu einem späteren Zeitpunkt in einen dysplastisch veränderten Nävus übergeht. Aus diesem entwickelt sich der Primärtumor des malignen Melanoms, der zunächst horizontal und dann vertikal wächst und dabei auch metastasieren kann. Als letzter Schritt der Tumorprogression steht dann die Metastase. Die Assoziation mit einem Nävus scheint aber nur in 20-50% der Melanome gegeben zu sein (53, 165).

Man unterscheidet zwischen verschiedenen Subtypen des Melanoms: das superfiziell-spreitende, das noduläre, das Lentigo-Maligna-Melanom, das akral-lentiginöse sowie das teils nicht klassifizierbare Melanom (133). Von diesen Formen bildet das noduläre maligne Melanom auf Grund seines schnellen Wachstums und seiner frühzeitigen Metastasierung einen besonders aggressiven Typ (159), während das Lentigo-Maligna-Melanom eher langsam wächst und eine günstige Prognose hat (38).

Die AJCC (American Joint Committee on Cancer) Klassifizierung des Melanoms erfolgt anhand der Parameter Tumordicke, Ulzeration, Mitoserate, Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung und Serum LDH-Konzentration (17). Bei frühzeitigem Erkennen eines Melanoms im Stadium I oder II, d.h. bei Vorliegen eines Primärtumors ohne weitere Absiedlungen, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 97% und 53% (17). Wenn die Lymphknoten bereits befallen sind, d.h. das Stadium III erreicht wurde, so fällt die 5-Jahres-Überlebensrate auf etwa 40% für Patienten mit ulzeriertem Primärtumor und Lymphknoten mit Makrometastasen. Das Stadium IV ist durch das Vorliegen von Fernmetastasen charakterisiert und die 1-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 10 und 30% (17).

1.2.1 Therapie des Melanoms

Bei der frühzeitigen Erkennung des Melanoms im Stadium I oder II besteht die Therapie aus der Exzision des Primärtumors und gegebenenfalls des Schildwäch-

terlymphknotens und anschließend aus regelmäßigen Kontrolluntersuchungen (61). Sollten bereits ein oder mehrere Lymphknoten befallen sein, erfolgt zusätzlich eine Lymphadenektomie. Für *high risk* Melanompatienten besteht die Möglichkeit einer adjuvanten Therapie mit Interferon- α , die neben einer Verbesserung des progressionsfreien Überlebens in einigen Studien auch eine Verbesserung des Gesamtüberlebens gezeigt hat (62, 90-92). Für Patienten im Stadium der Fernmetastasierung (Stadium IV) gab es bis vor kurzem keine wirklich effektiven Therapiemöglichkeiten. Die Standardtherapie besteht aus einer Monochemotherapie mit Dacarbazin (DTIC) (61), die allerdings lediglich eine Ansprechrate von 10-26,3% aufweist (158, 207). In klinischen Studien wurde weiterhin der Einsatz von Polychemotherapien sowie Immuntherapien getestet, es stellte sich allerdings kein signifikanter Überlebensvorteil im Vergleich zur Therapie mit DTIC heraus (25, 52, 83). Neuere „Targeted-Therapien“ zeigen jedoch in klinischen Studien beachtenswerte Erfolge. Hier sei besonders der BRAF Inhibitor Vemurafenib genannt, der spezifisch auf Tumoren mit der *BRAF* V600E Mutation wirkt (166). In einer Phase III Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten die mit Vemurafenib behandelt wurden, ein besseres Gesamtüberleben zeigen, als solche, die mit DTIC behandelt wurden. Die Überlebensrate lag dabei nach 6 Monaten bei 84% in der Vemurafenib Gruppe (Ansprechrate 48%) im Vergleich zu 64% in der mit DTIC behandelten Gruppe (Ansprechrate 5%) (32). In der Tat führten die klinischen Ergebnisse zu einer Zulassung des Medikaments durch die FDA im August 2011 und durch die EMA im März 2012 für Patienten mit fortgeschrittenem Melanom und *BRAF* V600E Mutation. Nachteil der Therapie mit dem BRAF Inhibitor sind zahlreiche starke Nebenwirkungen, wie zum Beispiel das Auftreten von SCCs (146). Auch scheint diese Therapie mit dem Problem einer schnellen Resistenzentwicklung konfrontiert zu sein, oft entsteht eine solche Resistenz bereits innerhalb weniger Monate (195). Weiterhin gilt es zu bedenken, dass eine Anwendung nur bei vorliegender *BRAF* V600E Mutation in Frage kommt. Innerhalb der 42% der Patientengruppe mit einer *BRAF* Mutation ist dies für 80% der Fälle gegeben (s. COSMIC Database, Wellcome Sanger Trust) (151). Eine solche Einschränkung der Therapie auf Patientensubgruppen gilt für die meisten zielgerichteten Inhibitoren, die für eine Behandlung des metastasierenden Melanoms in Betracht gezogen werden können. Weiterhin ist ihr Einsatz als Monotherapie vermutlich nur ein erster Schritt bei der Entwicklung neuer Behandlungsformen. Zukünftig sind Kombinationen mit

den klassischen Therapien wie der Chemotherapie oder mit immunmodulierenden Therapien denkbar. Diesbezüglich wurde Ipilimumab, ein Antikörper gegen das *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) im vergangenen Jahr für die Therapie von Patienten mit metastasiertem Melanom zugelassen. CTLA-4 schränkt die Aktivierung von T-Lymphozyten ein. Der Einsatz des Antikörpers soll diesen Effekt aufheben und dadurch eine andauernde Immunreaktion gegen den Tumor aufrechterhalten. Bei Patienten mit metastasiertem Melanom führte dies als Mono- aber auch in Kombinationstherapie mit einer Impfung zu einem verlängerten Gesamtüberleben (75).

1.2.2 Der ATP-basierte Chemosensitivitätsassay

Trotz der neuen Möglichkeiten in der Behandlung des Melanoms dürfte die Chemotherapie als Einzeltherapie oder in Kombination mit anderen Therapiearten weiterhin für viele der fortgeschrittenen Melanompatienten die Standardtherapie bleiben. Ziel muss es daher sein, auch für diese Therapieform eine optimierte, zielgerichtete Therapiestrategie zu finden. Hierbei könnte der im Jahr 1995 von Andreotti und Kollegen entwickelte ATP-basierte Tumorchemosensitivitätsassay (ATP-TCA; siehe Abb. 1) hilfreich sein (8). In diesem Assay können Tumorzellen *ex vivo* auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen Zytostatika hin getestet werden. Da die Zellen während der Testung nicht zu Wachstum und Proliferation angeregt werden, bilden sie exakt die Tumorzellzusammensetzung ab, die beim Zeitpunkt der Gewebeentnahme *in vivo* vorgelegen hat.

1. Einleitung

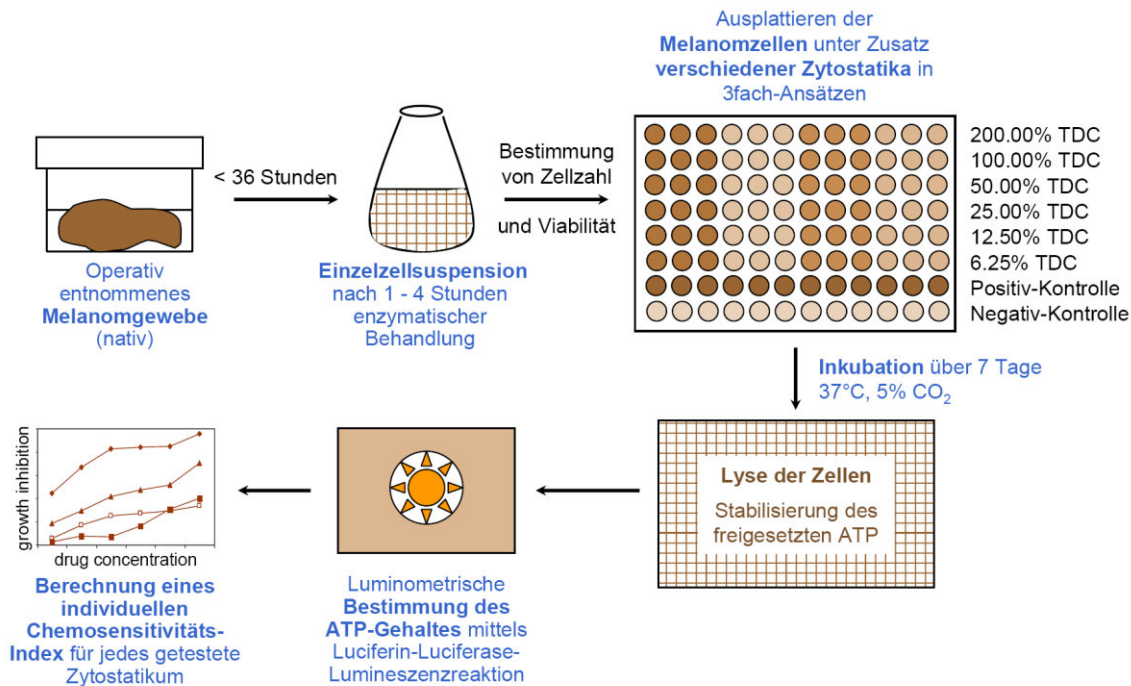


Abb. 1: Schematische Darstellung der *ex vivo* Chemosensitivitätstestung. Der Assay basiert auf der Messung des ATP-Gehaltes frischer, aus Metastasengewebe gewonnener Tumorzellen (nach Andreotti et al. (8)). Die Berechnung des individuellen Chemosensitivitätsindex (ICSI) erfolgt über die Summation der Effekte der Einzeldosen im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen; TDC = Test-Medikament Konzentration

Bisherige klinische Einsatzgebiete des ATP-TCA waren beispielsweise der Versuch einer Vorhersage des Erfolgs einer Chemotherapie an Gewebeproben von primären Uvea-Melanomen (129). Auch wurde das System erfolgreich zur Vorhersage der Chemosensitivität von Patientinnen mit metastasierendem Ovarialkarzinom eingesetzt (101). Durch den Assay konnte gezeigt werden, dass Melanome unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber einer ganzen Reihe verschiedener Zytostatika, einzeln oder in Kombination, aufweisen können (39, 188). Im Rahmen einer Phase II Studie (187) wurde daraufhin mit Hilfe des ATP-TCA für Patienten mit metastasierendem Melanom, die bislang keine Chemotherapie erhalten hatten, ein individueller Chemosensitivitätsindex (BICSI) berechnet. Die Substanzen, die hierbei *ex vivo* das beste Ergebnis aufwiesen, wurden im Anschluss auch für die Therapie des jeweiligen Patienten herangezogen. Anhand des BICSI konnten die Patienten im Nachhinein in eine chemoresistente und chemosensitive Gruppe eingeteilt werden. Die Gruppe, die eher chemosensitiv auf die für sie beste individuelle Therapie angesprochen hatte, wies dabei eine erhöhte Therapieansprechrate sowie ein verlängertes Gesamtüberleben auf (187). Eine der *ex vivo* am wirksamsten getesteten Zytostatika-Kombinationen

war dabei die von Paclitaxel und Cisplatin. Der ATP-TCA bildet also eine hervorragende Grundlage, um das Ansprechen von Patienten auf eine Chemotherapie vorherzusagen.

1.3 Das Merkelzellkarzinom

Das Merkelzellkarzinom (MCC) wurde erstmals im Jahre 1972 von Toker (175) beschrieben und lässt sich histologisch in drei Formen - den klassisch trabekulären, den intermediären sowie den kleinzelligen Typ - einteilen (68). Das Auftreten elektrodichter neurosekretorischer Granula im MCC ließen Merkelzellen als Ursprungszellen des Tumors vermuten, da solche Strukturen innerhalb der Haut nur dort zu finden sind (68, 152). Die Vermutung, dass es sich bei den Vorläuferzellen der Merkelzellen um adulte epidermale Stammzellen handelt (6), konnte in einer aktuellen Arbeit bestätigt werden. Dort wurde nachgewiesen, dass Merkelzellen während der Embryonalentwicklung aus epidermalen Stammzellen hervorgehen (190).

Die Inzidenz des Tumors ist von 0,15 pro 100.000 Einwohner im Jahre 1986 auf 0,44 im Jahr 2001 angestiegen (74). Dieser Anstieg um 8% pro Jahr ist höher als der des malignen Melanoms mit einer Rate von 3% pro Jahr (74). Als Grund für diesen rapiden Anstieg kann eine erhöhte Aussetzung gegenüber Risikofaktoren angenommen werden. Einer der wichtigsten ist - wie beim Melanom - die Sonnenstrahlungsexposition. So stellen hellhäutige Personen mit erhöhter Exposition von UV-Strahlung eine besondere Risikogruppe dar. Bei ihnen entwickelt sich das MCC vorwiegend an den sonnenexponierten Extremitäten (20, 72, 74). In erster Linie tritt das MCC bei älteren Personen mit einem Durchschnittsalter von ca. 70 Jahren auf (18). Bei Gruppen mit jüngerem Alter handelt es sich häufig um immunsupprimierte Patienten (191).

Die Progression des MCC wird nach der AJCC in vier Stufen eingeteilt (1). Stufe I umfasst den Primärtumor mit einer Größe von ≤ 2 cm, die 5-Jahres Überlebensrate liegt hier bei 60-79%. Erreicht der Tumor eine Größe von > 2 cm, befindet er sich in Stufe II und die Überlebensrate sinkt auf 49-58%. In Stufe III liegen Mikro- und Makrometastasen des Lymphknotens vor. Die 5-Jahres-Rate liegt dabei bei 26-42%. Im Stadium der Fernmetastasierung (IV) beträgt das Überleben nach 5 Jahren lediglich 18% (106, 155). Die Therapieoptionen für das MCC sind stark begrenzt. In frühen Stadien ist neben der großflächigen Exzision des Tumors eine Strahlentherapie

das Mittel der Wahl. Ist die Krankheit weit fortgeschritten, kommt auch die Chemotherapie zur Anwendung, hier vor allem Doxorubicin, Vincristin, Etoposid und Cisplatin, allein oder in Kombination (155, 173). Aufgrund der hohen Toxizität und Remissionsrate sowie dem durchschnittlich eher hohen Alter der Patienten, bringt die Chemotherapie wenige Vorteile und ihr Einsatz muss sorgfältig abgewogen werden (155).

1.3.1 Das Merkelzellpolyomavirus

Generell tritt das MCC bei Patienten mit Immunsuppression, Organtransplantationen, Lymphomen oder HIV Infektionen wesentlich häufiger auf (149). Diese Assoziation mit einem immunsupprimierten Status könnte auf eine virale Pathogenese hinweisen. Feng und Kollegen konnten tatsächlich mittels *digital transcriptome subtraction* (DTS) in 80% der Fälle ein neues Polyomavirus im MCC nachweisen, das meist monoklonal integriert im Genom der Tumoren vorlag (57). Weitere Untersuchungen konnten diese Entdeckung belegen und obwohl die Häufigkeit viruspositiver MCCs schwankte, scheint er in ca. 80% der Fälle nachweisbar zu sein (19, 89, 164). Da das neu entdeckte Merkelzellpolyomavirus (MCV) monoklonal in den Tumoren vorlag, konnte darauf zurückgeschlossen werden, dass es vor der Expansion der Tumorzellen integriert ist (57). Dies wiederum spricht für die Beteiligung des Virus bei der Entstehung und Pathogenese der meisten MCC. In einer aktuellen Arbeit konnte das MCV sogar in fast allen untersuchten Tumoren nachgewiesen werden (147).

Polyomaviren gehören zur Gruppe der DNA-Viren und bestehen aus einem nicht umhüllten, ikosaedrisch geformten Capsid. In diesem liegt das doppelsträngige, zirkuläre Genom in einer *supercoiled* Formation vor und ist zusammen mit zellulären Histonen in einem „Minichromosom“ assoziiert (81). Das virale Genom kann in einen frühen, einen späten und einen nicht-codierenden Bereich eingeteilt werden. Im frühen Bereich liegen die Sequenzen für die Tumor-Antigene (*TAs*), im Falle des MCV sind dies das *small-T-Antigen* (*sTA*) und das *large-T-Antigen* (*LTA*) und im späten Bereich sind die Strukturproteine codiert. Der nicht-kodierende Bereich enthält den Replikationsursprung (*ori*), die Promotoren, das *glucocorticoid-responsive element* (GRE-Element) sowie eine Enhancer-Region. Die bekanntesten Vertreter der Polyomaviren sind das *simian virus 40* (SV40), das murine Polyomavirus (MPYV) und

1. Einleitung

die humanpathogenen JC- und BK-Viren (JCV und BKV). Insgesamt konnten, gerade durch viele Neuentdeckungen in den letzten Jahren, zehn Polyomaviren im Menschen nachgewiesen werden (197).

Die wichtigsten Proteine der Polyomaviren sind die TAs. Für SV40 und MPYV konnte ihre onkogene Aktivität bereits gezeigt werden (35). Hauptverantwortlich hierfür ist die Interaktion der TAs mit den zellulären Tumorsuppressoren p53, dem Retinoblastomprotein (RB) und der Serin/Threonin Protein Phosphatase (PP2A) (5, 11). Die TAs entstehen durch alternatives Spleißen aus einem Vorläufertranskript. Beim MCV führt dies zur Bildung vier verschiedener Genprodukte: dem LTA, zwei sTA Varianten und dem 57kt, einem zum SV40 17kt analogen Produkt (161) (vgl. Abb. 2). Alle Varianten enthalten eine CR1 und eine DnaJ Domäne, nur das sTA besitzt zusätzlich eine PP2A Bindungs-Domäne. LTA und 57kt beinhalten ein LXCXE Motiv, das als Bindedomäne für das RB dient. Exklusiv im LTA liegen weiterhin ein *origin-binding*-motiv (OBD), ein Zink Finger- und Leucin Zipper Motiv sowie Domänen mit Helikase und ATPase Aktivität. Alle bisherigen Sequenzen für in MCC integrierte MCV kodieren für ein durch Deletion oder Mutation trunkiertes *LTA*. Dies führt dazu, dass sich LTA und 57kt nicht weiter unterscheiden lassen und sowohl die LTA spezifischen Domänen und Motive, als auch die Bindedomäne für den zellulären Tumorsuppressor p53 verloren gehen (77, 78, 154, 161).

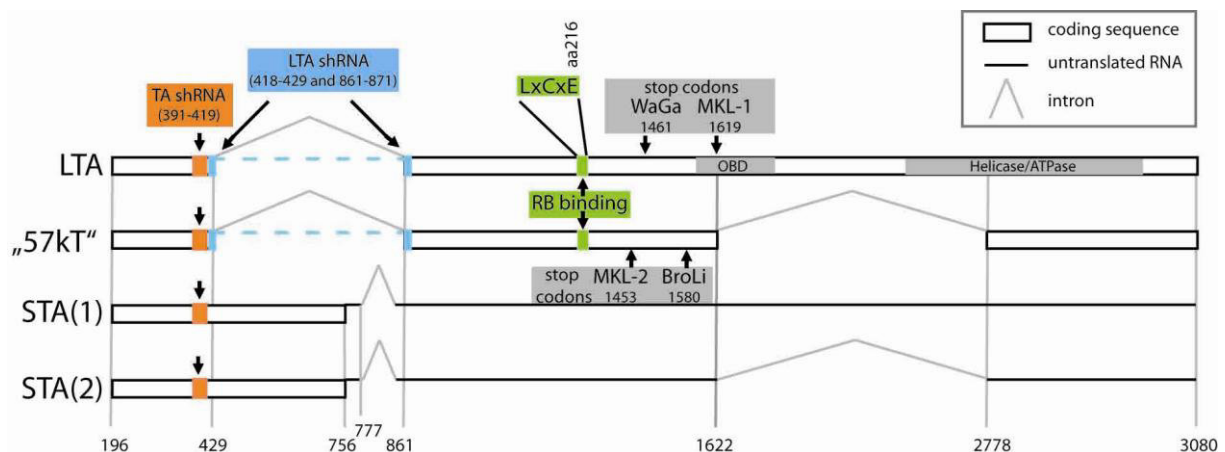


Abb. 2: Übersicht über die verschiedenen T-Antigene des MCV. Alle vier TAs entstehen aus einem gemeinsamen Vorläuferprodukt durch alternatives Spleißen. LTA und 57kt werden jeweils durch eine, das sTA hingegen durch zwei mRNAs codiert. Das 5'-Ende ist bei allen Varianten identisch. Der Einsatz einer shRNA die in dieser Region angreift ermöglicht den gemeinsamen *knockdown* aller TAs.

Das sTA des MCV entfaltet sein onkogenes Potential, indem es die Dephosphorylierung von aktivem 4E-BP1 hemmt (162). Dies hat zur Folge, dass es im MCC zur erhöhten cap-abhängigen Translation kommt. Eine weitere Bestätigung für die Rolle des MCV bei der MCC Pathogenese stellt die Beobachtung dar, dass der Knock-down der viralen TAs in MCV+ MCC Zelllinien zu einem Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führt (78). Diese *oncogenic addiction* konnte auch *in vivo* mit Hilfe eines Xenotransplantationsmodells bestätigt werden (77). In derselben Arbeit wurde gezeigt, dass eine intakte RB-Bindedomäne des LTAs benötigt wird, um das Überleben der MCV+ MCC Zellen zu sichern. Die Tatsache, dass MCV+ MCC Zellen und Tumoren abhängig von der Expression des viralen TAs sind, macht besonders das LTA zu einem vielversprechenden Ziel für neue Therapieansätze.

1.4 Entwicklung neuer Therapieoptionen für Melanom und Merkelzellkarzinom

Wie aus den vorherigen Abschnitten zu entnehmen ist, handelt es sich sowohl beim Melanom als auch beim Merkelzellkarzinom um äußerst aggressive Tumoren mit steigender Inzidenz. Weiterhin stehen den betroffenen Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung keine Therapien mit längerfristigem Erfolg zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden daher für das maligne Melanom und das Merkelzellkarzinom neue Optionen zur Auswahl an Therapien und Behandlungsmöglichkeiten genauer untersucht.

1.4.1 Identifikation und Evaluierung von molekularen Biomarkern der *ex vivo* Chemosensitivität und des klinischen Chemotherapieerfolgs beim malignen Melanom

Chemotherapie stellt weiterhin eine tragende Säule für die Behandlung von fortgeschrittenen Melanompatienten dar. Dabei lässt die heterogene Chemosensitivität unter den Melanompatienten vermuten, dass eine patientenspezifische Selektion der zu verwendenden Zytostatika die generell geringe Ansprechrate deutlich verbessern könnte. Der ATP-basierte Chemosensitivitätsassay bietet diesbezüglich bereits einen guten Selektionsprozess. Er hat allerdings den Nachteil, dass er langwierig und rela-

tiv arbeits- und kostenintensiv ist. Zudem kann er nur unter standardisierten Laborbedingungen durchgeführt werden. Um dem entgegenzuwirken, würde die Identifikation und Charakterisierung von prädiktiven Biomarkern der *ex vivo* Chemosensitivität gegenüber verschiedenen Zytostatika einen wichtigen Schritt zur Etablierung einer individualisierten Chemotherapie darstellen.

Für das Melanom konnten bereits verschiedene Biomarker identifiziert werden, die jedoch überwiegend prognostische Relevanz im Hinblick auf das Gesamtüberleben der Patienten zeigen (76, 185, 186) und nur selten prädiktiven Wert für den Therapieerfolg hatten (125, 184, 189). Im Bereich von prädiktiven Therapiemarkern konnte bislang lediglich gezeigt werden, dass eine Überexpression von p16^{INK4a} und das Fehlen einer *BRAF* Mutation mit der *in vivo* Ansprechrate auf eine mit Melphalan und Actinomycin-D basierten Therapie korreliert (60). In einer weiteren Arbeit wurde die geringe Expression des „SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1“ Proteins (SMARCB1 aka SNF5) in Korrelation mit einem schlechten Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem malignem Melanom gesetzt (109). In dieser Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass ein siRNA-vermittelter *SNF5 knockdown* die Chemoresistenz gegenüber Doxorubicin, Etoposid und Camptothecin in Melanomzellen erhöht. Beide Arbeiten zeigen, dass die Suche nach Biomarkern der Chemosensitivität zu vielversprechenden Ergebnissen führen kann. So konnte für das Ovarialkarzinom mit Hilfe des ATP-TCA bereits eine Assoziation zwischen Chemosensitivität, u.a. gegenüber Cisplatin, und der Genexpression der sensitivitätsvermittelnden Gene gezeigt werden (66). Weiterhin konnte eine parallel zu dieser Arbeit veröffentlichte Studie zeigen, dass die Chemosensitivität gegenüber Zytostatika bei Melanomzellen gut mit der Expression derjeniger Gene korreliert, die eine Chemoresistenz vermitteln (139). Hierbei waren vor allem Kandidaten aus den Bereichen der Apoptose und DNA-Reparatur vertreten. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung weiterer Biomarker der *ex vivo* Chemosensitivität des malignen Melanoms.

Für ein initiales Screening nach Kandidatenmolekülen zur Vorhersage der *ex vivo* Chemosensitivität wurde ein Gen-Expressions-Profilings mittels einer Microarray Analyse von jeweils 3 chemoresistenten bzw. chemosensitiven Melanomzelllinien durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen differentiell exprimierter Gene aus dieser

Untersuchung wurden 6 verschiedene Genprodukte als mögliche Chemosensitivitätsmarker ausgewählt (Tab. 1).

Tab. 1: Ausgewählte differentiell exprimierte Kandidatengene aus Zelllinien aus chemosensitiven versus chemoresistenten Melanometastasen

Name	Gen Symbol	Funktion
Secernin 1	<i>SCRN1</i>	Dipeptidase
Lysyl oxidase-like 1	<i>LOXL1</i>	Proteinmodifikation
Dystonin	<i>DST</i>	Zytoskelettorganisation
Serpin peptidase inhibitor B1	<i>SERPINB1</i>	Endopeptidase Inhibitor
Thymosin, beta 4, X-linked	<i>TMSB4X</i>	Zytoskelettorganisation
Vesicle-associated membrane protein 5	<i>VAMP5</i>	Muskelentwicklung

Secernin kodiert für ein zytosolisches Protein, das für die Regulation der Exozytose bedeutsam ist (194) und eine Überexpression in Magenkarzinomgewebe zeigt (171). Das Genprodukt von *Lysyl-Oxidase-Like-1* spielt eine Rolle für den Aufbau und Erhalt der extrazellulären Matrix (112), und kann im Falle einer Mutation des Gens Auslöser eines Glaukoms oder Aortenaneurysmas sein (98, 174). Zudem wurde es als Regulator pathophysiologischer Signalkaskaden beim Harnblasenkarzinom beschrieben (199). *Dystonin* kodiert für ein Protein, das mit dem Zytoskelett interagiert (41, 208). Vamp5 ist Teil eines Proteinkomplexes, der an der Verschmelzung von Vesikeln und Zellmembranen beteiligt ist (209). *Serpin-Peptidase-Inhibitor-1* (*SERPINB1*) kodiert für ein Protein, das als Endopeptidase in der Pathophysiologie der Lungenfibrose sowie der bronchopulmonalen Dysplasie beschrieben ist (22, 204). Für das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle konnte gezeigt werden, dass dort eine erhöhte Expression von *SERPINB1* vorliegt, und dass *SERPINB1* die Zellmotilität fördert (181). Das Genprodukt von *Thymosin-beta-4* ist ein mit den Actinfilamenten des Zytoskeletts interagierendes Protein, das eine Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition und somit in der Tumorprogression und Metastasierung spielt (193). Diese Funktion konnte im Mausmodell auch für das maligne Melanom nachgewiesen werden (31, 84). Für *Thymosin-beta-4* ist als einziges Produkt der sechs genannten Kandidatengene bereits eine Assoziation mit der *ex vivo* Chemo-

sensitivität von Tumoren (Zervixkarzinom, Kolorektalkarzinom) beschrieben (79, 134).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Genexpression dieser Kandidatenmarker mit der Chemosensitivität und dem klinischen Chemotherapieerfolg von Patienten mit metastasierendem Melanom zu assoziieren. Hierdurch sollten Biomarker der *ex vivo* Chemosensitivität für das maligne Melanom identifiziert werden.

1.4.2 Neue Therapieoptionen für das Merkelzellkarzinom

Nachdem es für seltene Tumorerkrankungen wie das MCC äußerst schwer ist, klinische Studien durchzuführen, sind Therapieoptionen meist nur für einzelne Fälle beschrieben. Eine effiziente Therapie für Patienten mit fortgeschrittenem MCC hat sich dabei noch nicht herauskristallisiert. Die Beteiligung des MCV an der Tumorgenese und die Tatsache, dass das Überleben von MCC Zelllinien von der Expression der viralen Onkogene abhängig ist, bieten eine Grundlage für neue Therapien.

1.4.2.1 Interferon

Interferone (IFNs) wurden erstmals im Jahre 1957 von Isaacs und Lindenmann beschrieben (82). Sie wurden von Zellen sezerniert, die mit hitzeinaktivierten Influenzaviren behandelt worden sind. IFNs gehören zu einer großen Familie von multifunktionellen Proteinen, die sowohl eine antivirale als auch eine antitumorale Wirkung aufweisen. Ebenso haben sie Effekte auf das Immunsystem, die durch interferonstimulierte Gene (ISGs) vermittelt werden (27). Drei verschiedene IFN Typen konnten bereits beschrieben werden. Typ I IFNs (α , β , ϵ , κ , ν , ω) sowie Typ III IFN (IFN λ 1-3) (9) werden als Antwort auf Virusinfektionen, doppelsträngige RNA oder ähnliche Stimuli hin produziert. Die Expression von Typ II IFN (IFN γ) erfolgt in aktivierten T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (82, 156). Die biologische Aktivität von IFNs wird durch ihre Bindung an ihre zugehörigen Rezeptoren vermittelt. Dies sind in erster Linie der IFN- α/β Rezeptor für Typ I, der IFN γ Rezeptor für Typ II und der IL10R2/IFNLR1 Rezeptor für Typ III IFNs. Nach der Bindung kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalwege, wie z.B. der Jak/STAT Signalkaskade. Diese lösen die Transkription verschiedener Gene aus, die daraufhin die antiproliferative oder

antivirale Wirkung von Typ I und III oder die immunmodulatorische Wirkung von Typ II IFN herbeiführen (27). Welchen genauen Effekt die aktivierten Rezeptoren vermitteln, ist abhängig von verschiedenen weiteren Faktoren. Hierzu zählt unter anderem der Einfluss weiterer Zytokine, ob die betroffene Zelle zuvor aktiviert wurde oder wie das umgebende physiologische Milieu beschaffen ist.

Auf therapeutischer Ebene beschränkt sich der Einsatz zum größten Teil auf Typ I IFNs und hier besonders auf IFN α . So wurde zum Beispiel rekombinantes IFN $\alpha 2$ zur Therapie von Haarzelleukämie, dem Nierenzellkarzinom oder dem malignen Melanom zugelassen (67, 91, 92, 99). Weiterhin wird IFN α zur Behandlung von Hepatitis B und C sowie dem mit HIV assoziiertem Kaposisarkom verwendet, während IFN β zur Behandlung von multipler Sklerose herangezogen wird (29, 110, 117, 141, 198).

1.4.2.2 Artemisinin

Artemisinin ist ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff, der aus dem einjährigen Beifuss (*Artemisia annua*) gewonnen werden kann, einer Heilpflanze, die in der traditionellen chinesischen Medizin bereits lange bekannt ist (51, 96). Wiederentdeckt wurde sie von chinesischen Wissenschaftlern in den 1970'er Jahren. Diese suchten im Auftrag der Nordvietnamesischen Regierung während des Vietnamkrieges ein neues Mittel gegen Malaria, da viele der Soldaten daran erkrankt waren (182).

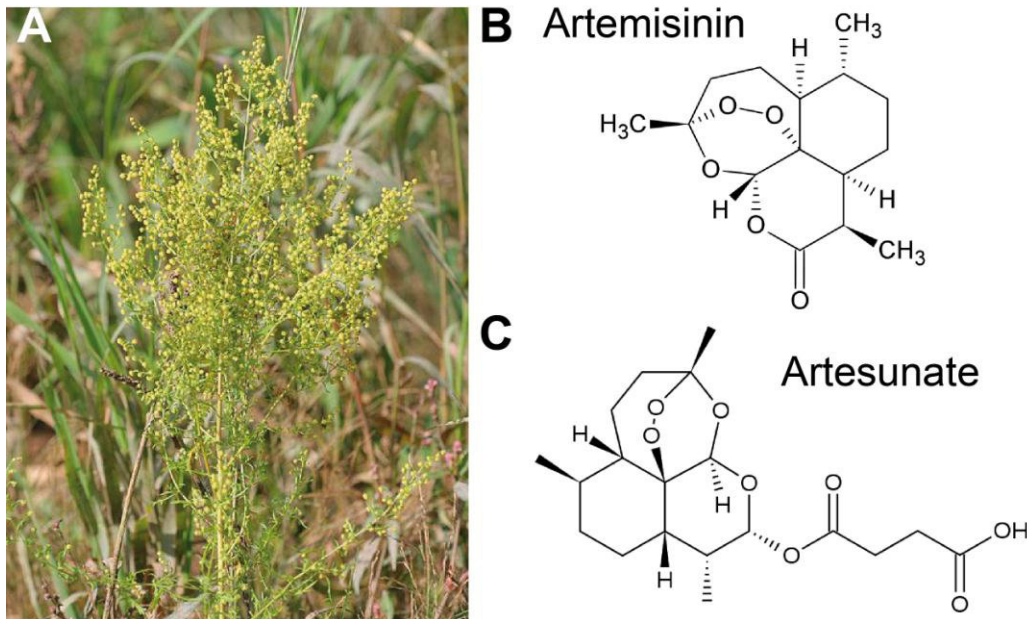


Abb. 3: Der einjährige Beifuss (*Artemisia annua*) und seine Inhaltsstoffe. *Artemisia annua* (A) gehört zur Familie der Asteraceae und ist ursprünglich im eurasischen Großraum beheimatet. Sein Inhaltsstoff Artemisinin (B) und das daraus gewonnene Derivat Artesunate (C) finden als Mittel gegen Malaria Einsatz, und sie besitzen antitumorale und antivirale Eigenschaften. Die Peroxidbrücke der Stoffe bildet bei Kontakt mit Eisen freie Sauerstoffradikale, die wahrscheinlich mechanistisch ausschlaggebend für die Wirkung sind.

Mittlerweile findet Artemisinin (ART) und auch seine Derivate (nachfolgend als Artemisinine bezeichnet), in erster Linie Artesunate (ATS) und Artemether (ATM), weite Verbreitung in der Anwendung gegen die vom Protozoen *Plasmodium spec.* ausgelöste Malaria. Es werden hierbei zwei Hauptmechanismen vermutet, über die Artemisinine ihre Wirkung vermitteln. Die Theorie, dass ihre Wirkung durch Hemmung des Calcium-Transporter PfATP6 vermittelt wird (97), konnte aktuell jedoch nicht bestätigt werden (10). Ein zweiter möglicher Mechanismus verbirgt sich hinter der Struktur der Artemisinine: Sie besitzen eine Peroxidbrücke (s. Abb. 2), die in Anwesenheit von Eisen instabil wird und zur Freisetzung freien radikalischen Sauerstoffs (*reactive oxygen species (ROS)*) führt (24), der dann durch Alkylierung von Proteinen die Wirkung des Stoffes vermittelt (12, 46, 202).

Neben der Behandlung von Malaria wurde in einigen Arbeiten auch ein antitumoraler Effekt der Artemisinine nachgewiesen, sowohl *in vitro* (47, 48, 69) als auch *in vivo* (42). Weitere Untersuchungen an Glioblastom- und Mammakarzinomzellen zeigen, dass ATS durch Produktion von ROS zur Entstehung von Nekrose und mitochondrial-vermittelter Apoptose führt (23, 71). Auch antivirale Wirkung konnte für die Artemisinine nachgewiesen werden. So kommt es durch Artesunate zur Inhibition der Rep-

likation des humanen Zytomegalievirus (HCMV) sowie des Herpes-simplex-Virus 1 (HSV1) (50, 87). Auch das Hepatitis-B Virus (HBV) und das Hepatitis-C Virus (HCV) sprechen auf die Behandlung mit Artemisininen an (136, 150). Von den beiden zuletzt genannten Viren ist auch bekannt, dass sie mitverantwortlich für die Entstehung einiger humaner Karzinome sind (120).

1.4.2.3 Evaluierung der Wirkungsweise von Interferonen und Artemisininen auf das Merkelzellkarzinom

Interferone und Artemisinine sind bekannt für ihre antitumoralen und antiviralen Eigenschaften. Tatsächlich konnte für IFNs bereits gezeigt werden, dass sie mit den T-Antigenen anderer Polyomaviren interagieren. In zwei Arbeiten wurde erfolgreich demonstriert, dass die Expression viraler Gene durch den Einsatz von Typ I IFNs bei JCV (36) und Typ II IFN bei BKV (2) Infektion verhindert werden kann. Bei beiden kam es zu einer Reduktion in der LTA Expression. Weiterhin induzieren IFNs die Expression des „*promyelocytic leukemia*“ Proteins (PML), für das seinerseits durch die Interaktion mit dem LTA eine Regulation der Infektion mit JCV nachgewiesen werden konnte (64). Krasagakis *et al* konnten bereits zeigen, dass eine MCC Zelllinie sensitiv auf IFN α reagiert (94), allerdings ohne Berücksichtigung des MCV. Erste klinische Erfolge konnten auch bei der Behandlung des MCC mit IFN bescheinigt werden (26, 123). In der vorliegenden Arbeit sollten daher die immunmodulatorischen und anti-proliferativen, sowie im Hinblick auf das MCV besonders die antiviralen Eigenschaften von IFNs *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Über die Artemisinine ist vergleichsweise wenig bekannt. Ihre Wirkung wird wahrscheinlich durch die Modulierung zellulärer Proteine durch ROS vermittelt (23, 71). Ihre Wirkung auf andere DNA-Viren wurde bereits beschrieben (51). Zwar sind die genauen Mechanismen hier nicht erforscht, dennoch bieten die bisherigen Forschungsergebnisse ausreichend Grund, auch die Wirkungsweise von Artemisinin auf MCV+ MCC Zelllinien genauer zu beleuchten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Zur Durchführung der Tierexperimente wurden fünf Wochen alte weibliche NOD.CB17/*Prkdc*^{scid} Mäuse verwendet. Alle Tiere wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Rossdorf, Deutschland) bezogen und unter speziellen pathogenfreien Bedingungen gehalten. Alle Experimente wurden unter Einhaltung des gültigen Tierversuchsrechts vorgenommen.

2.1.2 Material

2.1.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller/Lieferant	Typbezeichnung
Autoklav	Fedegari Autoclavi SPA Varioklav, Albuzzano, Italien	Tecnoclav 135S
Blottingkammer	BioRad, München, Deutschland	Mini Trans Blot Mini PROTEAN
Brutschrank (30°)	Memmert, Schwabach, Deutschland / Heraeus, Hanau, Deutschland	BM200, B6030
Brutschrank (37°; 5% CO ₂)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Heraeus Incubate- Function Line
Digitalkameraaufsatz für Lichtmikroskop	Leica, Heerbrugg, Schweiz	ICC50

2. Material und Methoden

Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	FACSCanto
Eismaschine	Scotsman Ice systems, Mailand, Italien	Scotsman AF-20
Geldokumentation	Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland	EASY 429K
Gelkammern	Thermo Fisher Scientific	OWL A2 Large Gel Systems
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland	CK2
Lichtmikroskop	Leica	DM750
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Eppendorf Reference, Eppendorf Research
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg, Deutschland	Sharp R-3V10
Neubauer Zählkammer	Mariendorf, Lauda Königshofen, Deutschland	
PCR Workstation	Herolab	Clean Lab
PCR-Maschine	Life technologies, Darmstadt, Deutschland	96-well GeneAmp PCR-System 9700
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland	inoLab pH 720
Pipettierhilfe	Brand Laborbedarf, Wertheim, Deutschland	Accu-Jet
Plattenphotometer	Tecan, Crailsheim, Deutschland	SLT Spectra
RT-PCR-Maschine	Life technologies	7500 fast real-time PCR
Bakterienschüttler	Eppendorf AG	Innova
Spannungsquelle	BioRad	Power Pac 300
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific	Heraeus Lamin Air HB 2448 & HB 2472

2. Material und Methoden

Heizblock	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	TCR 100
Konvokalmikroskop	Leica	TCS SP2
Kühlschrank (-20°)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland	Liebherr Premium
Kühlschrank (-80°)	Thermo Scientific	ULT Freezer
Vortexer	IKA, Staufen, Deutsch- land	MS-1
Waage	Mettler GmbH, Gießen, Deutschland	Mettler P160
Wasserbad	Memmert	WB-7
Zentrifuge	Hettich, Kirchlengern, Deutschland	Hettich Rotanta/RP
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Heraeus Biofuge pico
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Heraeus Megafuge 1.0 R
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Heraeus Biofuge fresco

2.1.2.2 Verbrauchsmaterial

Material	Volumen / Durchmesser	Firma
Bechergläser	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 L, 2 L	Schott, Mainz, Deutschland
Eppendorf-Caps	1,5 ml	Eppendorf AG
Erlenmeyerkolben	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 L, 2 L	Schott
FACS-Röhrchen	5 ml	BD Biosciences
Röntgenfilm	-	Fujifilm Corporation, Düsseldorf, Deutsch- land
Kryoobjektträger	-	Langenbrink, Te- ningen, Deutschland

2. Material und Methoden

Kryoröhrchen	1,7 ml	Thermo Fisher Scientific
Kulturröhrchen	d: 16 mm, h: 160 mm	Schott
Messzylinder	50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml	Schott
Microtiterröhrchen	1,2 ml	Omnilab, Bremen, Deutschland
Nitrozellulose	-	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Objektgläser	-	Marienfeld
Objektträger	-	Marienfeld
Parafilm	-	Roth
Pipetten	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml	Sarstedt / Costar, Washington, USA Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße	100 µL, 500 µl, 1,5 ml, 2 ml	Oldendorf, Deutschland / Sarstedt
Rührfisch	-	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Schraubverschlussflaschen	80 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott
Schraubverschlussröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Spritzen	1 ml, 5 ml, 10 ml	BD Biosciences
Sterilfilter	Porengröße 0,2 µm, 0,45 µm	Corning, Corning, USA
UV-Küvetten	1,5 ml	Eppendorf
Whatman-Papier	-	Bioscience, Dassel, Deutschland
Zellkulturflaschen	50 ml, 250 ml, 550 ml	Greiner

2. Material und Methoden

Zellkulturplatten	6-Loch, Flachboden	BD Biosciences
Zellkulturplatten	12-Loch	Corning
Zellkulturplatten	96-Loch, Flachboden	Greiner
Zellkulturschalen	d: 6 cm, 10 cm	Thermo Fisher Scientific
Zellschaber	-	BD Biosciences

2.1.2.3 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Substanz	Firma
7-AAD (7-Aminoactinomycin)	BD Bioscience
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	Roth
LB-Agar	Life technologies
Agarose	Biozym
Ampicillin	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Antibody diluent	DAKO, Hamburg, Deutschland
Artemisinin	Sigma Aldrich
Artesunate	Sigma Aldrich
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich
Complete protease inhibitor cocktail tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, Deutschland
DNase	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland
DNA –Probenpuffer (6x)	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
dH ₂ O	Life technologies

2. Material und Methoden

dNTPs	Life technologies
Doxycyclin	Sigma Aldrich
EDTA	Roth
EDTA 0,02 % in PBS	Sigma Aldrich
Ethanol (100 %, 96 %, 70 %)	Apotheke Uniklinik Würzburg, Deutschland
EZ Mount Eindeckmedium	Thermo Fisher Scientific
Formaldehyd (37 %ige wässrige Lösung)	Sigma Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich / Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Interferon (human; beta und gamma)	Pepro Tech, Hamburg, Deutschland
Kollagenase D	Boehringer Ingelheim
LB Broth Base	Life technologies
MatriGel™	BD Biosciences
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Multiferon	Swedish Orphan, Stockholm, Schweden
Natriumdesoxycholat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Phenol	Roth

2. Material und Methoden

Polybrene®	Merck
2-Propanol	Apotheke Uniklinik
REAL® Peroxidase Blocking Solution (IHC)	DAKO
Salzsäure	Merck
Target retrieval solution (pH6 und pH9)	DAKO
TEMED	Life technologies
Tris	Roth
Tris HEPES Running Buffer	Thermo Fisher Scientific
Tween®-20	Sigma Aldrich
Trypanblau	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA (0,5/0,2%) in PBS (10x)	PAN Biotech
Vectashield with DAPI®	DAKO

2.1.2.4 Enzyme und Reaktionspuffer

Enzym / Puffer	Konzentration	Firma
BioTherm™ DNA Polymerase	5 U/μl	Ares Bioscience, Köln, Deutschland
Ligationspuffer		Fermentas
Puffer Tango (10x)		Fermentas
RNAse A	10 U/μl	Fermentas
Smal	10 U/μl	Fermentas
T4 DNA Ligase	5 U/μl	Fermentas
Taq-Puffer		Ares Bioscience
Xbal	10 U/μl	Fermentas

2.1.2.5 Kits und gebrauchsfertige Materialien

Kit	Firma
5-20 %, 10 % & 12 % Precise protein gels	Thermo Fisher Scientific
Absolute qPCR low ROX mix [®]	Thermo Fisher Scientific
ATP-TCA-Assay-Kit (Sartori Test)	DCS - Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland
CellTiter 96 [®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega, Mannheim, Deutschland
DAKO EnVision [™] -Hrp IHC Kit	DAKO
DuoLink in situ co-IP kit	OLINK Bioscience, Uppsala, Schweden
Lipofectamine 2000 [®]	Life technologies
Nova Red [®] Substrate Kit	Vector Labs, Wertheim, Deutschland
PeqGOLD Total RNA [™] kit	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Pierce [®] BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific
Pierce [®] ECL western blotting substrate	Thermo Fisher Scientific
Qiagen plasmid midi kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick [®] gel extraction kit	Qiagen
Restore [™] plus western blot stripping buffer	Thermo Fisher Scientific
SuperScript [®] II reverse transcriptase	Life technologies
SYBR [®] safe DNA gel stain	Life technologies

2.1.2.6 Größenstandards

Substanz	Firma
Gene Craft [®] 100bp DNA ladder	Ares Bioscience
PageRuler [®] plus prestained protein ladder	Fermentas
Quick-load [®] 1kb DNA ladder	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deu- tschland

2.1.2.7 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
1x Trypsin/EDTA Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 5 ml 10x Trypsin/EDTA Lösung • 45ml PBS
Avertin	<ul style="list-style-type: none"> • 2g 2,2,2-Tribromethanol • 2,5 ml 2-Methyl-2-Butanol • ad 80 ml dH₂O
Blocking-Solution	<ul style="list-style-type: none"> • 5% (m/v) Milchpulver • 0,05% (v/v) Tween 20 • In PBS
Elektrophoresepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 15g Tris • 72g Glycin • 50 ml 10% SDS • ad 1 L dH₂O
FACS Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1% (v/v) FCS • In PBS
Formalin (4%)	<ul style="list-style-type: none"> • 11ml Formaldehyd (37%) • 89ml PBS

2. Material und Methoden

Gewebelysepuffer	<ul style="list-style-type: none">• 10% (v/v) Kollagenase D• 1% (v/v) DNase• In RPMI 1640 ohne Zusätze
Lämmli Puffer (4x)	<ul style="list-style-type: none">• 250 mM Tris/Cl pH 6,8• 8% SDS• 25% Glycerol• 0,02% Bromphenolblau• 8% β-Mercaptoethano
Tris-Acetat Puffer (TAE) (1x)	<ul style="list-style-type: none">• 40 mM Tris-Acetate pH8,0• 1 mM EDTA
RIPA Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none">• 50 mM Tris/HCl pH8• 150 mM NaCl• 1% NP40• 0,5% Natriumdesoxycholat• 0,1% SDS
Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none">• 25 mM Tris• 190 mM Glycin• 20% Methanol
Trypanblaulösung	<ul style="list-style-type: none">• 0,1% (v/v) Trypanblau• 20% (v/v) Ethanol• dH₂O

2.1.2.8 Medien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	<ul style="list-style-type: none">• 20g LB Broth Base• ad 1L ddH₂O

2. Material und Methoden

LB-Agarplatten	<ul style="list-style-type: none">• 1,6% (w/v) Agar in LB-Medium
LB ⁺ -Agarplatten	<ul style="list-style-type: none">• 1,6% (w/v) Agar• 0,01% (w/v) Ampicillin in LB-Medium (Endkonzentration 100mg/ml)
LB ⁺ -Medium	<ul style="list-style-type: none">• 0,01% (w/v) Ampicillin in LB-Medium (Endkonzentration 100mg/ml)
RPMI Kompletmedium	<ul style="list-style-type: none">• 10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)• 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin• in RPMI 1640 (Sigma Aldrich)

2.1.2.9 Bakterienstämme

Bezeichnung	Eigenschaft	Bezugsquelle
Top 10 One Shot [®] <i>E.coli</i>	<ul style="list-style-type: none">• chemisch kompetent	Thermo Fisher Scientific

2.1.2.10 Zellen und Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden mit RPMI Kompletmedium bei 37°C und 5% CO₂ Begasung kultiviert.

2.1.2.10.1 HEK 293-T-Zellen

Bei 293-T-Zellen handelt es sich um eine Variante der Human Embryonic Kidney (HEK) 293-Zellen. Sie exprimieren das große SV40-T-Antigen und wurden von der Firma LGC Standards (Wesel, Deutschland) bezogen. Die Zelllinie ist aus Transfektionsversuchen die von Harald zur Hausen im Jahre 1967 (211) durchgeführt wurden hervorgegangen.

2.1.2.10.2 MCC Zelllinien

Die MCV+ MCC Zelllinien WaGa und BroLi wurde an der Klinik für Dermatologie, Venereologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg etabliert. Sie stammen aus Tumoren von Patienten mit histologisch gesicherter MCC Diagnose. Die MCV+ Linien MKL- 1 und MKL-2 sowie die MCV- Linien UISO, MCC13 und MCC26 sind von anderen Gruppen etabliert und charakterisiert worden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verwendeten MCC-Zelllinien, ihre Eigenschaften so wie ggf. vorhandene Stop-Codon Mutationen im Bereich des LTA bei den MCV+ Linien.

Für den Doxycyclin induzierten T-Antigen knockdown wurden die retroviral transduzierten Linien MKL-1 piH TA tet, MKL-2 piH TA tet and WaGa piH TA tet verwendet. Die Linien wurden in unserem Labor an der Klinik für Dermatologie genetisch verändert und anschließend charakterisiert (77).

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten MCC Zelllinien.

	Alter	Ge- schlecht	Lokalisati- on	Morpholo- gie	Verdopp- lungszeit	MCV	stop codon mutation	CK- 20
MKL-1	26	m	Lymphkno- ten- metastase	Sphäroid	3 Tage	+	Deletion 1612-1657	+
MKL-2	72	m	k.A.	Sphäroid	3 Tage	+	C1453A	-
WaGa	67	m	Aszites	Einzelzell- suspension	4 Tage	+	C1461T	-
BroLi	55	m	Pleurapunk- tat	Sphäroid	5 Tage	+	k.A.	+
MCC13	80	w	Lymphkno- ten- metastase	Adhären- te Zellen	1 Tage	-	-	-
MCC 26	k.A.	k.A.	k.A.	Adhären- te Zellen	1 Tage	-	-	k.A.
UISO	46	w	Primärtumor	Adhären- te Zellen	1.5 Tage	-	-	-

2.1.2.10.3 Melanomzelllinien

Der Großteil der verwendeten Melanomzelllinien wurde an den Kliniken für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg und des Universitätsklinikums Mannheim im Rahmen des routinemäßig durchgeführten Chemosensitivitätsassays etabliert. Die hierfür notwendigen Gewebeproben wurden aus Tumoren von Patienten mit histologisch gesicherter Melanomdiagnose mit deren Einverständnis entnommen. Die weiteren verwendeten Melanomzelllinien können der Tabelle 3 entnommen werden.

Tab. 3: Verwendete Melanomzelllinien.

Bezeichnung	Eigenschaft	Referenz
SkMel28	Human, m, 51 Jahre, <i>BRAF</i> V600E+	(168)
FM88	Human, Geschlecht & Alter unbekannt, <i>BRAF</i> V600E+	(16)
A375	Human, f, 54 Jahre	(65)

2.1.2.10.4 Fibroblasten

Alle verwendeten Fibroblasten wurden an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg gewonnen und etabliert.

2.1.2.11 Plasmidvektoren

Bezeichnung	Beschreibung / Eigenschaften	Bezugsquelle
pKH1	<ul style="list-style-type: none"> Lentiviraler Expressionsvektor shRNA Expressionskassette exprimiert GFP unter der Kontrolle des humanen ubiquitin-C promotors 	Monique Verhaegen (192)
pKH1scr	<ul style="list-style-type: none"> wie pKH1, enthält unspezifische scrambled shRNA 	Roland Houben (78)

pRSV rev	<ul style="list-style-type: none"> • Helferplasmid für lentivirales Vektorsystem • Codiert für <i>rev</i> 	Monique Verhaegen (44)
pHCMV-G	<ul style="list-style-type: none"> • Helferplasmid für lentivirales Vektorsystem • Codiert für HCMV Glycoprotein 	Monique Verhaegen (205)
pMDLg/pRRE	<ul style="list-style-type: none"> • Helferplasmid für lentivirales Vektorsystem • Codiert für <i>gag</i>, <i>pol</i> und das <i>rev responsive element (RRE)</i> 	Monique Verhaegen (44)

2.1.2.12 Primer, Probes und Oligonukleotide

Von der Firma Sigma-Aldrich wurden die synthetisierten und entsalzten PCR-, und Sequenzierprimer sowie die an ihrem 5'-Ende phosphorylierten shRNA- Oligonukleotide bezogen. Die TaqMan[®] Sonden stammen von der Firma Eurogentech (Köln, Deutschland). Am 5' Ende befindet sich Fam, am 3' Ende ein Black Hole Quencher 1. Sonden und Primer wurden mit der Software Primer Express[®] 3 von Applied Biosystems entworfen. Die Target-Sequenzen der shRNA Oligonucleotide wurden der Datenbank des RNAi Konsortiums entnommen und wurden dort ausführlich beschrieben

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
LoxL1_sense	TGCCAGTGGATCGACATAACC	qPCR
LoxL1_anti-sense	CGTTGTTGGTGAAGTCAGACTC	qPCR
Vamp5_sense	CTCCGCAGGCAGAGAAGC	qPCR
Vamp5_anti-sense	CATAATTTCCGTCACCTCGTTCG	qPCR
SCRN1_sense	TGATTGTGGATCGTGATGAAGC	qPCR
SCRN1_anti-sense	CATCTTAGTGGTGAGCGAAAGC	qPCR
SerpinB1_sense	TGCATATGGCTACATCGAGGAC	qPCR
SerpinB1_anti-sense	TCCAAAGTCAACTGTTCCCTCAATC	qPCR
TMSB4X_sense	CGAAACTGAAGAAGACAGAGACG	qPCR
TMSB4X_anti-sense	GCACGCCTCATTACGATTTCG	qPCR
RPLP0_sense	CCATCAGCACCACAGCCTTC	qPCR
RPLP0_anti-sense	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT	qPCR
LoxL1_probe	AACTACATCCTCAAGGTGCACGTGAACCC	qPCR

2. Material und Methoden

Vamp5_probe	TATTCCTGCCATCGCTGCTGCCGC	qPCR
SCRN1_probe	AATGCACCTCACTCCCTCTGTGACTTTCTC	qPCR
SerpinB1_probe	TGCCGTGTGCTGGAACCTGCTTACC	qPCR
TMSB4X_probe	TCCACTGCCTTCCAAAGAAACGATTGAACA	qPCR
RPLP0_probe	ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA	qPCR
KH1-Sequenzierprimer	TGTCGCTATGTGTTCTGGGA	Sequenzierung
SerpinB1 shRNA 284 fw	GTGGAGCGTCTTATATTCTGAATCAAGAGTTCAGAATATAAGAC GCTCCATTTTTTGT	shRNA-Insert
SerpinB1 shRNA 284 rev	CTAGACAAAAAATGGAGCGTCTTATATTCTGAACTCTTGATTCA GAATATAAGACGCTCCAC	shRNA-Insert
SerpinB1 shRNA 1219 fw	GTAGTGCTTTATTACCTGAGTTTAGTGAAGCCACAGATGTAAAC TCAGGTAATAAAGCACTATTTTTTGT	shRNA-Insert
SerpinB1 shRNA 1219 rev	CTAGACAAAAAATAGTGCTTTATTACCTGAGTTTACATCTGTGG CTTCACTAAACTCAGGTAATAAAGCACTAC	shRNA-Insert

2.1.2.13 Antikörper

Name (Clone bzw. Bestellnummer)	Verdünnung (Anwendung)	Hersteller
LTA (CM2B4)	1:1000 (WB) 1:1000 (IHC)	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland
PML (sc-5621)	1:200 (WB) 1:200 (IHC, IF)	Santa Cruz Biotechnologies
SerpinB1 (HPA018871)	1:500 (WB) 1:500 (IHC)	Sigma Aldrich
MART-1/Melan-A (A103)	1:1000 (IHC)	DAKO
Cleaved-Caspase 3 (D-178)	1:2000 (IHC)	New England Biolabs
B-Tubulin (TUB2.1)	1:2500 (WB)	Sigma Aldrich
Anti-mouse/rabbit/goat HRP markierte Sekundärantikörper	1:1000 (WB)	DAKO
HLA-ABC (EMR8-5)	1:100 (IHC)	Abcam, Cambridge, UK
HLA-ABC (w6/32)	1 μ l/5*10 ⁵ Zellen (FACS)	Immunotools, Frisothe, Deutschland

IgG2a Isotyp-Kontrolle 1 μ l/5*10⁵ Zellen (FACS) Immunotools

2.1.2.14 Software

Programm	Hersteller / Homepage
Adobe™ CS® 4	Adobe Systems Inc., Dublin, Ireland
Ape-A Plasmid Editor	M. Wayne Davis
Entrez PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/
Fermentats™ Double Digest®	http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html
FlowJo®	Treestar Inc., Ashland OR, USA
IM®50 Digital Imaging Software	Leica
Microsoft™ Office 2003	Microsoft, Redmond WA, USA
NCBI-Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.html
Prism®	GraphPad Software, San Diego CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und zellbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit den in Abschnitt 3.1.10 beschriebenen Zelllinien gearbeitet. Alle im Folgenden beschriebenen Inkubationsschritte sowie die Kultivierung der Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Zufuhr durchgeführt. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für 5 Minuten und 400 g. Alle Medien wurden auf 37°C erwärmt, bevor sie verwendet wurden.

2.2.1.1 Auftauen von eukaryotischen Zellen

Die in Kryoröhrchen bei -180°C in flüssigem Stickstoff gelagerten, tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zum Waschen in ein 50 ml Blaudeckelröhrchen pipettiert, in das 50 ml auf 37°C vorgewärmtes PBS vorgelegt wurden. Im Anschluss wurde gemischt und abzentrifugiert. Der verbliebene Überstand

wurde verworfen und das Pellet im verbleibenden PBS resuspendiert, dann nochmals mit 5 ml PBS gewaschen, der Überstand verworfen und die Zellen im Rest gelöst. Die Suspension wurde in 12 ml Medium aufgenommen und in eine 200 ml Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Die adhärennten Zellen wurden von der Zellkulturflasche mit 2,5-5 ml Trypsin/EDTA gelöst, die Reaktion mit demselben Volumen Medium angestoppt, alles in ein 15 ml oder 50 ml Blaudeckelröhrchen überführt und dann abzentrifugiert. Sphäroide und Suspensions-Zellen wurden direkt aus den Kulturflaschen entnommen und abzentrifugiert. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrirte mit PBS. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet im Restüberstand resuspendiert und die Suspension dann in 1 ml einer eisgekühlten Lösung aus FCS und 10 % DMSO aufgenommen und in 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden über Nacht im -80°C Kùhlschrank gelagert und dann in den Stickstofftank überführt.

2.2.1.3 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Trypsinisieren der Zellen wurden 5 ml Trypsin/EDTA zugegeben und die Zellkulturflasche für 5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nachdem sich alle Zellen gelöst hatten wurden 5 ml Medium hinzugegeben, verbliebene adhärennte Zellen vom Boden der Flasche abgespùlt und alles gut resuspendiert. Je nach beobachtetem Wachstum und weiterem Verwendungszweck wurden die Zellen, meist im Verhältnis 1:10 gesplittet. Beim Einsatz von 200 ml Flaschen wurden 15-20 ml Medium hinzugegeben und bei 600 ml Flaschen 25-50 ml Medium eingesetzt. Unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen war es notwendig die Zellen etwa alle 3-4 Tage zu passagieren. Sphäroidal wachsende Zellen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1-2 mal pro Woche gesplittet (vgl. Tab. 2) und in einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml weiterkultiviert.

2.2.1.4 Dissoziation von sphäroidal wachsenden Zellen

Die Sphäroide wurden aus der Zellkulturflasche entnommen, in ein 50 ml Blaudeckelröhrchen überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml 0,02 % EDTA Lösung gewaschen und im Anschluss in 3 ml 0,02 % EDTA Lösung aufgenommen und im Brutschrank für 5-10 min inkubiert. Im Anschluss konnten die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren dissoziiert werden. Sie wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und je nach Verwendungszweck in der gewünschten Menge Kulturmedium oder PBS aufgenommen.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch Verwendung von Trypanblau wurden die toten Zellen gefärbt und die lebenden Zellen im Anschluss in den 4 Großquadraten der Kammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Unter Zuhilfenahme der folgenden Formel ließ sich nun die Zelldichte der Ausgangskultur bestimmen:

$$D = \frac{N}{Q} \cdot V \cdot 10^4$$

Mit: D = Zelldichte [Zellen/ml]
N = Anzahl gezählter Zellen
Q = Anzahl ausgezählter Großquadrate
V = Verdünnungsfaktor
 10^4 = Umrechnungsfaktor von Zellen/ μ l auf Zellen/ml

Sphäroide wurden vor der Bestimmung der Zellzahl mit 0,02 % EDTA-Lösung dissoziiert.

2.2.1.6 Transfektion von HEK 293T Zellen mit Lipofectamin 2000 zur Herstellung lentiviraler Vektoren

Lipofectamin besteht aus kationischen Lipiden, die eine hohe Ladungsdichte besitzen und dadurch in der Lage sind, Nukleinsäuren in Vesikeln zu binden. Die Vesikel binden an die Zelloberfläche und werden samt der DNA endosomal in die Zelle aufgenommen.

Zur Transfektion der Zellen sollte nach Möglichkeit ein zu etwa 80 % konfluenter Zellrasen vorliegen. Hierzu wurden die HEK 293T Zellen gezählt und ca. $6,5 \cdot 10^5$ /well in einer 6-well Platte ausgesät. Die Zellen wurden nun über Nacht unter den bekannten

Bedingungen kultiviert und ihr Wachstum am nächsten Tag unter dem Lichtmikroskop überprüft.

Die Transfektion mit Lipofectamin 2000 erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Herstellung lentiviraler Vektoren zur Expression von shRNA-Konstrukten gegen *SerpinB1* und das MCV *LTA* wurde die DNA der einzelnen Plasmide nach folgendem Verhältnis dem erforderlichen DNA-Mix zugegeben:

Plasmid	Relativer DNA-Anteil
pKH1 mit shRNA Expressionskassette	1
pRSV rev	0,25
pHCMV-G	0,35
pMDLg/pRRE	0,65

Der Transfektionsansatz wurde über Nacht inkubiert und das Medium im Anschluss gewechselt. Am darauf folgenden Tag konnten die Zellen für weitere Versuche oder die Ernte der lentiviralen Vektoren verwendet werden.

2.2.1.7 Gewinnung von lentiviralen-Partikeln und Transduktion eukaryotischer Zellen

Durch lentivirale Vektoren ist es möglich, genetisches Material wie z.B. shRNA Expressionskassetten in eukaryotische Zellen einzubringen. Sie haben den Vorteil, dass sie stabil ins Wirtsgenom integrieren und ein breites Anwendungsspektrum bieten, da sie auch Zellen außerhalb der Teilungsphase infizieren.

Zur Herstellung von lentiviralen Partikeln wurden HEK 293T Zellen wie in 2.2.1.6 beschrieben mit den zur Vektorproduktion benötigten Plasmiden transfiziert. Am Tag darauf wurde das Medium der transfizierten Zellen gewechselt und 6 ml frisches Medium hinzugefügt. Am vierten Tag nach der Transfektion konnten die Vektorpartikel geerntet werden. Hierzu wurde der Mediumüberstand aus den wells der 6-well Platte wieder abgenommen, mit einem 0,45 µm Mikrofilter gefiltert und in ein Blaudeckelröhrchen überführt. Zum Vektorüberstand wurde 1 µg/ml Polybrene hinzugefügt. Hierbei handelt es sich um ein kationisches Polymer, das die Transduktionseffizienz verbessert indem es durch Ladung hervorgerufene Wechselwirkungen zwischen dem Vektorcapsid und der Zelloberfläche neutralisiert. Die zu transduzierenden Zellen wurden gewaschen und der Vektorüberstand

unverdünnt auf die Zellen gegeben. Für etwa $7,5 \cdot 10^5$ Zellen wurde 1 ml Überstand verwendet. Adhärente Zellen wurden hierfür am Tag zuvor ausgesät, Sphäroide hingegen vor der Transduktion dissoziiert. Die Transduktion wurde in 6-well Platten durchgeführt. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, da Polybrene nach längerer Inkubationszeit zytotoxische Wirkung auf einige Linien zeigte. Vier Tage nach der Transduktion konnten die Zellen für weitere Analysen und Versuche verwendet werden.

2.2.1.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Analyse von Oberflächenmarkern auf Zellen sowie zur Überprüfung der Transduktionseffizienz wurde die Durchflusszytometrie herangezogen. Zellen können hierbei auf die Häufigkeit eines Ereignisses innerhalb einer Zellpopulation hin untersucht werden. Das Durchflusszytometer detektiert Streulicht bzw. Fluoreszenzimpulse, die von Zellen während ihrer Passage durch einen Laserstrahl emittiert werden. Dieses Streulicht wird durch die Zellgröße, Zellmembranstruktur sowie durch intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Zellen können dadurch in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden. Diesem Zweck dienen als wesentliche Parameter der sogenannte *Forward Scatter* (FSC =Vorwärtsstreulicht) und der *Side Scatter* (SSC = Seitwärtsstreulicht). Der FSC wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und gibt Auskunft über die Zellgröße. Der SSC wird durch die Brechung des Lichts verursacht und dient als Maß für die Granularität einer Zelle. Auch Immissionen von mit fluoreszierenden Markern versehenen Antikörpern, mit denen die Zellen gefärbt wurden, können durch das FACS-Gerät detektiert werden.

Die Auswertung der am Durchflusszytometer durchgeführten Messungen erfolgte mit dem Programm FlowJo.

2.2.1.8.1 Kontrolle der Transfektions- und Transduktionseffizienz

Die erfolgreiche Transfektion und Transduktion wurde überprüft, indem die Zellen auf das fluoreszierende Protein GFP hin untersucht wurden. Dieses wurde von den Vektoren, mit denen die Zellen transfiziert bzw. transduziert wurden, codiert. Zur Kalibrierung des Durchflusszytometers wurden als Negativabgleich Zellen untersucht, die

kein fluoreszierendes Protein enthielten. Zur Analyse wurden $5 \cdot 10^5$ in ein FACS Röhrchen überführt und zum Waschen in 500 μl FACS Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde für 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 100 μl FACS Puffer aufgenommen und analysiert.

2.2.1.8.2 Färbung von MHC-Klasse I Molekülen

MHC Klasse I wurde durch Fluoreszenz detektiert, indem das Molekül mit PE markierten Antikörpern gefärbt wurde. Zum Negativabgleich wurden jeweils ungefärbte und mit einer IgG2a Isotypkontrolle gefärbte Zellen mitgeführt.

Zur Messung wurden adhärenente Zellen trypsinisiert und sphäroide dissoziiert. Etwa $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit 500 μl FACS Puffer gewaschen. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 400 g abzentrifugiert, der Puffer abgekippt und das Pellet in 50 μl FACS Puffer resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde 1 μl des jeweils verwendeten Antikörpers gegeben, kurz gemischt und alles für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde noch zweimal gewaschen und die Zellen zur FACS Analyse in 100 μl FACS Puffer aufgenommen. Zur Identifizierung der lebenden Zellen wurde kurz vor der Messung pro Probe noch 1 μl 7-AAD hinzugefügt.

2.2.1.8.3 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid

Zur Zellzyklusanalyse wurden die Zellen trypsinisiert bzw. dissoziiert, zweimal mit FACS Puffer gewaschen und etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen in 500 μl FACS Puffer aufgenommen und in ein 15 ml Blaudeckelröhrchen überführt. Unter Vortexen wurden dann tropfenweise 5 ml eiskaltes Ethanol (70 %) zugegeben und die Zellen über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde dann eine Mischung aus 1 ml PBS / 1% FCS, 0,05 mg/ml Propidiumjodid (PI) und 0,1 mg/ml RNase A zu den Zellen gegeben und das Ganze für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Analyse erfolgte im Anschluss am FACS Gerät. PI interkaliert in doppelsträngige DNA. Anhand der Färbeintensität kann daher auf den DNA Gehalt in den Zellen geschlossen und diese dadurch in die verschiedenen Zellzyklusphasen ein-

geordnet werden. Auch apoptotische Zellen können durch diese Methode identifiziert werden.

2.2.1.9 MTS Proliferationsassay

MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] ist ein Tetrazoliumsalz, das durch Dehydrogenasen aus stoffwechselaktiven Zellen in Formazan umgesetzt und ins Kulturmedium abgegeben wird. Die Reaktion ist mit einem Farbumschlag verbunden, der am Photometer gemessen werden kann. Die Konzentration an Formazan verhält sich proportional zur Stoffwechselaktivität und durch die Intensität des Farbumschlags kann somit auf die Proliferation, Viabilität und Stoffwechselaktivität der Zellen zurückgeschlossen werden.

Der MTS Assay wurde in einer 96-well Platte nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden für den Versuch jeweils in Triplikaten ausgesät. Die Zellzahl pro well richtete sich nach der Proliferationsrate und Größe der Zellen. Für MCC13 und MCC26 wurden jeweils 1000 Zellen/well, für UISO 3000 Zellen/well, für WaGa 10.000 Zellen/well und für BroLi, MKL-1 sowie MKL-2 jeweils 80.000 Zellen/well ausgesät.

2.2.1.10 Chemosensitivitätsassay und Chemosensitivitätsindex

Der Chemosensitivitätsassay wurde nach Exzision des Primärtumors oder der Metastase innerhalb von 24 h durchgeführt. Hierfür wurde verbliebenes Binde- und Fettgewebe entfernt und ca. 1 cm³ Tumorgewebe für den Assay herangezogen. Das verbleibende Gewebe wurde zur Routinehistologie, Kryokonservierung und RNA Extraktion verwendet. Die Chemosensitivitätstestung wurde mit dem DCS ATP-TCA-Assay-Kit wie bereits mehrfach beschrieben (8, 184, 187) durchgeführt (vgl. auch Abb. 1). Hierfür wurde das zu testende Gewebe enzymatisch dissoziiert und die verbliebene Suspension über eine Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation in Einzellzellen, Blutzellen und Debris aufgetrennt. Die Tumorzellen wurden abpipettiert, in Medium überführt, gezählt und nur bei einer Viabilität von >25% für den Assay verwendet. Anschließend wurden sie in einer 96-well Rundbodenplatte ausgesät und mit Medium sowie mit den zu testenden Chemotherapeutika in 6 unterschiedlichen Konzentrationen versetzt. Hierfür wurden ausgehend von einer Test-Konzentration Lösungen erstellt die 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% und 200% konzentriertes Testreagenz

enthielten. Für jede Konzentration wurde in Triplikaten getestet. Bei den verwendeten Zytostatika handelte es sich um Cisplatin, Doxorubicin, Vinblastin, Paclitaxel, Gemcitabine und Treosulfan. Die Zellen wurden nun für 7 Tage im Brutschrank inkubiert, anschließend lysiert und ihr ATP Gehalt über eine Luciferin-Luciferase-Luminiszenzreaktion am Plattenphotometer bestimmt. Als Referenzwert für 100%ige Viabilität wurde der Wert der Zellen die nur mit Medium inkubiert wurden herangezogen. Der Chemosensitivitätsindex liegt theoretisch zwischen 0 und 600. Er wird durch Aufsummieren des prozentualen Anteils der Zellviabilität über alle getesteten Zytostatikakonzentrationen hinweg gebildet. Ein Chemosensitivitätsindex von 600 zeigt damit eine maximale Zellviabilität und damit keine Chemosensitivität der getesteten Tumorzellen an. Ein Index von 0 hingegen zeigt keine lebenden Zellen und damit ihre maximale Chemosensitivität gegenüber dem getesteten Zytostatikum an. Liegt der Wert bei über 600, so ist es zu einer erhöhten Proliferation unter Behandlung mit dem getesteten Zytostatikum gekommen. Die so bestimmten Chemosensitivitätsindices wurden zur Korrelation mit der Gen- und Proteinexpression der Kandidatenmarker in den Ausgangstumorgewebe verwendet.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von Bakterien auf Nährböden

Bakterien wurden zur Kultivierung auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Zur Herstellung der Agarplatten wurde zu LB-Medium 1,6% Agar hinzugegeben, das ganze gut vermischt und autoklaviert. Zur Herstellung von Platten zur Selektion wurde nach dem Abkühlen des Agarmediums auf 50°C Ampicillin zugegeben, bis eine Endkonzentration von 100 µg/ml erreicht wurde. Die Agaroselösung wurde unter der Sterilwerkbank in sterile Petrischalen aus Polystyrol gegossen bis der Boden vollständig bedeckt war und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Die abgekühlten und erstarrten Platten wurden verschlossen und bis zum Gebrauch bei 4°C im Kältelabor gelagert.

2.2.2.2 Kultivierung von Bakterien in Flüssigkulturen

Zur Durchführung von Plasmidmidipräparationen wurden Bakterien in LB-Medium über Nacht angezüchtet. Für eine Übernachtkultur (ÜNK) wurden 100 ml Medium in Erlenmeyerkolben vorgelegt und mit Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Zum Animpfen der Flüssigkulturen wurde je nach Verwendungszweck und durchgeführter Vorarbeit entweder eine Bakterieneinzelkolonie einer Agarplatte, 1-2 µl Bakteriensuspension einer vorhandenen Flüssigkultur oder Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur verwendet. Die Bakterien wurden in jedem der Fälle mit einer sterilen Pipettenspitze in das Medium überführt. Die Kulturen wurden anschließend über Nacht im Schüttler bei 37°C und 150 bis 250 rpm inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Weiterverarbeitung der Kulturen oder Lagerung bei 4°C im Kühlschrank.

2.2.2.3 Anlegen von Glycerolstocks

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks angelegt. Hierzu wurde 1 ml einer frischen ÜNK zu 200 µl einer autoklavierten Glycerollösung aus gleichen Anteilen Glycerol und LB⁺-Medium gegeben und bei -80°C gelagert.

2.2.2.4 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von DNA in eine Bakterienzelle. Transformiert man chemisch-kompetente Zellen mit zirkulären Plasmidmolekülen, die einen eigenen Replikationsursprung (*origin of replication*) besitzen, ist es möglich, diese DNA zu amplifizieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide codierten alle ein Ampicillinresistenz-Gen, sodass eine Selektion der Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, durch Anreichern des Kulturmediums mit diesem Antibiotikum möglich war.

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli* TOP10 One Shot - Zellen verwendet. Zu 25 µl dieser Zellen wurden 1 µl eines Ligationsansatzes gegeben und die Mischung für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte für 30 sek ein Hitzeschock bei 42°C im Heizblock und weitere 2 min Inkubation auf Eis. Dann wur-

den 250 µl ampicillinfreies LB⁻-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension zur Expression der Resistenzgene für 1 h im Schüttler bei 37°C inkubiert. Danach wurde für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Bakterienpellet im verbliebenen Restmedium resuspendiert. Zur Selektion wurde die Suspension auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und dann über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 *Annealing* von DNA-Oligonukleotiden

Die *SERPINB1* shRNA-Inserts für die vorliegende Arbeit wurden als Oligonukleotide bestellt, die vor der weiteren Verwendung einem *Annealing* (Zusammenlagerung) unterzogen werden mussten. Die Oligonukleotide wurden hierzu auf eine Konzentration von 25 µM eingestellt. Dann wurden 40 µl dH₂O mit 12 µl 0,5 M NaCl-Lösung und je 4 µl *sense strand* und *antisense strand* DNA versetzt und für 2 min auf 80°C erhitzt. Bei diesem Schritt erfolgt die Auflösung der Sekundärstrukturen und die Temperatur muss ggf. an die Schmelztemperatur der Oligonukleotide angepasst werden. Im Anschluss erfolgte das *Annealing* der beiden komplementären Nukleotidstränge indem der komplette Ansatz im abgeschalteten Heizblock langsam auf 27°C heruntergekühlt wird. Das so entstandene doppelsträngige DNA-*Insert* konnte nun durch eine Ligation weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren werden.

2.2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgte durch alkalischen Lyse, die zum Aufbruch der Bakterienwände führte. Durch Zugabe einer natriumhydroxidhaltigen Lösung wurden die Zellen lysiert und Proteine sowie chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Durch die darauffolgende Zugabe von Natrium- bzw. Kaliumacetat kam es zur Präzipitation chromosomaler DNA und anderer zellulären Bestandteile sowie zur Neutralisation des Lysats. In Lösung verbliebene Plasmid-DNA konnte ihre Struktur renaturieren und wurde anschließend selektiv an eine Matrix ge-

bunden. Aus 50 ml ÜNK Bakterienflüssigkulturen konnten mittels einer Midipräparation große Plasmide isoliert werden. Hierzu wurde das „Plasmid purification midiprep kit“ der Firma Qiagen verwendet. Nach alkalischer Lyse erfolgt die Isolation der Plasmid-DNA durch silika-basierte Anionenaustauschchromatographie die eine anschließende Fällung ermöglicht. Die Durchführung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers.

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe eines Photometers konnte durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentration von DNA oder RNA in einer Probe ermittelt werden. Die zu testende Probe wurde im Verhältnis 1:100 mit Wasser verdünnt und in eine UV-Küvette überführt. Zur Ermittlung eines Referenzwertes wurde eine Messung mit dem zur Verdünnung verwendeten Wasser durchgeführt. Die Konzentration der Nukleinsäure wurde vom Photometer automatisch berechnet und in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ausgegeben.

2.2.3.4 Restriktionsverdau des lentiviralen Vektors KH1

Um die shRNA Expressionskassetten in den KH1 Vektor hinein klonieren zu können, wurde dieser mit den Restriktionsendonukleasen SmaI und XbaI hydrolytisch an sequenzspezifischen Stellen doppelverdaut. Für den Restriktionsverdau wurde der nachfolgend aufgeführte Ansatz verwendet.

Menge	Reagenz
5 μg	KH1 Plasmid-DNA
Je 1 μl	Restriktionsenzym
2,0 μl	Restriktionspuffer (10fach)
ad 20,0 μl	H ₂ O

Der Verdau wurde über Nacht unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (s. Fermentas Internetseite Double Digest) im Brutschrank durchgeführt. Durch gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Enzyme inaktiviert und das Fragment isoliert.

2.2.3.5 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur analytischen Gelelektrophorese des verdauten KH1 Vektors wurden 0,7%-tige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden 0,7 g Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wurde „SYBR safe DNA gel stain“ 1:10000 zugegeben, durch leichtes Schwenken in der Lösung verteilt und die Agarose in einen Plexiglasschlitten gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Gelkammer gelegt, diese mit 0,5xTAE-Puffer befüllt bis das Gel knapp mit Puffer bedeckt war und die Kämme entfernt. Die Plasmid-DNA wurden mit 6x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Ein DNA-Ladder wurde zur Abschätzung der Größe des Fragments verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V für 45 min.

2.2.3.6 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zum KH1 Vektor passende Bande wurde unter UV-Licht mit einem vorher abgeflammt Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem „QIAquick gel extraction kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll extrahiert und gereinigt.

2.2.3.7 Ligation

Zur Ligation der shRNA Expressionskassetten in den geschnittenen KH1 Vektor wurde die doppelte Menge an *Insert* im Vergleich zum Vektorplasmid eingesetzt. Folgendes Pipettierschema wurde für einen Ligationsansatz verwendet:

Menge	Reagenz
200 ng	KH1 Vektor (100ng/μl)
1,0 μl	shRNA Insert
1,0 μl	T4-DNA-Ligase (5 u/μl, Fermentas)
1,0 μl	Ligationspuffer (Fermentas)
ad 20,0 μl	H ₂ O

Nach 2 h Inkubationszeit bei RT wurden die Ansätze zum Stoppen der Reaktion auf 65°C im Heizblock erhitzt und im Anschluss zur Transformation eingesetzt.

2.2.3.8 Isolation von RNA aus Gewebe oder Zellen

Zur Isolation von RNA wurden Zellen oder Schnitte von kryokonserviertem Gewebe verwendet. Die Isolation wurde mit dem „PeqGOLD Total RNA kit“ der Firma PEQLab nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zellen wurden hierzu gewaschen, gezählt und etwa $1,5 \cdot 10^6$ Zellen im Lysepuffer des Kits aufgenommen. Bei Gewebe wurden je nach Größe der Probe 25-50 Schnitte von 20 µm Dicke verwendet, in die vorgeschriebene Menge Lysepuffer aufgenommen und durch Vortexen und Auf- und Abpipettieren möglichst dissoziiert. Die Isolation erfolgte auf Eis und die Lagerung der RNA bei -80°C.

2.2.3.9 cDNA Synthese

Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte mit dem „Superscript II reverse transcriptase cDNA Kit“ der Firma Life science. Als Grundlage des Kits dient die reverse Transkriptase des Moloney murinen Leukämievirus. Die Synthese erfolgt nach Angaben des Herstellers im Thermocycler unter Verwendung folgenden Reaktionsmixes:

6,0 µl	Total RNA
1,2 µl	Reverse Transkriptase (200 Units/µl)
1,0 µl	Random Primer (20 ng/µl)
1,0 µl	Oligo (dT) Primer (10 pmol/µl)
1,0 µl	dNTP-Lösung (jede Base 10 mM)
2,0 µl	DTT (100 mM)
4,0 µl	5x First strand buffer
3,8 µl	H ₂ O bidest
20,0 µl	Gesamtvolumen

2.2.3.10 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion kann man *in vitro* schon mit einer geringen Ausgangskonzentration an sogenannter *template* DNA, Sequenzen definierter Länge amplifizieren und diese ggf. in quantitativen Mengen zur Weiterverarbeitung verwenden. Durch den Vergleich mit einem sogenannten *Housekeeping*-Gen ist es aber auch möglich, die relative Expression verschiedener Gene zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde die relative Expression verschiedener Kandidatengene der Chemosensitivität gegenüber dem *Housekeeping*-Gen *RPLP0* mit Hilfe von Taq-Man Sonden bestimmt. Sonden und Primer wurden mit der Software „Primer Express 3“ von Applied Biosystems entworfen. Für GAPDH stand ein fertiger Mastermix derselben Firma zur Verfügung. Die relative Quantifizierung wurde nach der von Livak und Schmittgen beschriebenen $\Delta\Delta Cq$ -Methode (vormals $\Delta\Delta Ct$) durchgeführt. Hierbei wird zuerst der ΔCq -Wert zwischen Ziel- und Housekeeping Gen berechnet:

$$\Delta Cq = Cq \text{ Zielgen} - Cq \text{ Housekeeping Gen}$$

Die Expression des Zielgens wird nun auf eine Referenzprobe bezogen. Im Falle der Kandidatengene war dies eine zuvor ausgewählte Kalibratorprobe.

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ Zielgen} - \Delta Cq \text{ Zielgen Kalibrator}$$

Der Expressionsunterschied (Ratio) zwischen den untersuchten Proben und dem Kalibrator wurde über die folgende Formel berechnet.

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Zur Durchführung der qPCR wurde der „Absolute qPCR low ROX mix“ der Firma Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Grundlage für die qPCR-Reaktion wurden die folgenden Mengen an Reagenzien eingesetzt:

1,0	µl	cDNA template
1,2	µl	Forward primer (5 µM)
1,2	µl	Reverse primer (5 µM)
0,4	µl	Probe (100 nM)
10,0	µl	2x uMM Buffer
6,2	µl	dH ₂ O
20,0	µl	Gesamtvolumen

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, wobei darauf zu achten war, dass die Polymerase immer am Schluss des Ansatzes zuge-

geben wurde. Der komplette Ansatz wurde zur Amplifikation in die Thermocycler gegeben. Für die qPCR wurde folgendes Programm eingestellt:

Zyklen	Schritt	Dauer	Temperatur
1	Aktivierung	15 Minuten	95°C
45	Denaturierung	15 Sekunden	95°C
	Elongation	1 Minute	60°C
1	Kühlung	∞	4°C

2.2.3.11 Sequenzierung von DNA

Durch die Sequenzierung von DNA kann die genaue Nukleotidabfolge des eingesetzten *templates* bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde so die Klonierung von shRNA Expressionskassetten in den KH1 Vektor überprüft. Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden 600-700 ng Plasmid-DNA und 20 pmol Primer auf einem Gesamtvolumen von 7 µl in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt und eingeschickt.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde RIPA-Puffer (Lysepuffer) mit Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:25 vermischt. Die Zellen wurden in ein 15 ml Blaudeckelröhrchen überführt, bei 400 g für 5 min abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden sie im RIPA-Puffer (Lysepuffer) aufgenommen. Für $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden 100 µl Lysepuffer verwendet. Die Mischung wurde gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde alles für 10 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Zelldebris wurde verworfen und das Lysat bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Zelllysats wurde mit dem „Pierce BCA protein assay kit“ der Firma Thermo Fisher Scientific nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Konzentration erfolgte am *ELISA-Reader*.

2.2.4.3 Immunoblotting

Zur Proteindetektion über einen Immunoblot wurden 20 µg des Zelllysats mit 4x Lämmli-Puffer und RIPA-Puffer auf ein Volumen von 20 µl gebracht und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde der „PageRuler plus prestained protein ladder“ verwendet. Das Gel wurde in die SDS-Page Kammer eingespannt und diese mit *SDS running Buffer* gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 100 V für 90 min durchgeführt.

Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierfür wurden das Gel und die Membran in eine *Tank-Blot* Kammer eingesetzt und diese mit Blottingpuffer gefüllt. Der Blot wurde unter Kühlung auf Eis für 50 min bei konstanten 400 mA durchgeführt.

Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 min mit 0,05% Tween-20/PBS gewaschen und dann für 1 h mit 5 %-Milchlösung geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde der Primärantikörper, verdünnt in 5 %-Milchlösung auf den Blot gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der Blot dreimal für 10 min gewaschen und dann mit einem der Spezies entsprechenden und an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h inkubiert. Die jeweiligen Verdünnungen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper können Abschnitt 2.1.2.13 entnommen werden. Die Membran wurde anschließend erneut gewaschen, leicht getrocknet und in die Belichtungskammer überführt. Dort wurde sie mit „Pierce ECL western blotting substrate“ der Firma Thermo Fisher Scientific entsprechend den Herstellerangaben versetzt und die Chemolumineszenz mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert.

Im Anschluss wurde der Blot erneut dreimal gewaschen, die Membran für 15 min in *Stripping Buffer* inkubiert, nochmals gewaschen und entweder eine weitere Analyse durchgeführt oder der Blot zur Archivierung getrocknet.

2.2.5 Histologische Methoden

2.2.5.1 Erstellung von Gewebedünnschnitten

Die kryokonservierten Tumormetastasen wurden zur Anfertigung von Gewebeschnitten zur RNA-Isolation in einen Kryostaten eingespannt. Die Schnittdicke wurde je nach Größe der Gewebeprobe auf 20-40 µm eingestellt. Die Schnitte wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Zur Immunhistochemie wurden Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Tumorgewebe verwendet. Die Verarbeitung dieser Proben und die Herstellung von 3 µm Gewebeschnitten wurden im Rahmen der routinemäßigen Probenverarbeitung der Universitäts-Hautklinik Würzburg durchgeführt.

2.2.5.2 Immunhistologische Färbungen

Zur Entparaffinierung wurden die 3 µm dicken Paraffinschnitte je zweimal für 10 min bei RT mit Xylol, abs. Ethanol und 70% Ethanol gewaschen und zum Abschluss mit bidest. Wasser gespült. Um die Antigene wiederherzustellen wurden die Schnitte mit „DAKO Target Retrieval Solution“ (pH9) für 40 min bei 90°C inkubiert und anschließend zweimal mit bidest. Wasser und einmal mit PBS gewaschen.

Nach einstündiger Inkubation mit „DAKO blocking solution“ bei RT und zwei weiteren wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Die jeweiligen Verdünnungen der verwendeten Antikörper können Abschnitt 3.1.2.13 entnommen werden. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit „DAKO EnVision-HRP“ und dem „Nova Red Substrate Kit“ der Firma Vector Laboratories nach den jeweiligen Angaben des Herstellers. Die Zellkerne wurden mit Hematoxylin für 30-60 sek gefärbt und die Schnitte abschließend mit Wasser und destilliertem Wasser gewaschen und mit „Aquatex“ eingedeckt.

Um die Interaktion zwischen den PML und LTA Proteinen nachweisen zu können wurde das Duolink System der Firma Olink Bioscience verwendet. Die Durchführung der Färbung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Analyse und Dokumen-

tation der Färbungen wurde das DM750 Mikroskop mit ICC50 Digitalkameraaufsatz der Firma Leica verwendet.

2.2.5.3 Immunfluoreszenzfärbung von Cytospins

Zur Durchführung der Immunfluoreszenz wurden die Cytospins für 10 min bei RT mit Aceton fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 10 min mit „DAKO blocking solution“ inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit dem polyclonalen PML Kaninchen Antikörper in der Verdünnung 1:100 und mit Cy3-gelabelten Ziege anti-Kaninchen Antikörper in der Verdünnung 1:200 jeweils für 45 min bei RT gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mit „Vectashield with DAPI“ eingedeckt und am Konvokalmikroskop analysiert und dokumentiert.

2.2.6 Tierexperimentelle Methoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden durch die zuständigen Behörden genehmigt (Regierung von Unterfranken; Tierversuchsantrag Az. 55.2-2531.01-59/06) und unter Einhaltung der vorgeschriebene Gesetze durchgeführt.

2.2.6.1 Induktion der Xenotransplantate

Die Induktion von Tumor-Xenotransplantate erfolgte durch die s.c. Injektion von $1 \cdot 10^6$ Zellen/100 μ l in die laterale Flanke von weiblichen NOD.CB17/*Prkdc*^{scid} Mäusen. Die Zellsuspension war zuvor im Verhältnis 1:1 mit MatriGel Matrix gemischt worden um das Volumen von 100 μ l zu erreichen. Das MatriGel verhindert die Verteilung der Zellen unter der Haut. Nach variabler Inkubationszeit wurde entweder mit der täglichen i.t. Injektion von 10.000 Units Multiferon in 50 μ l PBS oder 100 mg/kg in DMSO gelöstes Artesunat in 50 μ l PBS begonnen. Als Kontrolle diente jeweils das gleiche Volumen der Trägersubstanz.

2.2.6.2 Berechnung des Volumens subkutaner Tumoren

Zur Volumenberechnung wurden die Mäuse aus den Käfigen genommen und die Länge und Höhe der Tumoren mit einer Schieblehre vermessen. Das Tumorumen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$V = \pi/6 * a^2 * b \quad (a: \text{Länge}; b: \text{Höhe})$$

2.2.6.3 Exzision subkutaner Tumoren

Erreichten die Tumoren ein Volumen von etwa 0,5 cm³ wurde der Versuch abgebrochen und die Xenotransplantate entnommen. Die Tiere wurden hierfür durch die i.p. Injektion von 15 µl/g Körpergewicht Avertin anästhesiert und die subkutanen Tumoren operativ entfernt. Fett- und Bindegewebe wurde direkt nach der Entnahme von den Tumoren entfernt und diese in ein 2 mL Kryoröhrchen überführt. Das Gewebe wurde dann direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und später bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren. Gewebe das zur FACS Analyse verwendet werden sollte wurde direkt nach der Entnahme in auf 37°C vorgewärmtes PBS überführt und dann weiterverarbeitet.

2.2.6.4 Gewinnung einer Zellsuspension aus Xenotransplantaten

Zur Gewinnung einer Zellsuspension aus Xenotransplantaten wurde frisches Tumorgewebe in einer Petrischale mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten. Die Stücke wurden dann in 3 ml Gewebelysepuffer aufgenommen, in ein 15 ml Blaudeckelröhrchen überführt und für 2,5 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem Stempel einer 10 ml Spritze vorsichtig durch ein Zellsieb gedrückt und in einem neuen 15 ml Blaudeckelröhrchen in etwa 10 ml RPMI 1640 ohne Zusätze aufgenommen. Die Zellen wurden nun zweimal gewaschen indem sie für 8 min bei 400 g abzentrifugiert und in frischem RPMI 1640 ohne Zusätze aufgenommen wurden. Im Anschluss wurden sie gezählt und für die FACS Analyse vorbereitet.

3. Ergebnisse

3.1 Chemosensitivität beim Melanom

Für eine große Zahl von fernmetastasierten Melanompatienten und für die Mehrheit der Patienten mit *BRAF* Wildtyp im Stadium der Fernmetastasierung, ist eine Chemotherapie zurzeit immer noch das erste Mittel der Wahl. Durch *ex vivo* Chemosensitivitätsbestimmung kann das Ansprechen auf die Behandlung auf die getesteten Zytostatika individuell für jeden Patienten vorhergesagt werden. Dass diese Ergebnisse von klinischer Relevanz sind, konnte bereits in einer Studie beim metastasierten Melanom bestätigt werden (187). In der vorliegenden Arbeit sollten daher Kandidatengene (siehe Tab. 1), die durch eine Microarray-Analyse von chemosensitiven versus chemoresistenten Melanomzelllinien identifiziert wurden, auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, als Biomarker der *ex vivo* Chemosensitivität zu dienen.

3.1.1 Korrelation zwischen der Genexpression der Kandidatenmarker und des *ex vivo* Chemosensitivitätsindex (ICSI)

Die Expression der fünf vorab mittels Microarray identifizierten Gene (s. Tab. 1) sollte in 150 kryokonservierten Tumorgeweben untersucht werden. Bei diesen Geweben handelte es sich um histologisch bestätigte Melanommetastasen, deren Chemosensitivität *ex vivo* quantifiziert worden war. Die Patienten, denen die zu untersuchenden Gewebeproben entnommen worden waren, wurden anschließend anhand des erhaltenen Chemosensitivitätsprofils chemotherapeutisch behandelt und der klinische Verlauf dokumentiert. Von diesen 150 Proben konnte aus 130 Proben RNA von ausreichender Qualität gewonnen werden. 85 Proben stammten von Patienten, die beim Kooperationspartner Prof. Schadendorf an der Universitäts-Hautklinik Mannheim behandelt worden sind, die restlichen 45 wurden an der Universitäts-Hautklinik Würzburg behandelt. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels Real Time PCR in Taqman Technologie, und die bestimmten Expressionsdaten wurden mit den individuellen Chemosensitivitätsindices (ICSI) der im *ex vivo* Chemosensitivitätstest eingesetzten Zytostatika korreliert. Die Chemosensitivitätstestung mittels der ATP-TCA

3. Ergebnisse

Methodik bietet den Vorteil, dass die zu testenden Zytostatika jederzeit individuell ausgewählt und zusammengestellt werden können. Allerdings gibt die Anzahl der aus einer entnommenen Tumorprobe gewonnenen vitalen Tumorzellen eine obere Grenze für die Anzahl der zu testenden Substanzen vor. Entsprechend wurden nicht bei allen Patienten alle zur Verfügung stehenden Substanzen und Kombinationen getestet. Dies führte dazu, dass in den beiden Zentren Mannheim und Würzburg teilweise unterschiedliche Chemotherapeutika getestet wurden, sodass die statistische Auswertung nur für die Kombination von Cisplatin und Paclitaxel über alle Proben hinweg erfolgen konnte. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von SerpinB1 und der Chemosensitivität auf die Einzelsubstanzen Vinblastin und Cisplatin, sowie für alle getesteten platinhaltigen Kombinationstherapien. In der Gesamtkohorte konnte für 128 Melanompatienten eine hochsignifikante Korrelation zwischen der *SERPINB1* Genexpression und dem entsprechenden *ex vivo* gemessenen Chemosensitivitätsindex für Paclitaxel und Cisplatin ($p=0,0045$) nachgewiesen werden. Außerdem für Cisplatin als Einzelsubstanz sowie für die Kombination aus Cisplatin und Gemcitabine und für die Einzelsubstanz Vinblastine (siehe Tabelle 4, Abb. 4). Die Korrelationen mit den anderen vier untersuchten Kandidatengen LoxL1, SCRIN1, Vamp5 und TMSB4X blieben ohne signifikantes Ergebnis (Tab. 4, Abb. 4).

3. Ergebnisse

Tab. 4: Übersicht über die Korrelationen zwischen den einzelnen individuellen Chemosensitivitätsindices (ICSI) und der jeweiligen zugehörigen relativen Quantifizierung (qPCR) der einzelnen Kandidatenmarker.

	LoxL1	SCRN1	Vamp5	SerpinB1	TMSB4X
Cisplatin	Rho=0,07091 p=0,5293 N=81	Rho=0,005103 p=0,9633 N=84	Rho=0,08863 p=0,4227 N=84	Rho=0,2428 p=0,028 N=82	Rho=0,03268 p=0,7679 N=84
Doxorubicin	Rho=0,0455 p=0,6867 N=81	Rho=0,06176 p=0,5768 N=84	Rho=-0,1044 p=0,3446 N=84	Rho=0,2038 p=0,0646 N=82	Rho=-0,1343 p=0,2234 N=84
Vinblastin	Rho=0,0967 p=0,3905 N=81	Rho=0,2090 p=0,0564 N=84	Rho=0,1304 p=0,2372 N=84	Rho=0,2592 p=0,0187 N=82	Rho=0,04733 p=0,6690 N=84
Paclitaxel	Rho=-0,00109 p=0,9923 N=80	Rho=0,03205 p=0,7736 N=83	Rho=0,01132 p=0,9191 N=83	Rho=0,06217 p=0,5790 N=82	Rho=0,06698 p=0,5474 N=83
Gemcitabine	Rho=-0,06385 p=0,5736 N=80	Rho=-0,05821 p=0,6012 N=83	Rho=-0,05049 p=0,6503 N=83	Rho=-0,07568 p=0,5019 N=81	Rho=-0,1715 p=0,1210 N=83
Treosulfan	Rho=0,02013 p=0,8584 N=81	Rho=-0,07447 p=0,5008 N=84	Rho=0,08321 p=0,4517 N=84	Rho=0,09803 p=0,378 N=83	Rho=-0,06059 p=0,5841 N=84
Gemcitabine + Treosulfan	Rho=0,02841 p=0,8031 N=81	Rho=0,01762 p=0,8761 N=84	Rho=0,0727 p=0,5111 N=84	Rho=0,08315 p=0,4548 N=83	Rho=-0,06976 p=0,5283 N=84
Paclitaxel + Cis- platin	Rho=0,07413 p=0,5107 N=81	Rho=0,0456 p=0,6804 N=84	Rho=0,07305 p=0,6804 N=84	Rho=0,2557 p=0,0045 N = 128	Rho=0,1106 p=0,3165 N=84
Paclitaxel + Doxo- rubicin	Rho=0,0545 p=0,6289 N=81	Rho=0,09026 p=0,4142 N=84	Rho=-0,004961 p=0,9643 N=84	Rho=0,1412 p=0,2029 N=83	Rho=0,008378 p=0,9397 N=84
Gemcitabine + Vinblastin	Rho=-0,1289 p=0,2515 N=81	Rho=0,1022 p=0,3551 N=84	Rho=0,01294 p=0,9070 N=84	Rho=0,02291 p=0,8381 N=82	Rho=-0,1729 p=0,1160 N=84
Gemcitabine + Cisplatin	Rho=0,0302 p=0,7882 N=81	Rho=0,1436 p=0,1927 N=84	Rho=0,1085 p=0,3259 N=84	Rho=0,2362 p=0,0326 N=82	Rho=-0,01154 p=0,9170 N=84

3. Ergebnisse

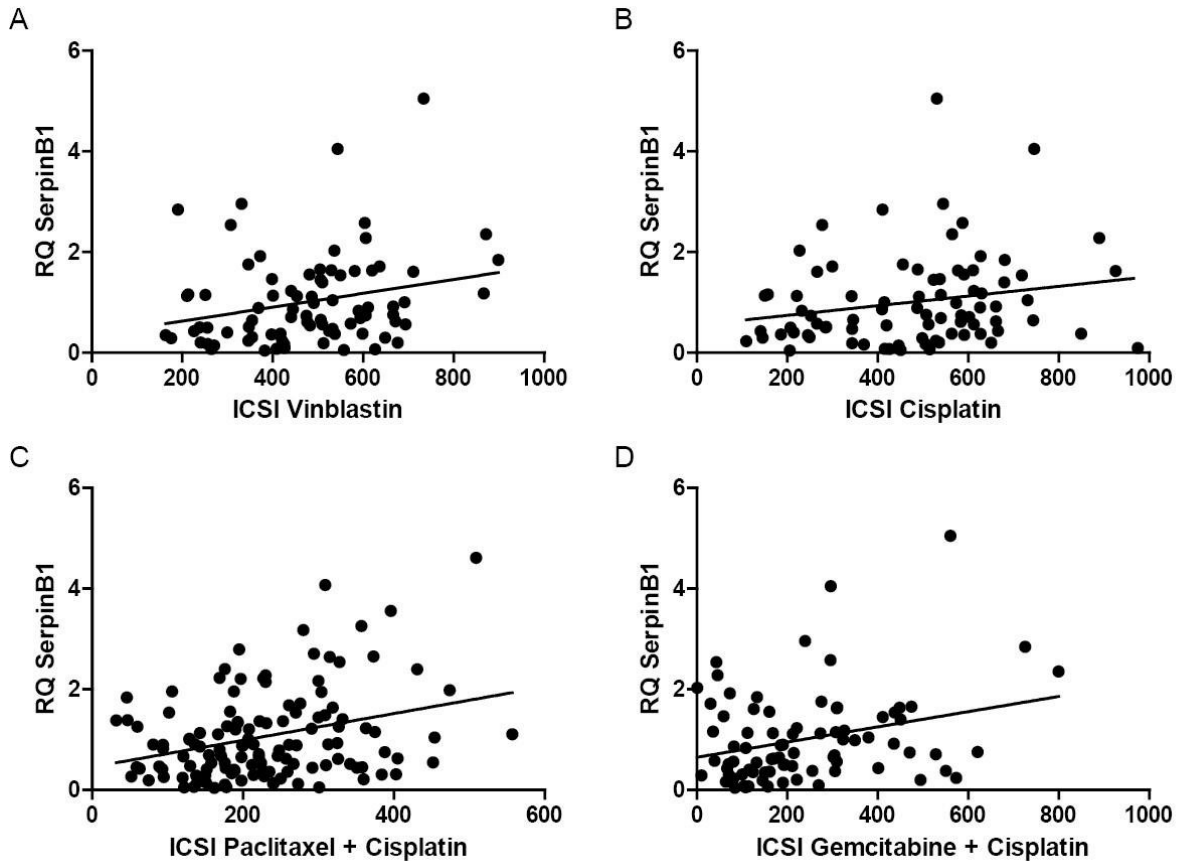


Abb. 4: Signifikante Korrelationen zwischen der relativen Quantifizierung (qPCR) von *SERPINB1* und dem jeweils zugehörigen Chemosensitivitätsindex (ICSI). A, ICSI Vinblastin (Spearman $r = 0,2592$; $p = 0,0187$, $N = 82$), B, ICSI Cisplatin (Spearman $r = 0,2428$; $p = 0,028$, $N = 82$), C, ICSI Paclitaxel und Cisplatin (Spearman $r = 0,2586$; $p = 0,0033$, $N = 128$) und D, ICSI Gemcitabine und Cisplatin (Spearman $r = 0,2362$; $p = 0,0326$, $N = 82$). Die dargestellte Gerade gibt die lineare Ausgleichgerade wieder.

Eine Einteilung der Gewebe in verschiedene Chemosensitivitätsstufen und die anschließende ANOVA-Analyse ergaben signifikante Unterschiede zwischen dem jeweiligen ICSI und der *SERPINB1* Expression (Abb. 5).

3. Ergebnisse

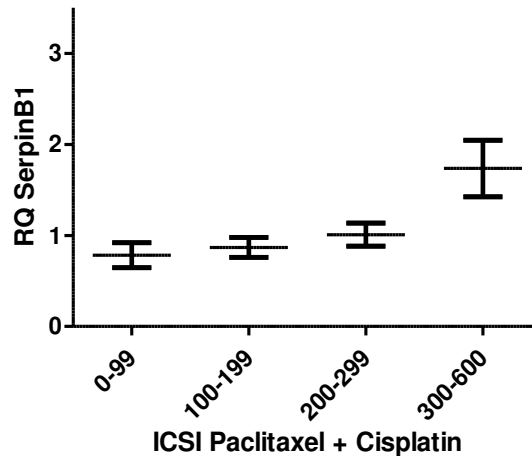


Abb. 5: Korrelationen zwischen der relativen Quantifizierung (qPCR) von *SERPINB1* und dem Chemosensitivitätsindex (ICSI) der Substanzkombination Paclitaxel plus Cisplatin. Werden die 128 getesteten Gewebe in Sensitivitätsgruppen eingeteilt und die zugehörige relative Quantifizierung (RQ) von *SERPINB1* mit einem Kruskal Wallis Test auf Unterschiede hin überprüft, so zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ($H=9,45$; $p= 0,0239$). Die horizontalen Balken geben den Mittelwert an, die Fehlerbalken den jeweils zugehörigen Standardfehler.

3.1.2 Korrelation zwischen der SERPINB1 Expression und dem ICSI der Zytostatika-Kombination Paclitaxel plus Cisplatin

Für die Funktion eines Genes ist letztendlich die Expression auf Proteinebene entscheidend, besonders da das mRNA Expressionslevel nicht zwingend mit der Expression auf Proteinebene korrelieren muss. Immunhistologische Färbungen verschiedener Melanomschnitte zeigen bereits eine differentielle Proteinexpression von SERPINB1 (Abb. 6A&B). Betrachtet man diese allerdings in Zusammenhang mit den zugehörigen ICSI Werten, so zeigt sich schnell, dass eine Korrelation in diesem Falle nicht vorliegt. Geweben mit hoher SERPINB1-Expression können sowohl chemosensitive als auch chemoresistente ICSI-Werte zugeordnet werden (Abb. 6C).

3. Ergebnisse

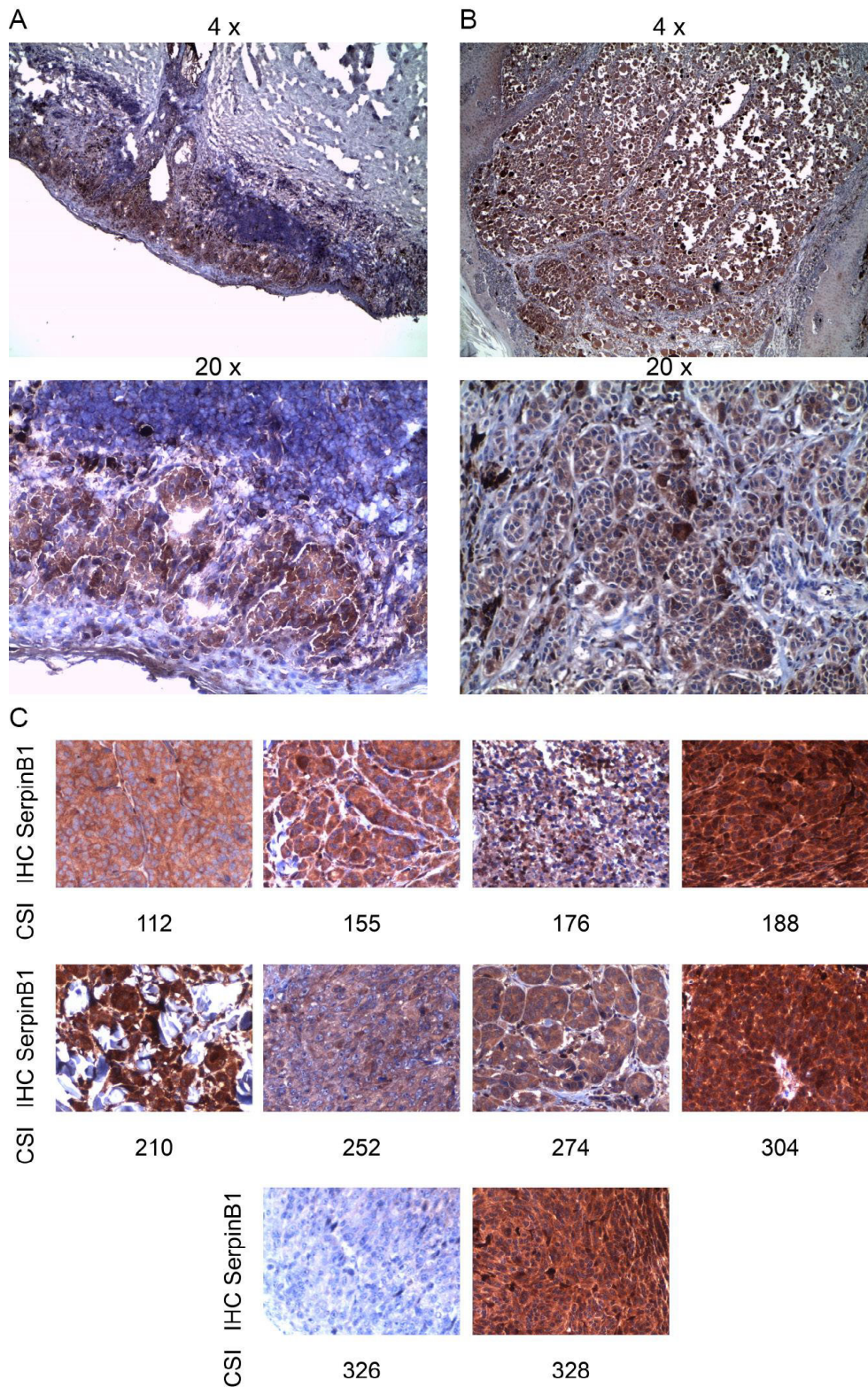


Abb. 6: Differentielle Expression von SerpinB1 auf Proteinebene. A & B, Die immunhistochemische Färbung von SERPINB1 in zwei Melanomschnitten in 20 facher (oben) und 40 facher (unten) Vergrößerung. Die Aufnahmen lassen vermuten, dass SERPINB1 nicht ausschließlich im Tumorgewebe exprimiert wird, sondern auch von umliegenden Zellarten (Bystander-Zellen). C, Betrachtet man gezielt verschiedene für SERPINB1 positiv gefärbte Tumorgewebe, zeigt sich eine heterogene Expression. Eine Zunahme der Expression bei ansteigendem ICSI gegenüber der Behandlung mit Paclitaxel und Cisplatin lässt sich nicht nachweisen.

Die durchgeführten Färbungen deuteten bereits darauf hin, dass SERPINB1 nicht ausschließlich von Tumorzellen exprimiert wird. Dies sollte durch eine Doppelfärbung von SERPINB1 und MART1, welches als Marker für Melanozyten das Melanomgewebe anfärben kann, bestätigt werden. In der Tat zeigen diese Doppelfärbungen, dass SERPINB1 nicht nur im Tumor, sondern auch im Tumorstroma exprimiert wird (Abb. 7). Interessanterweise scheinen auch Unterschiede in der Lokalisation des Proteins zu bestehen: In einigen Zellen scheint SERPINB1 vermehrt im Kern vorzuliegen, andere hingegen zeigen eine deutliche Expression im Zytoplasma der Zellen.

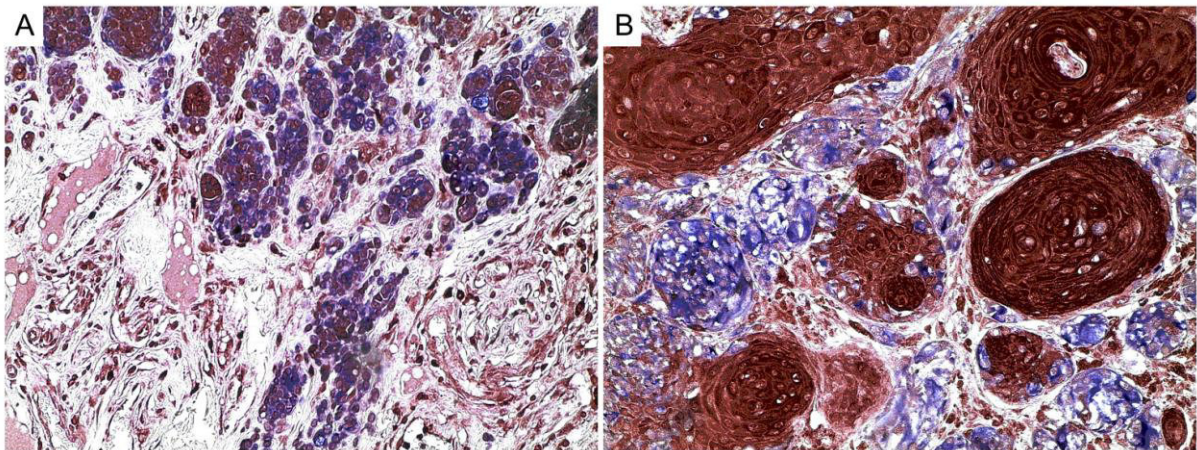


Abb. 7: SERPINB1-Expression in Melanomzellen und im umliegenden Tumorstroma. Doppelfärbungen von SERPINB1 (rot) und MART1 (blau) als Marker für Tumorgewebe in Melanomgewebe. Auf beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass es zu einer deutlichen Expression von SERPINB1 auch außerhalb der Melanomareale kommt. Desweiteren zeigt sich eine stark heterogene Färbung der Melanomareale. Weiterhin ist zu erkennen, dass das Protein innerhalb der Zellen auch im Kern lokalisiert ist.

3.1.3 *In vitro* Korrelation zwischen *SERPINB1* Expression und dem ICSI der Zytostatika-Kombination von Paclitaxel plus Cisplatin

Nachdem *SERPINB1* sowohl von den Tumorzellen als auch vom Tumorstroma exprimiert wird, stellte sich die Frage wie die Expression von *SERPINB1* in den Tumorzellen die Chemosensitivität beeinflusst. Mit Hilfe von 49 Melanomzelllinien, die im Rahmen der durchgeführten Chemosensitivitätstestungen aus den entsprechenden getesteten Metastasen etabliert werden konnten, wurde diese Frage adressiert. Dazu wurde die *SERPINB1* Expression mittels Real Time PCR in den Zelllinien bestimmt und im Anschluss mit den ISCI für die Gewebe, aus denen die Zelllinien generiert wurden, korreliert. In der Tat ergaben sich zu den ISCI für Cisplatin und alle Cisplatin enthaltenden Zytostatikakombinationen wiederum signifikante Korrelationen ($r=-$

3. Ergebnisse

0,3387; $p=0,0173$). Überraschenderweise waren die Ergebnisse aber gegenläufig zu den für die Gewebe beobachteten; so korreliert z.B. niedrigere *SERPINB1* Expression mit erhöhter Chemosensitivität gegenüber Paclitaxel und Cisplatin (Abb. 8A). Die Einteilung der Zellen in Chemosensitivitätsstufen und die anschließende ANOVA-Analyse bestätigen die Beobachtung, wenn auch nur in einem annähernd grenzsignifikanten Bereich ($p= 0,0833$; Abb. 8B). Für 23 der getesteten Zelllinien waren auch die Sensitivitätsdaten der Gewebe bekannt, aus denen diese gewonnen wurden. Trägt man nun diese Daten gegen die Expressionsdaten im gleichen Diagramm gegeneinander auf und zieht durch jede Population die Ausgleichsgerade, so zeigt sich deutlich, dass der Trend gegensätzlich verläuft (Abb. 8C). Für die Gewebe ist die Tendenz sogar bereits signifikant ($r=0,6067$; $p=0,0021$). Um diesen Befund weiter zu validieren und zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen Chemosensitivität und dem Expressionsniveau besteht, wurden 5 Zelllinien über einen Zeitraum von 6 Wochen mit sukzessiv ansteigender Konzentration an Cisplatin kultiviert, um chemoresistente Linien zu generieren. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der *SERPINB1* mRNA Expression durch Taq-Man-Analyse. In vier der fünf Zelllinien zeigte sich eine Reduktion der *SERPINB1* mRNA Expression durch die Kultivierung mit Cisplatin (Abb. 8D).

3. Ergebnisse

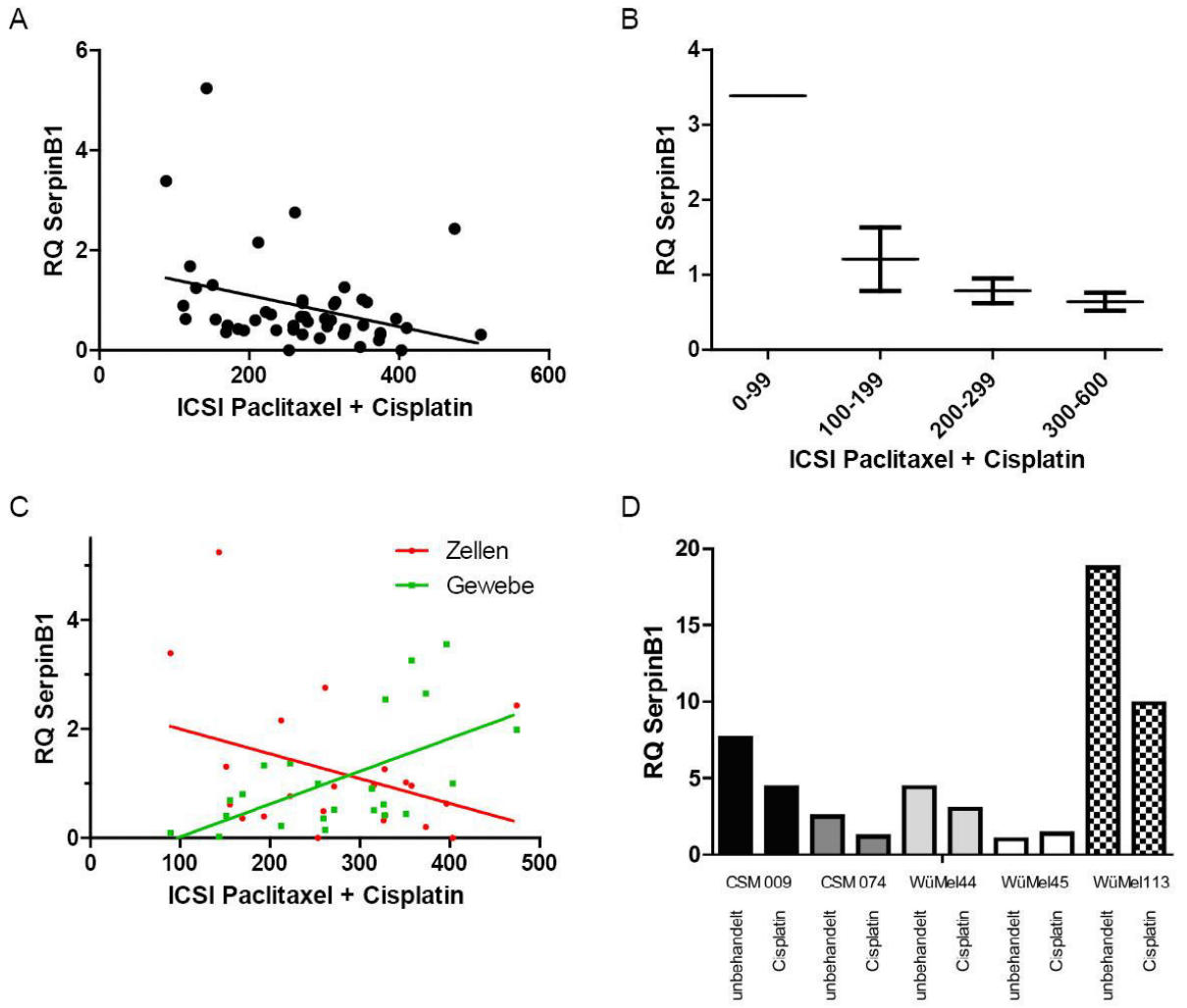


Abb. 8: Korrelation der Expression von *SERPINB1* mit dem ICSI von Paclitaxel und Cisplatin in primären Melanomzelllinien. A, Die Korrelation von *SERPINB1* in Zelllinien und dem jeweils zugehörigen ICSI verläuft negativ und damit konträr zu den im Gewebe erhaltenen Ergebnissen. Die Korrelation zwischen beiden Faktoren ist signifikant (N=49; Spearman $r=-0,3387$; $p=0,0173$). B, Bei Einteilung der 49 Zelllinien in Sensitivitätsgruppen und der Überprüfung der zugehörigen relativen Quantifizierung von *SERPINB1* mit einem Kruskal Wallis Test, so ergibt sich ein grenzsignifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen den einzelnen Gruppen (N=49; $H=6,668$; $p=0,0833$). Die horizontalen Balken geben den Mittelwert an, die Fehlerbalken den jeweils zugehörigen Standardfehler. C, Trägt man die relative Quantifizierung der *SERPINB1* Expression in den Geweben gegen die der aus den Geweben gewonnenen Zelllinien auf und zieht durch beide Gruppen eine Ausgleichsgerade, so verlaufen diese Geraden gegenläufig. Dieser Trend ist für die Expression im Gewebe (in grün dargestellt) bereits signifikant (N=23; $r=0,6067$; $p=0,0021$). D, Nach der sechswöchigen Kultivierung von Melanomzelllinien mit Cisplatin (die Konzentration wurde dabei kontinuierlich von $1\mu\text{M}$ auf $10\mu\text{M}$ erhöht) wiesen vier von fünf behandelten Zelllinien im Vergleich mit unbehandelten Zellen derselben Linie eine geringere Expression von *SERPINB1* auf.

3.1.4 Knockdown von *SERPINB1* in Melanomzelllinien

Um zu überprüfen, ob *SERPINB1* einen Einfluss auf die Chemosensitivität von Melanomzelllinien hat, wurden lentivirale Vektoren mit einer shRNA Expressionskassette gegen *SERPINB1* kloniert. Die shRNA Konstrukte integrieren stabil in das Genom

der mit ihnen behandelten Zelle. Zur Transduktion wurden die drei etablierte Zelllinien, A375, FM88 und SkMel28 verwendet. Der Immunoblot zeigte in allen drei Linien einen deutlichen *knockdown* von SERPINB1 (s. Abb. 9).

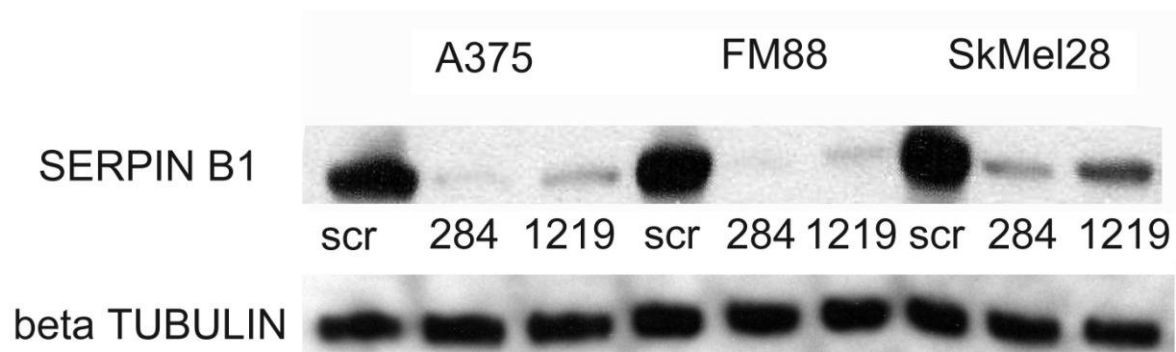


Abb. 9: Knockdown von SERPINB1 in drei Melanomzelllinien. Durch den Einsatz von lentiviralen Vektoren die eine Expressionskassette für eine SERPINB1 shRNA enthielten, konnte in drei Melanomzelllinien erfolgreich ein *knockdown* des Proteins herbeigeführt werden. Verwendet wurden shRNA Konstrukte, die an Position 284 und 1219 des Gens angriffen. Als Kontrolle wurde eine scrambled (scr) shRNA mitgeführt, die gegen kein Target im menschlichen Genom gerichtet war.

Im Anschluss sollten MTS-Assays mit den *knockdown*-Linien durchgeführt werden. Nach einigen Tagen kam es jedoch in eben diesen Linien zu einem Wachstumsstopp und anschließender Apoptose. Dies konnte unabhängig vom shRNA Konstrukt in mehreren Versuchen wiederholt beobachtet werden. Somit war der Einfluss des *knockdowns* auf die Chemosensitivität nicht bestimmbar.

3.1.5 Korrelation zwischen *SERPINB1* Expression und Überlebenszeit

Als Nächstes wurde untersucht, ob die *SERPINB1* Expression als prognostischer Marker für die Überlebensdauer von Patienten mit Melanom im Stadium IV herangezogen werden kann. Dazu wurde die gesamte Kohorte in 2 Gruppen anhand des relativen medianen *SERPINB1* mRNA Gehaltes als „*cut off*“ unterteilt, und die Überlebenskurven mittels Kaplan-Meier-Methode erstellt. Diese Unterteilung ergab über das gesamte Patientenkollektiv keinen signifikanten Unterschied für das Gesamtüberleben (Abb. 10A; Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test: $p=0,35$). Bei der Analyse derjenigen Subpopulation von Patienten aus der Gesamtkohorte, die nach der Testung mit einer Platin-basierten Chemotherapie behandelt wurden, zeigte die Patientengruppe mit erhöhter *SERPINB1*-Expression ein deutlich verbessertes Überleben (Abb. 10B; Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test: $p=0,0166$).

3. Ergebnisse

Bezieht man die LDH und S100B-Konzentrationen als prognostische Serummarker des metastasierten Melanoms über die Gesamtkohorte mit ein, so ergibt sich erwartungsgemäß eine verbesserte Überlebenschance für Patienten mit geringer LDH (Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test: $p=0,022$), bzw S100 Konzentration (Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test: $p=0,0032$). Eine Korrelation zwischen LDH oder S100B und dem *SERPINB1* Gehalt lag allerdings nicht vor.

3. Ergebnisse

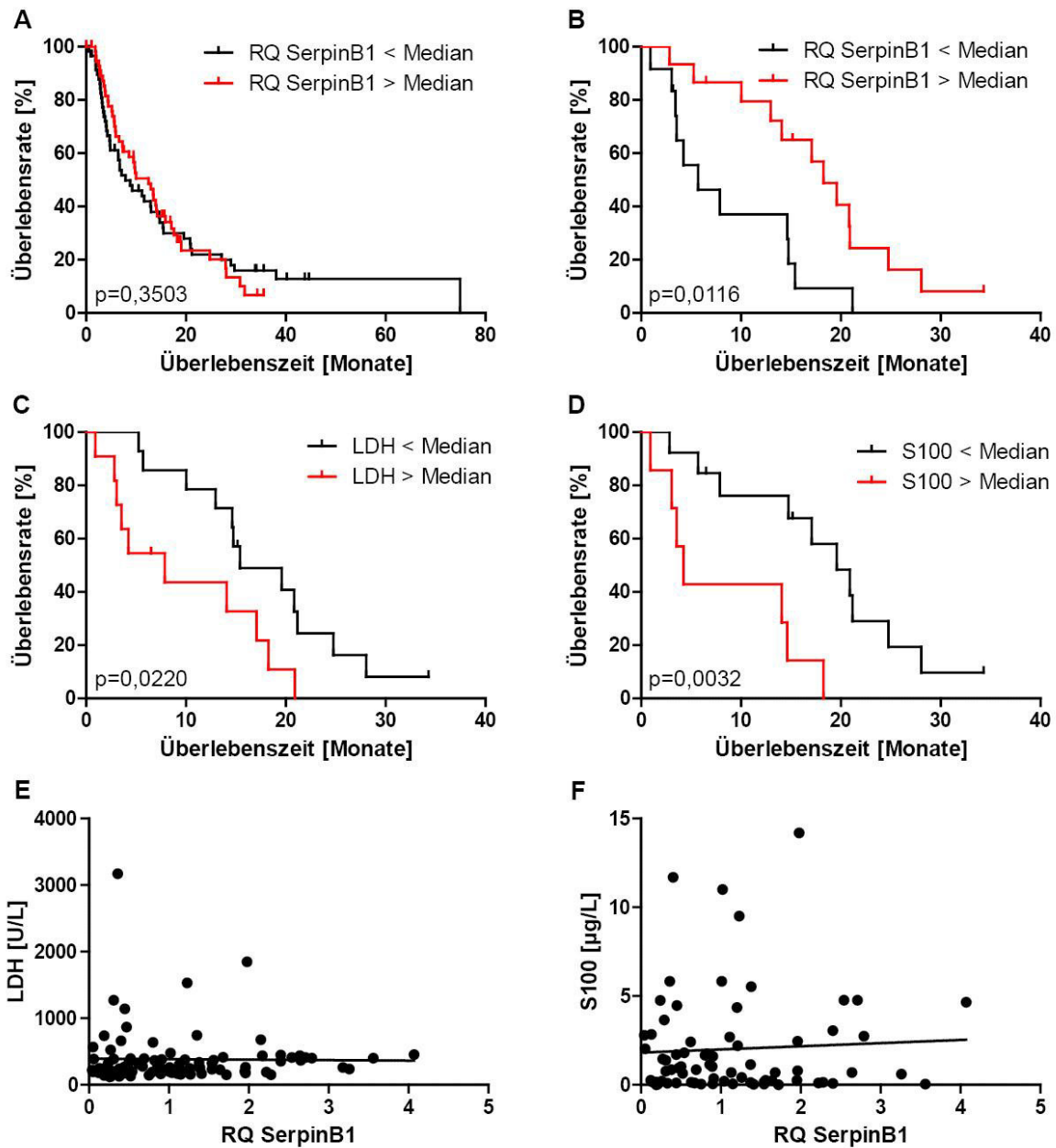


Abb. 10: Kaplan-Meier-Kurven zum Zusammenhang der Überlebenswahrscheinlichkeit mit dem SerpinB1, LDH und S100 Gehalt und Korrelation zwischen LDH und S100 Gehalt mit der *SERPINB1* Expression. A, Eine durchschnittlich höhere Expression an *SERPINB1* hat keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben ab Stadium IV innerhalb der Gesamtkohorte bei den untersuchten Patienten ($p=0,3503$). B, In der Untergruppe der Patienten, die mit Platin basierender Chemotherapie behandelt wurden, weisen die Patienten mit erhöhter *SERPINB1* Expression ein verbessertes Überleben auf ($p=0,0166$). C, Für einen geringeren LDH Wert ergibt sich über die Kohorte der mit Platin behandelten Patienten eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0,0220$). D, Ebenso ergibt sich für Patienten mit geringem S100 Wert eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0,0032$). Dargestellt sind jeweils die Kaplan-Meier-Kurven für die Gruppen, deren Wert kleiner bzw. größer/gleich dem Median der gestesteten Gesamtgruppe ist. Die senkrechten Striche geben den Zeitpunkt eines Zensurereignisses an. E-F, Eine Korrelation zwischen LDH ($r=0,145$; $p=0,1713$) und S100 ($r=-0,0209$; $p=0,8618$) Gehalt mit der *SERPINB1* Expression liegt nicht vor. Die dargestellte Gerade gibt die lineare Ausgleichsgerade wieder.

3.2 Merkelzellkarzinom

Im zweiten Teil der Arbeit wurden mögliche Therapieoptionen für das Merkelzellkarzinom untersucht. Bisherige Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass das MCV direkt an Entwicklung und Pathogenese der meisten MCC beteiligt ist. Daher wurden die Effekte von Typ I und Typ II Interferonen sowie Artemisinin und dessen Derivat Artesunate auf das MCC *in vitro* und präklinisch untersucht, nachdem die antikanzerogenen und antiviralen Eigenschaften dieser Substanzen bereits mehrfach für andere Entitäten beschrieben wurden.

3.2.1 Interferon

3.2.1.1 Interferon inhibiert die Proliferation und Viabilität von MCV+ und MCV-MCC Zelllinien

Als Erstes wurde der Einfluss von Multiferon ((MFN), eine Mischung aus 5 verschiedenen IFN α Subtypen), IFN β und IFN γ auf die Proliferation, den Metabolismus und die Viabilität von 4 MCV+ und 3 MCV- MCC Zelllinien hin untersucht. Die Ergebnisse zeigten sehr deutlich, dass zum einen die MCV+ MCC Zelllinien wesentlich sensitiver auf die Behandlung mit IFN hin reagierten (Wilcoxon-Test: $p=0,0039$) und zum anderen, dass der Effekt von Typ I IFNs auf alle Zelllinien wesentlich stärker war (Wilcoxon-Test: $p=0,0313$) als der von IFN γ ($p=0,25$) (Abb. 11). In der Tat konnte die stärkste Inhibition in MCV+ Zelllinien nach MFN oder IFN β Behandlung beobachtet werden. Der Einfluss von IFN γ war generell eher schwach und unabhängig vom Virusstatus der Zellen (Wilcoxon-Test: $p=0,25$). Interessanterweise zeigten zwei der MCV- Linien (MCC13 und MCC26) keinerlei Sensitivität gegenüber der Behandlung mit IFN.

3. Ergebnisse

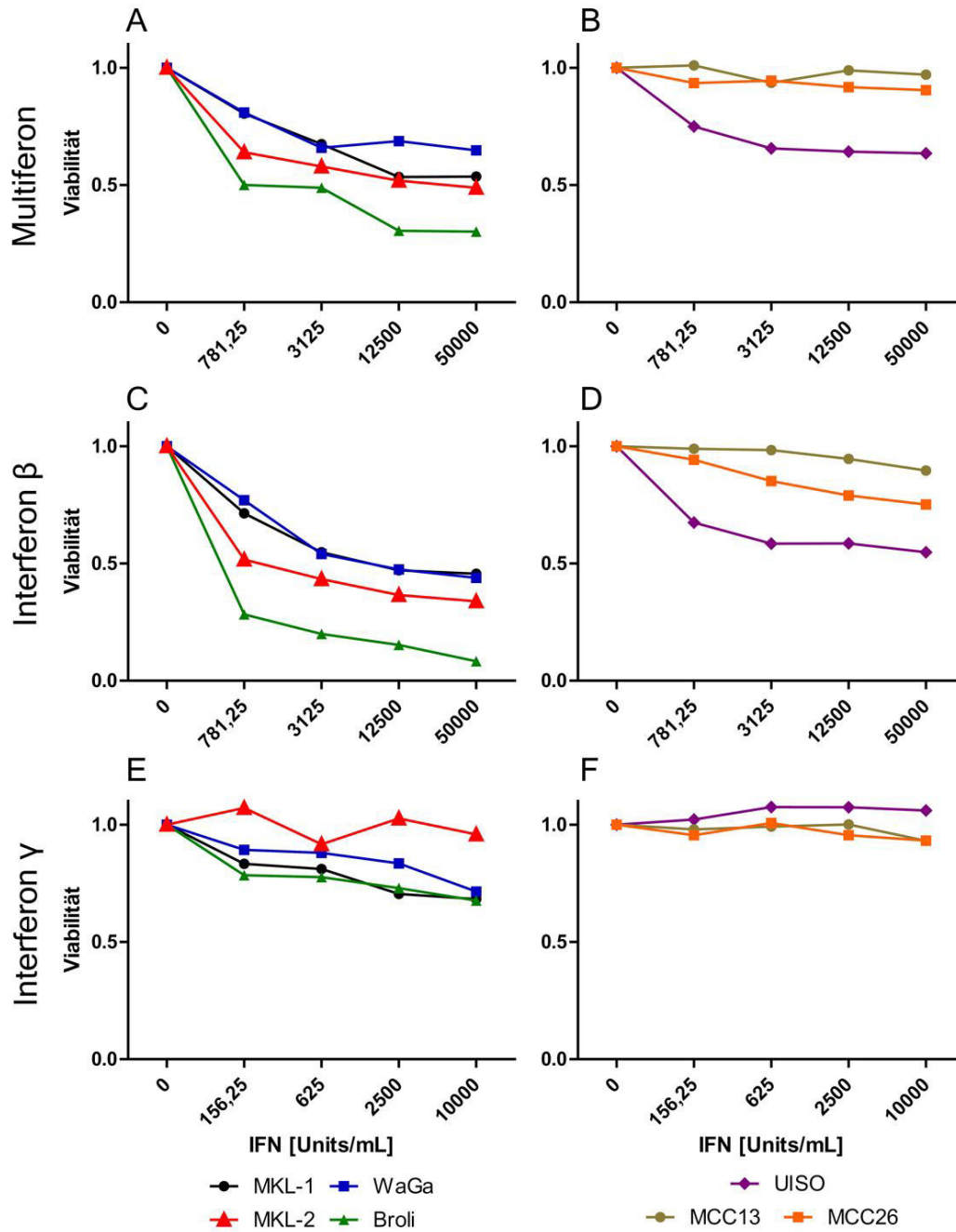


Abb. 11: Typ I und Typ II IFNs zeigen einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Proliferation von MCC Zelllinien.

Um den Effekt von IFNs auf die verschiedenen MCC Zelllinien zu untersuchen, wurde der MTS Proliferationsassay verwendet. Dargestellt ist die relative metabolische Aktivität MCV+ (A, C, E) und MCV- (B, D, F) MCC Zelllinien bei unterschiedlich starken Konzentrationen von MFN (A, B), IFN β (C, D) und IFN γ (E, F) im Verhältnis zu normalem Nährmedium. MFN und IFN β zeigen den stärksten antiproliferativen Effekt auf die MCV+ MCC Zelllinien MKL-1 (schwarze Linie), MKL-2 (rote Linie), WaGa (blaue Linie) und BroLi (grüne Linie). IFN γ zeigt einen kaum ausgeprägten Effekt auf die Proliferation der MCV+ Zellen. Für die MCV- MCC Zelllinien kann ein Effekt nur für UISO (violette Linie) unter Behandlung mit MFN und IFN β gezeigt werden. MCC13 (braune Linie) und MCC26 (orangene Linie) scheinen generell resistent gegenüber IFN zu sein.

Um zu klären, worauf der Mechanismus des inhibitorischen Effekts von IFN auf die MCC Zelllinien beruht und um mögliche Unterschiede zwischen MCV+ und MCV-

3. Ergebnisse

Linien herauszuarbeiten, wurde für alle sieben untersuchten Zelllinien eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Verglichen wurde dabei der Einfluss der verschiedenen IFNs zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle (Abb. 12). Diese Analysen ergaben, dass in fast allen Zelllinien, die eine eingeschränkte Viabilität auf die Behandlung mit Typ I IFNs hin gezeigt hatten, vor allem eine Erhöhung der Anzahl der Zellen in der subG0 Phase zu beobachten war. Dies deutet auf Apoptose als wichtigen Mechanismus für den inhibitorischen Effekt von Typ I IFN hin. Eine Ausnahme bildete jedoch die MCV+ Zelllinie MKL-1; hier konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen bezüglich der Frequenz an subG0 festgestellt werden. Für die MCV+ Linie BroLi ist außerdem zu beachten, dass auch die Kontrollgruppe bereits eine erhöhte subG0 Population aufwies. Für IFN γ hingegen konnte mit Ausnahme von MCC 26 keinerlei Einfluss auf den Zellzyklus für die getesteten Linien nachgewiesen werden.

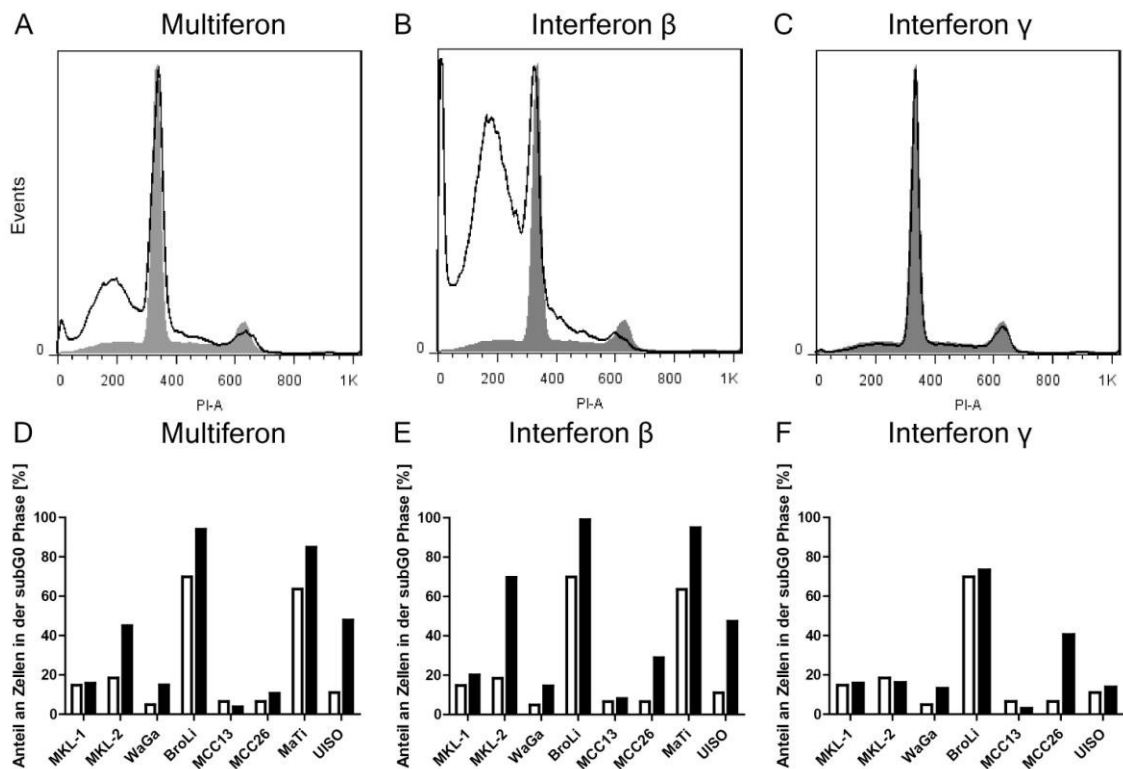


Abb. 12: Typ I IFNs induzieren Apoptose in MCC Zelllinien. A-C, zeigt die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse durch Propidium-Iodide Färbung nach sieben Tagen Inkubation mit MFN (A), IFN β (B) oder IFN γ (C). Die dargestellten Histogramme zeigen die jeweilige Kontrollgruppe (grau schattiert) im Vergleich mit dem jeweiligen IFN (schwarze Linie). D-F zeigt die prozentuale Verteilung der Zellen in der subG0 Phase nach Behandlung mit MFN (D), IFN β (E) oder IFN γ (F) (schwarze Balken) im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollzellen (weiße Balken).

3.2.1.2 IFN Behandlung führt zur verringerter LTA und verstärkter PML Expression in MCC Zelllinien.

In vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die andauernde LTA Expression des MCV notwendig ist, um die Viabilität von MCV+ MCC Zelllinien zu erhalten (77, 78). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit durch den Einsatz genetisch veränderter MKL-1, MKL-2 und WaGa Zellen bestätigt werden. Unter Behandlung mit Doxycyclin exprimieren diese Zellen eine shRNA gegen die T-Antigene des MCV und erzeugen so einen *knockdown*. Nach 5 Tagen zeigte sich in den Doxycyclin behandelten Zellen eine deutliche Reduktion in der Viabilität im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (Wilcoxon Test: $p=0,031$; Abb. 13).

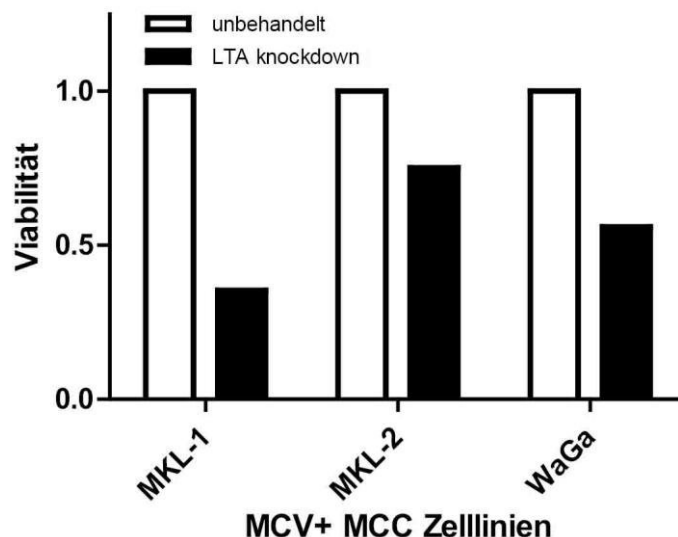


Abb. 13: Der *knockdown* der viralen T-Antigene führt zu einer verminderten Viabilität in MCV+ MCC Zelllinien. Fünf Tage nach der Doxycyclin induzierten Expression einer shRNA gegen die T-Antigene des MCV, konnte in den MCV+ Zelllinien MKL-1, MKL-2 und WaGa im MTS-Assay eine verminderte Viabilität im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen ohne *knockdown* festgestellt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Beobachtung, dass IFN die Aktivität von T-Antigenen anderer Polyomaviren beeinflussen kann (2, 36), wurde als Nächstes überprüft, ob die verminderte Viabilität nach Einsatz von IFN durch eine verringerte Expression von LTA herbeigeführt wurde. In der Tat zeigten Immunoblot Ergebnisse eine deutliche Reduktion in der LTA Expression nach Behandlung mit Typ I IFN für alle getesteten Linien, mit dem stärksten Effekt nach Einsatz von MFN (Abb. 14). Für IFN γ zeigten sich nur Auswirkungen auf die Zelllinie WaGa.

3. Ergebnisse

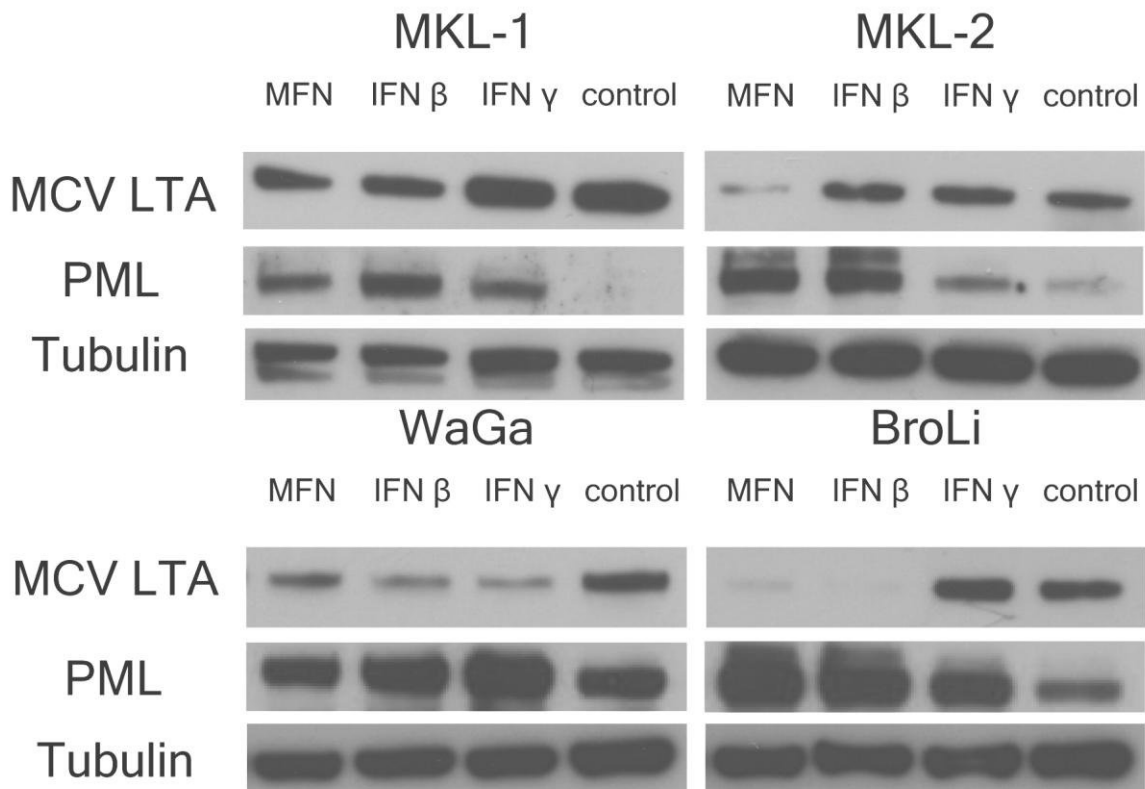


Abb. 14: Die Behandlung von MCV+ MCC Zelllinien mit IFN beeinflusst die Expression des MCV LTA und des PML Proteins. Nach siebentägiger Inkubation mit 50.000 Units/mL MFN und IFN β sowie 10.000 Units/mL IFN γ wurde Zelllysat aus den MCV+ MCC Linien gewonnen und per Western Blot auf die Expression von MCV LTA hin überprüft. Für alle Linien konnte dabei eine Reduktion in der Expression beobachtet werden, besonders nach dem Einsatz von Typ I IFN. Ebenfalls konnte in drei der Linien eine Induktion der Expression von PML beobachtet werden. Als Ladekontrolle diente β-Tubulin.

Neben der direkten Interaktion von IFN mit viralen Onkogenen, sind aber auch eine Reihe weiterer Proteine, die mit viralen Onkogenen interagieren können und v.a. von Typ I IFN beeinflusst werden, beschrieben. Eines hiervon ist PML, dessen Zusammenhang mit einer verminderten LTA Aktivität anderer Polyomaviren bereits nachgewiesen werden konnte. Im Immunoblot konnten wir zeigen, dass die PML Expression nach Behandlung anstieg. Nur für die Zelllinie WaGa schien dieser Effekt nicht ganz so stark ausgeprägt zu sein (Abb. 14). Eine Immunfluoreszenzfärbung von PML in dieser Zelllinie zeigte jedoch auch hier eine deutliche Steigerung nach Behandlung mit MFN (Abb. 15) in Form einer Zunahme an den sogenannten PML *nuclear bodies*.

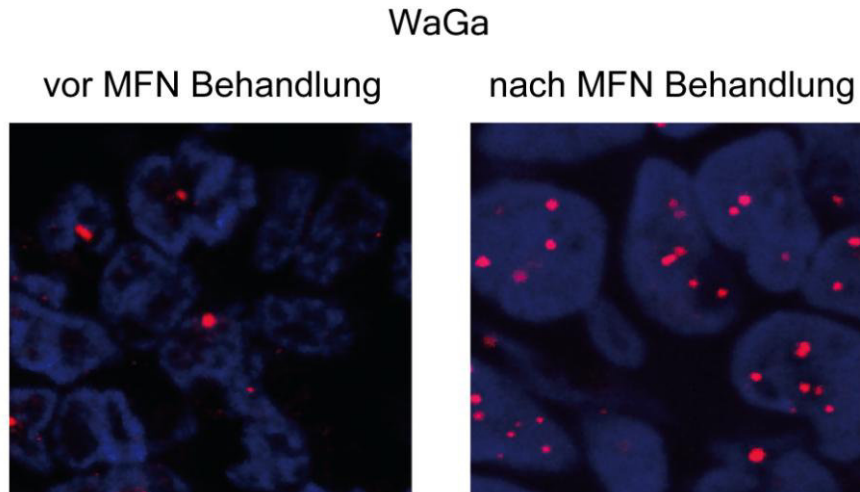


Abb. 15: Multiferon führt zu erhöhter PML Expression in WaGa Zellen. Nach Behandlung mit 3500 Units/ml Multiferon zeigen die WaGa Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung eine Erhöhung der Expression von PML in Form sich bildender PML nuclear bodies.

3.2.1.3 Wirksamkeit von Multiferon *in vivo*

Nach den positiven *in vitro* Ergebnissen sollte der Effekt von IFN im präklinischen Modell überprüft werden. Dazu wurden in der Arbeitsgruppe etablierte Xenotransplantationsmodelle für die MCV+ WaGa und MCV- UISO Zelllinien herangezogen. Zehn Tage nach Injektion der Zellen wurde mit der Behandlung begonnen, d.h. tägliche intratumorale Gabe von MFN oder PBS für die Kontrolltiere. Die Ergebnisse zeigten für die MCV+ WaGa Xenotransplantate eine Abnahme des Tumorwachstums in der behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied ist für die Tage 20 und 23 statistisch signifikant (ungepaarter t-test: $p=0,0004$ und $p<0,0001$). Für die MCV- UISO Xenotransplantate zeigte sich dagegen ein stetiges Tumorwachstum unabhängig von der applizierten Substanz (Abb. 16).

3. Ergebnisse

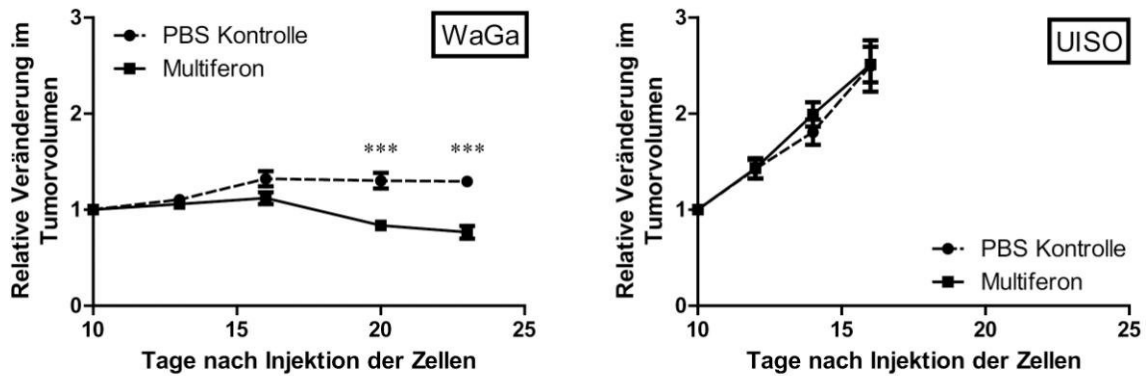


Abb. 16: Die Behandlung von MCC Xenotransplantaten mit MFN führte zu einem verminderten Wachstum von MCV+ WaGa Tumoren, nicht aber für MCV- UIISO Tumoren. Die Behandlung von MCV+ WaGa Xenotransplantate mit MFN (n=6) führte zu einem reduzierten Tumorwachstum im Vergleich zur PBS behandelten Kontrollgruppe (n=6). Diese Unterschiede sind statistisch signifikant für Tag 20 und 23 des Versuchszeitraums (ungepaarter T-Test $p=0,0004$ nach Tag 20 und $p<0,0001$ nach Tag 23). Im Vergleich dazu konnte in MCV- UIISO Xenotransplantaten (beide Gruppen n=6) kein antitumoraler Effekt von MFN nachgewiesen werden (ungepaarter T-Test; $p=0,9638$).

Nachdem der *in vitro* Effekt von MFN teilweise auf Apoptose zurückzuführen war, wurde der *in vivo* Effekt diesbezüglich analysiert, indem Paraffinschnitte des Tumors auf die Anwesenheit von *cleaved caspase 3* als Marker für Apoptose gefärbt wurden. In Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen zeigte sich dabei eine erhöhte Expression von *cleaved caspase 3* in den MFN behandelten Tumoren (Abb. 17A). Der beobachtete apoptotische Effekt von MFN auf die MCV+ WaGa Tumoren könnte durch eine Interaktion von PML und LTA vermittelt werden. Um dies zu überprüfen wurde das Duolink System verwendet. Bei dieser speziellen Färbetechnik resultiert nur dann ein Signal, wenn sich die beiden zu untersuchenden Proteine in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (167). In der Tat konnte mit dieser Methode in den MCV+ WaGa Xenotransplantaten eine Ko-Lokalisation von PML und LTA nachgewiesen werden, die in erster Linie im Bereich des Zellkerns auftrat (Abb. 17B). Als Kontrolle dienten MCV- UIISO Xenotransplantate, in denen aufgrund des fehlenden LTAs kein Signal beobachtet werden konnte.

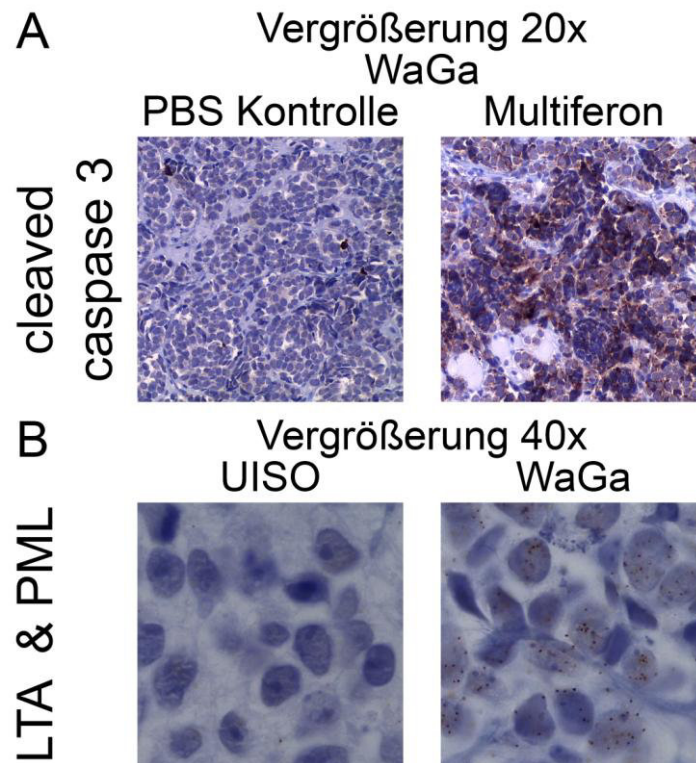


Abb. 17: MFN induziert in MCV+ WaGa Xenotransplantaten eine erhöhte Expression von *cleaved caspase 3* und eine Ko-Lokalisation von PML und LTA. A, In MCV+ WaGa Xenotransplantaten konnte nach intratumoraler Injektion von MFN eine erhöhte Expression von *cleaved caspase 3* im Vergleich zur mit PBS behandelten Kontrollgruppe gezeigt werden. B, Unabhängig vom MFN Behandlungsstatus konnte mit der Duolink Technologie durch den Einsatz von Antikörper gegen PML und LTA eine Ko-Lokalisation beider Proteine in MCV+ WaGa Xenotransplantaten nachgewiesen werden. Eine solche Interaktion fehlte in den MCV- UIISO Xenotransplantaten, da hier kein LTA vorlag.

3.2.1.4 Indirekte therapeutische Effekte von IFN auf MCV+ und MCV- Zelllinien

Neben einem direkten Effekt auf Tumorzellen besitzen IFNs auch immunmodulatorische Effekte. So ist von ihnen bekannt, dass sie die Expression von MHC-Klasse I Molekülen auf Zellen induzieren oder erhöhen können und somit die Immunogenität von Tumoren steigern können. Um zu überprüfen, ob ein solcher Effekt, der sich therapeutisch nur indirekt durch eine gesteigerte Zerstörung des Tumors durch die Immunantwort zeigen würde, bei MCC Zelllinien zu finden ist, wurde die MHC I Expression durchflusszytometrisch vor und nach Behandlung mit Typ I und II Interferonen analysiert.

Die MCV+ Linien MKL-1, WaGa und BroLi waren unbehandelt negativ für MHC Klasse I Moleküle, zeigten aber eine Induktion nach Behandlung mit Typ I als auch Typ II IFN. MKL-2 zeigte bereits unbehandelt eine leichte Expression, die durch den Einsatz von Typ I IFN nochmals gesteigert werden konnte. Interessanterweise führte der

3. Ergebnisse

Einsatz von IFN γ hier zu einer Reduktion von MHC Klasse I Molekülen. Bei allen MCV- Linien konnte bereits im unbehandelten Zustand eine Expression von MHC Klasse I nachgewiesen werden, am stärksten für MCC26. Eine Behandlung mit Typ I und Typ II IFN führte nochmals zu einer Erhöhung für MCC13 und UIISO, aber nicht für die bereits stark positiven MCC26 Zellen (Abb. 18). Insgesamt zeigt sich ein eindeutiger und homogener Effekt für die MCV+ im Vergleich zu den MCV- MCC Zelllinien.

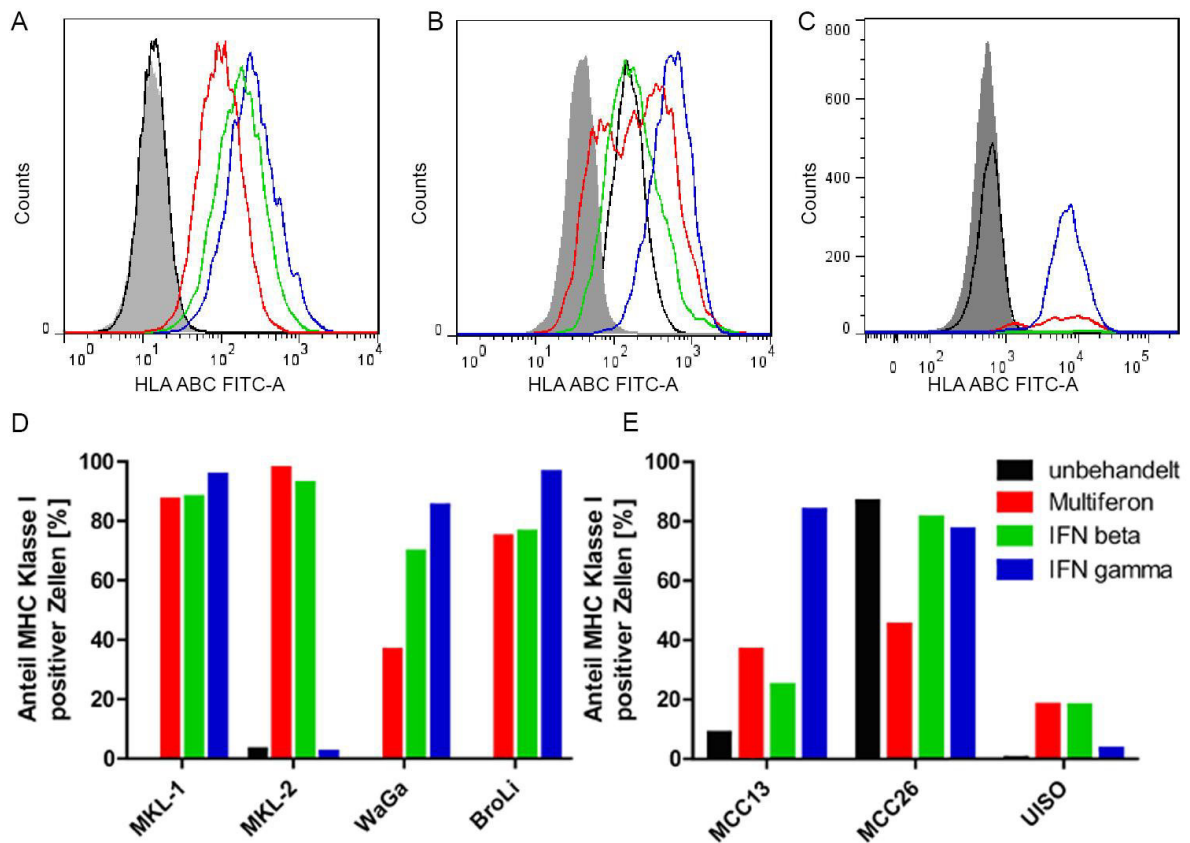


Abb. 18: Induktion und Erhöhung der MHC Klasse I Expression in MCC Zelllinien nach siebentägiger Behandlung mit IFN. A-C: Änderungen in der MHC Klasse I Expression in drei MCC Zelllinien nach Behandlung mit Multiferon (rot), IFN β (grün) und IFN γ (blau) im Vergleich mit unbehandelten Zellen (schwarz) und der jeweils zugehörigen Isotypkontrolle (grau schattiert). MHC I negative WaGa Zellen (A) zeigten eine Induktion nach Behandlung mit IFN mit dem stärksten Effekt für IFN γ . MCC13 (B) war bereits positiv, der Einsatz von IFN führte allerdings zu einer Erhöhung von MHC Klasse I Molekülen. Die BroLi Zellen (C) waren zu Beginn ebenfalls negative und zeigen wie WaGa eine Induktion der Expression nach IFN Behandlung. Auf dem Histogramm kann weiterhin nochmals der Einfluss von IFN auf die Viabilität der Zellen deutlich nachvollzogen werden. D-E: Überblick über den Anteil MHC Klasse I positiver Zellen der MCV+ (D) und MCV- (E) MCC Zelllinien. Abgebildet sind jeweils die unbehandelten Zellen (schwarze Balken) und nach siebentägiger Inkubation mit MFN (rote Balken), IFN β (grüne Balken) und IFN γ (blaue Balken). Der Effekt von IFN auf Induktion und Erhöhung von MHC I war größer für die MCV+ als die MCV- Linien, die durchwegs auch unbehandelt bereits positiv waren.

3. Ergebnisse

Aufgrund des fehlenden Immunsystems in dem Xenotransplantationsmodell kann zwar kein möglicher klinischer Effekt bestimmt werden, aber zumindest überprüft werden, ob es auch *in vivo* zu einer gesteigerten MHC Klasse I Expression kommt. Dazu wurden die Tumoren der Xenotransplantationsmodelle für WaGa und UISO immunhistochemisch auf die Expression von MHC Klasse I untersucht. Zusätzlich wurden Zellen aus frischem Tumormaterial isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Verglichen wurden jeweils die mit MFN behandelten Tumoren mit der PBS Kontrolle. Weiterhin standen Paraffinschnitte von Xenotransplantationsmodellen aus MKL-1 und MKL-2 (N=2 pro Gruppe) zur Verfügung. Hier wurde 28 Tage nach Injektion der Zellen über eine Woche hinweg täglich MFN intratumoral injiziert. Für WaGa lässt sich sowohl in der FACS Färbung als auch in der IHC eine deutliche Steigerung der MHC I Expression feststellen. Bei UISO hingegen zeigte nur die FACS Auswertung eine leichte Erhöhung (Abb. 19A), die IHC hingegen wies keine Unterschiede auf (Abb. 19B). Das Xenotransplantat von MKL-1 zeigte eine deutliche Induktion der MHC I Expression, während MKL-2 bereits unbehandelt positiv war, auf IFN Einfluss hin aber eine klare Steigerung aufwies (Abb. 19C).

3. Ergebnisse

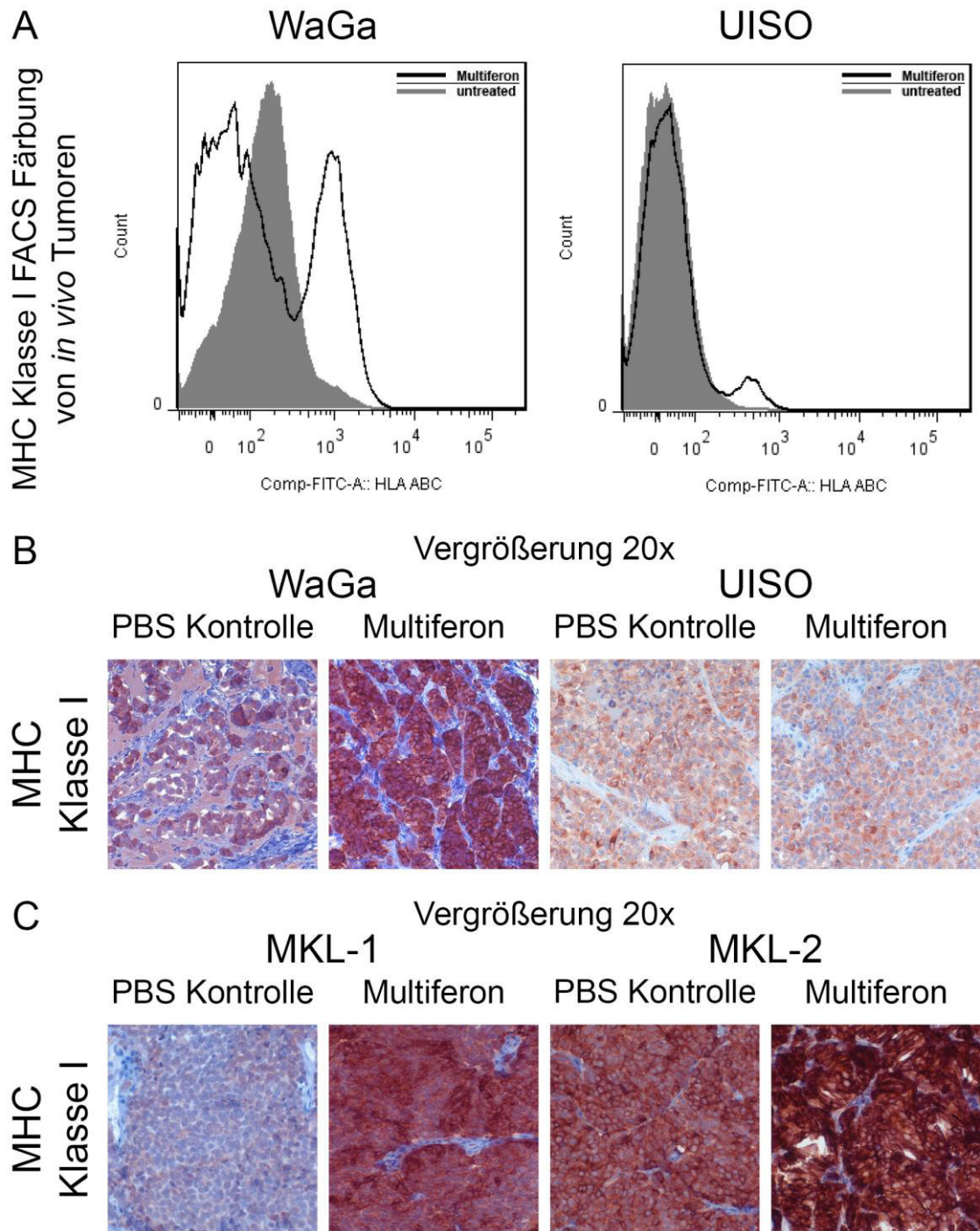


Abb. 19: Induktion und Erhöhung der MHC Klasse I Expression in MCC Xenotransplantaten nach Behandlung mit MFN.

A, Nach Exzision des Tumors wurden die Zellen der Xenotransplantate vereinzelt und mit einem HLA-ABC-FITC Antikörper gefärbt. Für das WaGa Transplantat zeigten die MFN behandelten Zellen (schwarze Linie) einen deutlichen Anstieg an MHC Klasse I Positivität, während die unbehandelten (grau schattiert) konstant blieben. Die behandelten UIISO Tumoren wiesen lediglich ein leichtes Hintergrundsignal in der behandelten Gruppe auf. B, Auch die IHC zeigte für WaGa eine klare Erhöhung an MHC Klasse I Expression, während UIISO annähernd unverändert blieb. C, Mit MFN behandelte Xenotransplantate von MKL-1 und MKL-2 wurden ebenfalls immunhistochemisch auf MHC Klasse I hin gefärbt. Hier zeigte sich für MKL-1 eine klare Induktion nach der Behandlung, während es bei den bereits stark positiven MKL-2 Transplantaten nochmals zu einer Steigerung der Expression kam.

3.2.2 Artemisinine

3.2.2.1 Artesunate, nicht aber Artemisinin hemmt die Proliferation von MCC Zelllinien *in vitro*.

Zu Beginn der Experimente wurden Artemisinin und sein halbsynthetisches Derivat Artesunate auf ihre antiproliferativen Eigenschaften in jeweils drei MCV+ und MCV- MCC Zelllinien hin untersucht. Die gewählten Konzentrationen lagen zwischen 0 und 100 μM . Dabei zeigte sich ein stärkerer inhibitorischer Effekt von Artesunate als von Artemisinin; bereits bei Konzentrationen um 10 μM ergab sich eine deutlich verminderte Viabilität bei Anwendung des Derivates. Artemisinin blieb hier weitestgehend ohne Effekt. Die größere Sensitivität der MCV+ Linien impliziert zudem einen virus-spezifischen Effekt (s. Abb. 20).

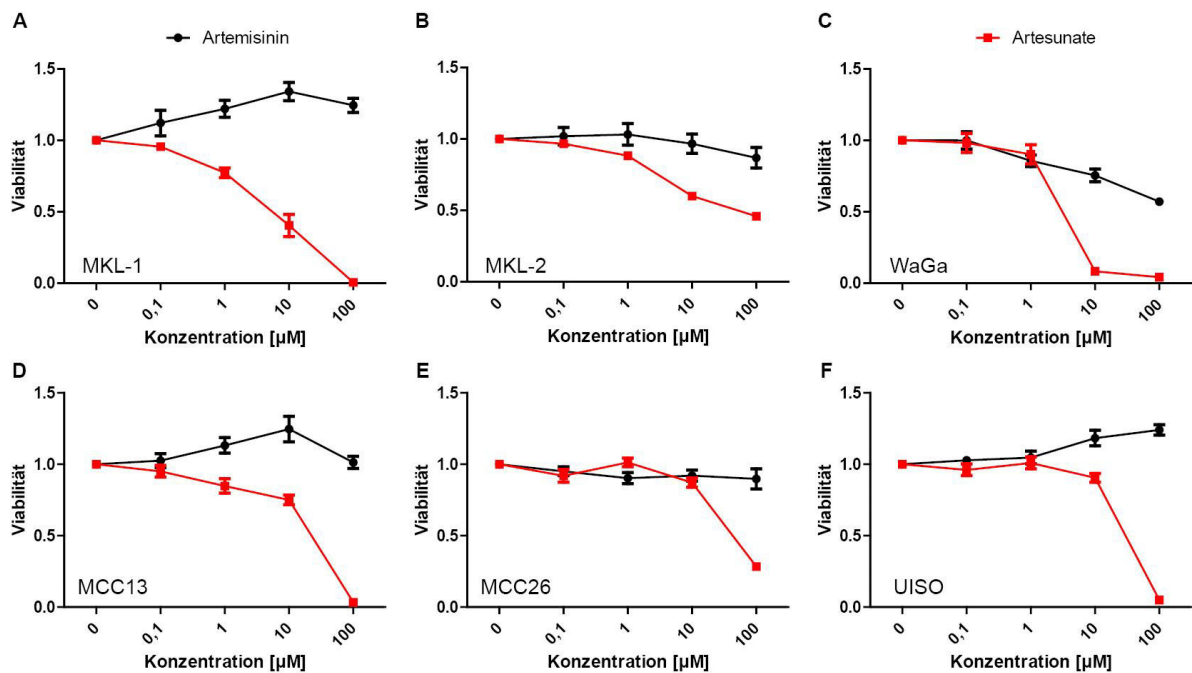


Abb. 20: Artesunate hat einen stärkeren Einfluss auf die Viabilität von MCC Zelllinien als Artemisinin. Zur Untersuchung des Effektes wurde der MTS-Proliferationsassay verwendet. Abgebildet ist die Abnahme der Viabilität von drei MCV+ (A-C) bzw. MCV- (D-F) MCC Zelllinien über einen Konzentrationsgradienten von 0 bis 100 μM für Artemisinin (schwarze Linie) und Artesunate (rote Linie). Die MCV+ Zelllinien MKL-1 (A), MKL-2 (B) und WaGa (C) reagierten deutlich sensibler auf Artesunate als auf Artemisinin. Bei MKL-1 kam es sogar unter Artemisinin Behandlung zu weiterem Zellwachstum. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die MCV- Linien MCC13 (D), MCC26 (E) und UIISO (F), hier zeigte aber auch Artesunate erst bei höheren Konzentrationen einen deutlichen antiproliferativen Effekt.

3. Ergebnisse

Aufgrund der Ergebnisse diesen initialen Screens sowie der Beobachtung, dass eine Artesunate Konzentration von 10 μM bereits erfolgreich gegenüber anderen DNA-Viren angewendet wurden (50, 87), wurde die Viabilität bei Konzentrationen von 1 und 10 μM für ein großes MCC Zellpanel mittels des MTS-Proliferationsassays bestimmt. Als Kontrolle dienten die jeweiligen unbehandelten Zelllinien.

Für die MCV+ Linien MKL-1 ($p < 0,0001$), MKL-2 ($p = 0,0003$) und WaGa ($p < 0,0001$) ergab die One-way-Anova-Analyse statistisch signifikant unterschiedliche Ergebnisse über alle drei getesteten Konzentrationen hinweg. Für BroLi konnte dies nicht beobachtet werden. In der MCV- Gruppe konnten nur MCC13 ($p = 0,0005$) und MCC26 ($p < 0,0001$) signifikante Unterschiede aufweisen (s. Abb.: 21). Diese lagen dabei zwischen unbehandelt und 10 μM bzw. 1 und 10 μM . Lediglich für MKL-1 unterschieden sich alle Konzentrationen auch im Einzelvergleich signifikant voneinander (Bonferoni's-Multiple-Comparison-Test; s. Tab. 5). Generell reagierten auch hier die MCV+ Linien sensibler auf Artesunate als die MCV- Linien, was sich in einer statistischen Signifikanz bei der 10 μM Konzentration widerspiegelt (Mann-Whitney-Test, $p = 0,0051$).

Neben den MCC Zelllinien wurden im Verlauf der Versuchsreihe auch Melanomzelllinien und Fibroblasten auf Ihre Reaktivität gegenüber Artesunate hin getestet. Hier fanden sich allerdings keine Unterschiede zwischen den behandelten und der unbehandelten Kontrollgruppe. Lediglich die Melanomlinie UACC257 zeigte geringe, jedoch statistisch nicht signifikante Sensitivität.

3. Ergebnisse

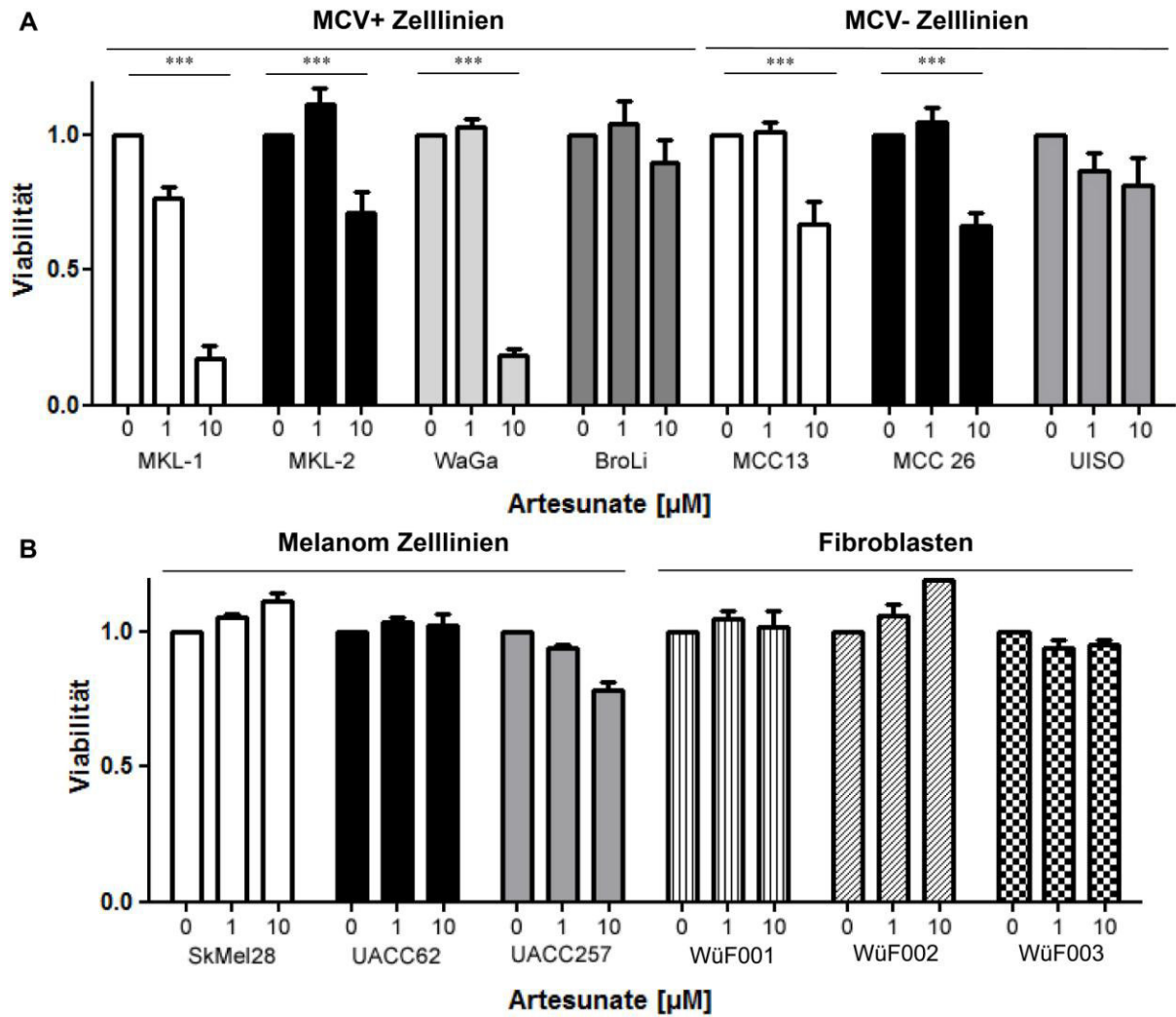


Abb. 21: MCC Zelllinien, nicht aber Melanomlinien und Fibroblasten reagieren sensitiv auf die Behandlung mit Artesunate. Abgebildet ist die Viabilität der jeweiligen Linien unter Behandlung mit 1 oder 10 μM Artesunate relativ zur unbehandelten Kontrolle. Zur Messung wurde der MTS-Proliferationsassay verwendet. A: MCC Zelllinien reagierten sensitiv auf Konzentrationen von 10 μM Artesunate und die One-Way-Anova-Analyse ergab statistisch hochsignifikante Unterschiede (***, $p < 0,0005$) für die Linien MKL-1, MKL-2, WaGa, MCC13 und MCC26. B: Für Melanomzelllinien und Fibroblasten zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede.

3. Ergebnisse

Tab. 5: Übersicht über die One-Way-Anova Statistik der MCC-Zelllinien unter Artesunat Behandlung und Einzelvergleich durch Bonferroni's Multiple Comparison Test. Vgl. Abb. 21; Signifikanzlevel ***: $p < 0,0001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$

	One-way-Anova			Bonferroni's Multiple Comparison Test		
	<i>F-Wert</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Signifikanz Level</i>	<i>0 μM vs 1 μM</i>	<i>0 μM vs 10 μM</i>	<i>1 μM vs 10 μM</i>
MKL-1	132	<0,0001	***	**	***	***
MKL-2	14,3	0,0003	***	ns	**	***
WaGa	470	<0,0001	***	ns	***	***
BroLi	1,14	0,3466	ns	ns	ns	ns
MCC13	13,3	0,0005	***	ns	**	**
MCC26	24,0	<0,0001	***	ns	***	***
UIISO	1,99	0,1710	ns	ns	ns	ns

3.2.2.2 Inhibition der LTA Expression durch Artesunat *in vitro*.

Zur Überprüfung ob ähnlich wie bei IFN eine Inhibition der LTA Expression durch Artesunate Behandlung erfolgt, wurden MCV+ MKL-1 und WaGa Zelllinien für 4 Tage mit 0,5 oder 5 μ M Artesunate kultiviert. Der 5 μ M Wert wurde gewählt, da es sich dabei um etwa den IC50-Wert für die MCV+ Zelllinien handelt.

In der Tat zeigte sich im Immunoblot eine deutliche Verminderung der LTA Expression nach Behandlung mit 5 μ M Artesunate (Abb. 22a). Daher wurde als nächstes überprüft, ob eine Überexpression von LTA in den Zellen den inhibitorischen Effekt von Artesunate verhindern kann. Dazu wurde der gleiche Versuchsaufbau mit genetisch veränderten Zelllinien durchgeführt, die LTA ektopisch überexprimieren (77). Auch wenn die initiale LTA Expression wie erwartet höher in diesen Zellen war, so zeigte sich bei der 5 μ M Konzentration fast kein Unterschied mehr zwischen den ektopisch LTA überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen. Dies bestätigte sich auch beim MTS Assay, bei dem eine LTA Überexpression keine Auswirkung auf den Artesunate-bedingten antiproliferativen Effekt hatte (Abb. 22B-C).

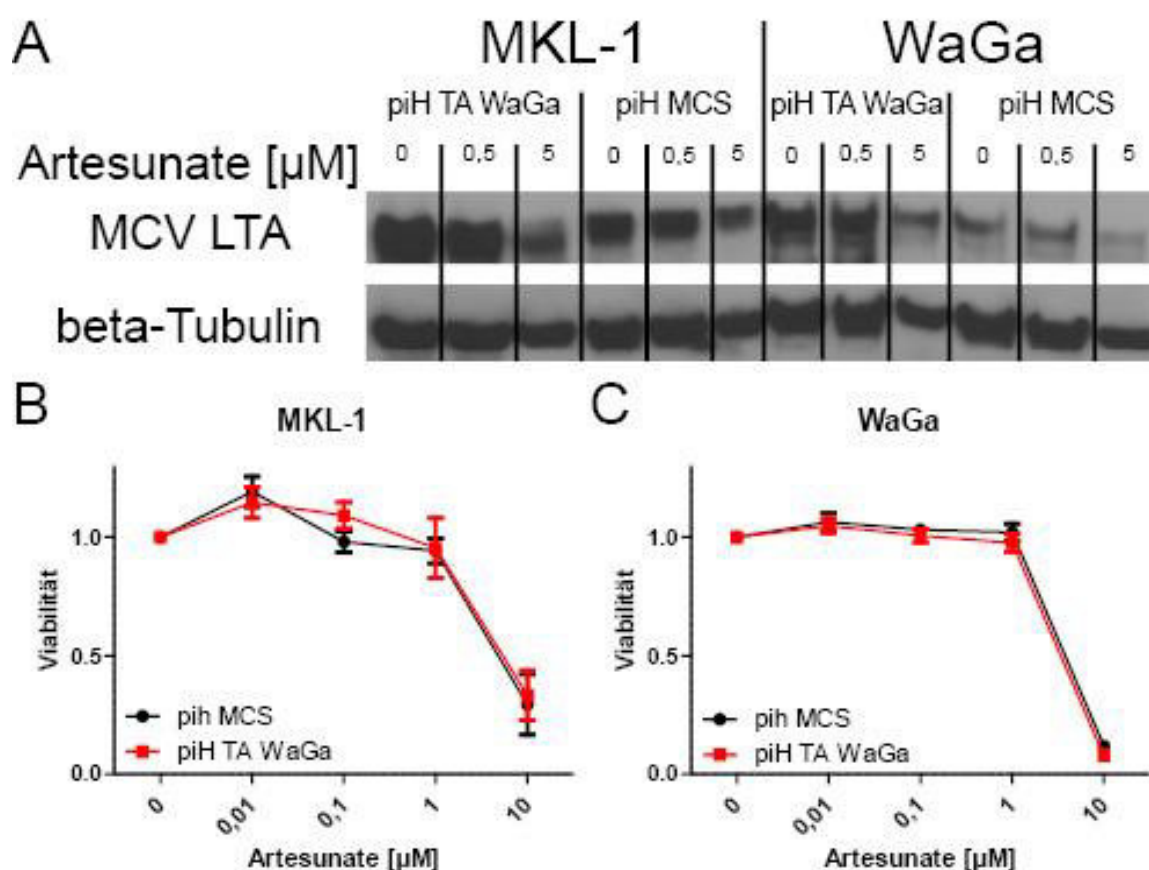


Abb. 22: Artesunate bedingte Inhibition der LTA Expression in MCV+ Zelllinien. A, Die Kultivierung von MKL-1 und WaGa Zelllinien mit 5 μM Artesunate führte zu einer Reduktion der LTA Expression. Der Effekt konnte durch eine Überexpression von viralem TA (piH TA WaGa) nicht aufgehoben werden und unterschied sich nicht von den unveränderten Kontrollen (piH MCS). B-C, Aus diesem Grund ließ sich in beiden Zelllinien auch der durch Artesunate verursachte antiproliferative Effekt durch TA Überexpression nicht aufheben.

3.2.2.3 Wirksamkeit von Artesunat *in vivo*.

Schließlich sollte die Wirksamkeit von Artesunate im präklinischen Modell untersucht werden. Hierzu wurde wiederum das etablierte Xenotransplantationsmodell der MCV+ WaGa Zelllinie herangezogen. 31 Tage nach Injektion der Zelllinien hatten alle Tumoren ein Volumen von mindestens 55 mm^3 erreicht, und es wurde mit der täglichen Behandlung mit i.t. Injektion von 100 mg Artesunate /kg begonnen. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge Trägersubstanz.

In der Kontrollgruppe ist deutlich ein starker Anstieg des Tumorwachstums zu beobachten (Abb. 23). In der mit 100 mg/kg Artesunate behandelte Gruppe hingegen, stagniert das Wachstum. In der Tat unterscheidet sich der Verlauf des Tumorwach-

3. Ergebnisse

tums in beiden Gruppen signifikant voneinander (Two-way-Anova-Analyse $F=5,4$; $p=0,0452$). Die Bonferroni-posttests ergaben hierbei signifikante Unterschiede für die Tage 48 ($t=3,07$; $p<0,05$) und 52 ($t=3,72$; $p<0,01$) nach Injektion der Zellen.

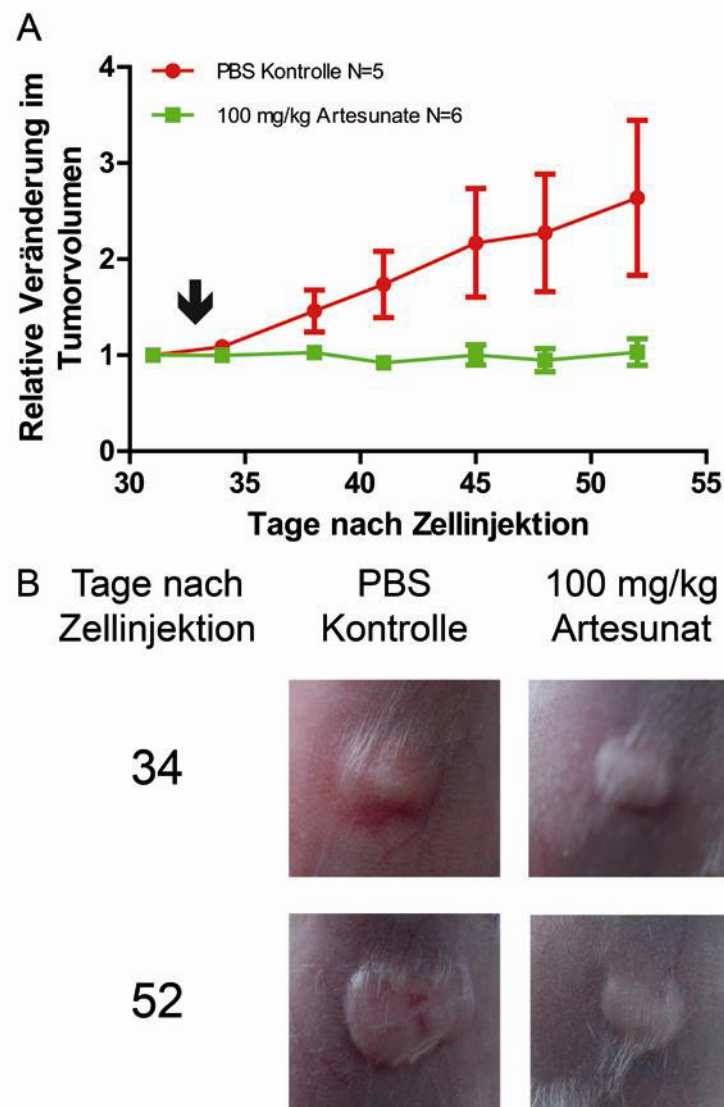


Abb. 23: Bei Behandlung von WaGa Xenotransplantaten mit Artesunat kam es zu einer Stagnation des Tumorwachstums im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe. A, Dargestellt ist die relative Änderung des Tumorumfassen der mit 100mg/kg Artesunate (grüne Linie) behandelten Tiere im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe (schwarze Linie). Der schwarze Pfeil markiert den Therapiebeginn an Tag 33. Deutlich zu erkennen ist die Stagnation des Tumorwachstums in der mit Artesunate behandelten Gruppe. B, Aufnahmen der Tumoren kurz nach Beginn am Tag 34, und zum Ende am Tag 52 des Behandlungszeitraums. Der Tumor der PBS Kontrolle ist auf etwas mehr das doppelte Volumen angestiegen, während der Tumor der Artesunate Gruppe seine Größe nicht veränderte.

4. Diskussion

4.1 Chemosensitivität

Aufgrund der steigenden Inzidenz für das maligne Melanom (114, 183) sowie die, insbesondere für Patienten ohne therapeutisch angreifbare Mutationen, geringen Therapiemöglichkeiten im Stadium der Fernmetastasierung (61), besteht eine große klinische Anforderung für die Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten. Dies lässt sich theoretisch durch neue, effizientere Therapieformen oder aber durch die Verbesserung bestehender Therapien durch prätherapeutische Selektion (Therapie-Individualisierung anhand molekularer Charakteristika) bewerkstelligen. Für die Chemotherapie, die nach wie vor eine prominente Rolle bei der Behandlung von metastasierten Melanompatienten einnimmt, scheint besonders die beschriebene Selektion geeigneter Patienten vielversprechend zu sein. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit mögliche Biomarker der *ex vivo* Chemosensitivität identifiziert werden.

Chemosensitivität und –resistenz können durch vielerlei Faktoren vermittelt werden. Biomarker können hier hilfreiche Werkzeuge zur Identifikation chemosensitiver Patienten sein. Für viele Mechanismen wie Apoptose, DNA-Reparatur oder Proliferation konnten für das Melanom bereits Biomarker identifiziert werden (139), aber auch neue Bereiche wie Epigenetik spielen hierbei eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass in Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten jeweils kleine Subpopulationen existieren, die eine mehr als 100-fach reduzierte Sensitivität gegenüber einer medikamentösen Behandlung aufweisen (160). Diese resistenten Zellpopulationen sind unter anderem charakterisiert durch eine Aktivierung des *insulin-like growth factor* Rezeptor 1 (IGF1R) und einer Änderung im Chromatinstatus, der durch Chromatin-modifizierende Enzyme, wie z.B. Histon-Methylasen, bedingt ist. Dabei wird vermutet, dass IGF1R bei der Aktivierung solcher Enzyme beteiligt ist. Es konnte demonstriert werden, dass die Resistenz der Zellen reversibel ist und nur in Anwesenheit der Histon-Deacetylase KDM5A aufrecht erhalten werden kann (200).

4.1.1 Die Rolle von SERPINB1 bei der Chemosensitivität des Melanoms

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von SERPINB1 und der Chemosensitivität des Melanoms gegenüber Cisplatin-basierter Chemotherapie schließen. Hierbei scheinen allerdings Tumor-Stroma-Interaktionen und damit einhergehende Funktionsänderungen im Zellmetabolismus, die sich auch in der Lokalisation und Funktion des Proteins bemerkbar machen, entscheidende Einflüsse zu haben.

Die *SERPINB1* Expression in allen untersuchten Gewebeproben konnte erfolgreich mit dem *ex vivo* bestimmten Chemosensitivitätsindex für die Substanzkombination Paclitaxel (Taxol) und Cisplatin korreliert werden. In der Mannheimer Subpopulation, die für weitere Zytostatika getestet wurde, lag eine Korrelation immer nur bei einer Verwendung von Cisplatin allein oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika vor. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Sensitivität gegenüber Cisplatin ausschlaggebend für den gegebenen Zusammenhang ist. Die Proteinexpression von SERPINB1 hingegen wies keine Korrelation mit den Chemosensitivitätsdaten auf, was vielleicht durch die begrenzte Zahl an evaluierbaren Proben bedingt ist. Schaut man sich wiederum die Genexpression in den Zelllinien und die bekannten Chemosensitivitätswerte (ICSI-Werte) an, so ergibt sich hier ebenfalls eine Korrelation, die aber genau entgegengesetzt verläuft, d.h. Zellen mit hohem *SERPINB1* Gehalt sind sensitiv gegenüber Cisplatin, während resistente eine niedrigere Expression aufweisen. Ein Zustand, der sich auch durch künstliche Resistenzentwicklung herbeiführen ließ. Eine mögliche Erklärung für diese auftretenden Diskrepanzen liegt in den Eigenschaften von SERPINB1 selbst und in der Funktion von Cisplatin und den damit verbundenen Mechanismen der Resistenzentwicklung.

Cisplatin entfaltet seine zytotoxische Wirkung, indem es die DNA durch Strang-Verknüpfungen modifiziert, vornehmlich zwischen Purinbasen. Die dabei entstehenden sogenannten Platinläsionen verhindern die fehlerfreie Replikation und induzieren so Apoptose (4, 86). Für die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Cisplatin gibt es verschiedene Möglichkeiten (93). So scheinen Änderungen in der Aufnahme des Stoffes und eine einhergehende herabgesetzte Akkumulation in den Zielzellen (113, 124) sowie der interne pH-Wert (pHi) der Zielzellen (103), die Effizienz von Cisplatin zu beeinflussen. Weiterhin kann es zu einer Herabsetzung der toxischen Eigenschaf-

ten durch intrazelluläre Glutathione oder Metallothionin kommen (88, 206). Ebenso können DNA-Reparaturmechanismen eine Rolle bei der Resistenzentwicklung spielen (121).

SERPINB1 wird auch als Leukozyten Elastase Inhibitor (LEI) bezeichnet. In seiner ursprünglichen Konformation hat es Proteaseaktivität und dient zur Inhibition von Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 (37). Durch eine Veränderung des Zellmilieus zu einem niedrigeren pH hin und die dadurch vermittelte Aktivierung der genannten Proteasen und ihrer Interaktion mit SERPINB1 kommt es zu einer posttranslationalen Modifikation des Proteins (7, 179): durch Abspaltung des sogenannten „*reactive center loops*“ (RCL) wird eine Domäne mit Endonuklease-Aktivität freigelegt und SERPINB1 in die sogenannte LEI abgeleitete DNase II (L-DNase II) umgewandelt. Auf diese Weise ist es der Zelle möglich, Apoptose unabhängig von aktiven Caspasen einzuleiten. Die Aktivierung von L-DNase II erfolgt bevorzugt bei pH4, dieser Wert kann jedoch durch extrinsische zelluläre Faktoren erhöht werden (179).

Ferner kommt es zur Translokation von L-DNase II in den Zellkern. Verantwortlich hierfür ist ein „*nuclear localization signal*“ (NLS), das nach der Abspaltung des RCL freigelegt wird und im Zusammenspiel mit einem „*nuclear extrusion signal*“ (NES) für die Translokation verantwortlich ist (179). Für den Transport von SERPINB1 in den Zellkern wurde ein anderer Mechanismus beschrieben, bei dem es zur Interaktion von intaktem SERPINB1 über den RCL mit Elastase kommt. Diese wiederum besitzt ein NLS, das den Transport der beiden Moleküle in den Kern ermöglicht (21). Ferner konnte gezeigt werden, dass der Export von L-DNase II aus dem Nukleus über Crm1 erfolgt. Abbildung 24 gibt eine Übersicht über die Entstehung und Funktion der L-DNase II in der caspaseunabhängigen Apoptose.

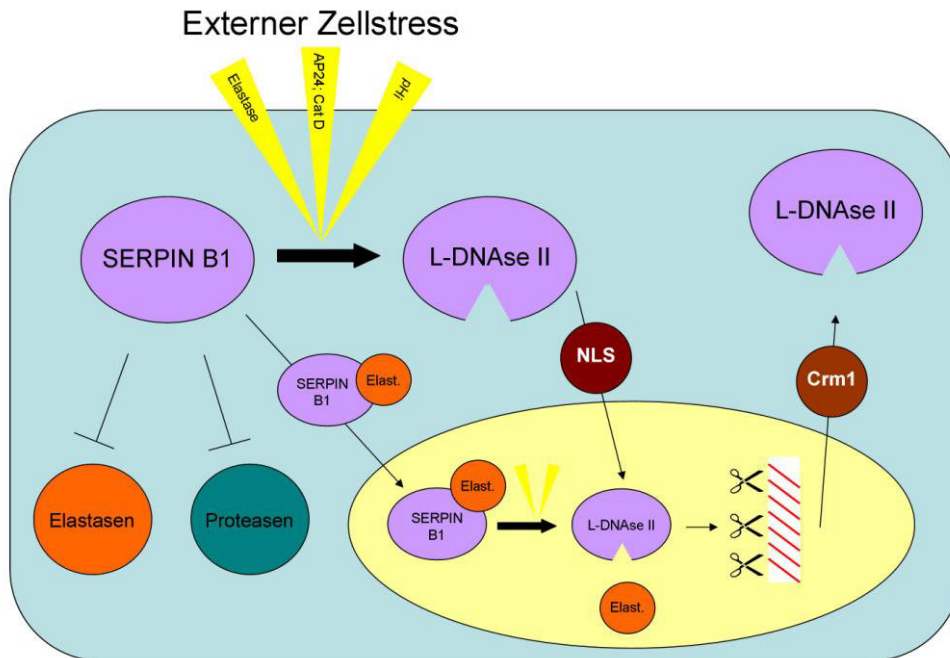


Abb. 24: Synthese von LEI abgeleiteter DNase II und ihre Funktion in der Caspase-unabhängigen Apoptose. Die Funktion von SERPINB1, auch bezeichnet als LEI, ist die Inhibition von Elastasen und Proteasen. Steht die Zelle unter Stress kann eine translationale Modifikation von LEI in die sogenannte LEI abgeleitete DNase II durch interagierende Proteine (z.B. AP24 oder CathepsinG) erfolgen. Auch ein veränderter pH-Wert in den Zellen kann zur Transformation führen. Durch die Spaltung wird ein „nuclear localization signal“ (NLS) sowie eine Region mit Endonuclease Aktivität freigelegt. Über das NLS erfolgt der Transport von L-DNase II in den Kern, wo sie durch Degradation der DNA Apoptose einleitet. Interagiert SERPINB1 mit Elastasen, die ein NLS besitzen, so kann das Protein auch direkt in den Kern transportiert werden und die Transformation erfolgt im Nucleus. Durch ein „nuclear extrusion signal“ (NES) und die Interaktion mit Crm1 erfolgt der Transport von L-DNase II aus dem Kern heraus. Durch die pro-apoptotische Funktion von L-DNase II auf der einen Seite und ihren Transport aus dem Kern sowie der antiapoptotischen Funktion von SERPINB1 auf der anderen Seite kann diese Form der Caspase-unabhängigen Apoptose reguliert werden.

Eine Akkumulation von L-DNase II im Kern führt nachweislich zur Apoptose (107). Im Zytoplasma hingegen weist SERPINB1 antiapoptotische Wirkung auf, indem es z.B. die Aktivierung von Caspase 8 sowie Elastasen inhibiert (135). Übereinstimmend dazu konnte gezeigt werden, dass die transiente Überexpression von SERPINB1 in BHK Zellen zur Resistenz gegen Etoposid vermittelten Zelltod führt (7). In Melanomzelllinien kam es nach dem *knockdown* von SERPINB1 zur Apoptose. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es seine antiapoptotischen Funktionen nicht mehr ausführen konnte. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass der Zelltod auch durch Off-Target Effekte der verwendeten shRNA Konstrukte hervorgerufen wurde.

Die ambivalente Funktion von SERPINB1, also sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktionen und das Zusammenspiel mit anderen zellulären Faktoren könnte die fehlende Korrelation zwischen Chemosensitivität und Proteinexpression erklären. So könnte eine Elastase, die sowohl für die Translokation als auch für die Transformation verantwortlich ist, auf Proteinebene ein potentieller Biomarker sein, nicht aber die Proteinexpression von SERPINB1. Auch Mutationen in NLS und NES können die apoptotische Wirkung von SERPINB1 beeinflussen, indem sie den Import in den Kern bzw. den Export aus dem Kern heraus verhindern oder beschleunigen (107, 178).

Die Gegenläufigkeit der Genexpression von *SERPINB1* in Gewebe und Zelllinien lässt sich mit der Transformation in L-DNAse II allerdings nur schwer erklären und könnte schlicht durch physiologische Unterschiede zwischen Langzeitzellkultur und frischem Gewebe zustande kommen. Andererseits spielen „*in situ*“ viele weitere Faktoren, wie z.B. Tumor-Stroma-Interaktionen, eine beträchtliche Rolle. Auf Proteinebene spricht hierfür die immunhistochemische Färbung, in der hohe SERPINB1 Konzentrationen auch im Stroma zu erkennen waren. Ebenso gibt es verschiedene Arbeiten die darlegen, dass es zu differentieller Genexpression sowohl in Fibroblasten als auch in Tumorzellen kommt, je nachdem ob sie allein oder in Kokultur miteinander wachsen (59, 143). Solche möglichen Veränderungen im Genexpressionsprofil durch Interaktionen von Fibroblasten und Tumorzellen wurden in den untersuchten Zelllinien nicht berücksichtigt. Interaktionen zwischen den beiden Zelltypen könnten auch Unterschiede für die Chemosensitivität zur Folge haben. Für Bauchspeicheldrüsenkrebszellen konnte z.B. gezeigt werden, dass die Sensitivität der Zellen gegenüber Etoposid bei Kokultivierung mit Fibroblasten abnahm (128). Verantwortlich hierfür war eine positive Feedback-Schleife. Die Tumorzellen sezernierten geringe Mengen Interleukin- β (IL- β). Diese reichten aber aus, um in den Fibroblasten die Expression von induzierbarer Stickstoffoxid Synthase (iNOS) zu erhöhen. Hierdurch kam es zur erhöhten Abgabe von Stickstoffoxid (NO) durch die Fibroblasten. Das NO wiederum führte zur erhöhten Sezernierung von IL- β in den Tumorzellen. Durch die Hemmung von iNOS konnte der Kreislauf unterbrochen werden und einhergehend nahm auch die Chemosensitivität der Tumorzellen wieder zu. Dieses Beispiel verdeutlicht die Komplexität, die *in vivo* in Tumoren und ihrem umgebenden Gewebe vorliegt. Die Kokultivierung von Melanomzellen und Fibroblasten und eine

anschließende *SERPINB1* Expressionsanalyse könnten hier Aufschluss geben, ob ähnliche Beeinflussungen auch für Expressionsunterschiede auf mRNA Ebene verantwortlich sein können.

Veränderungen in der Chemosensitivität können wie bereits erwähnt auch durch physiologische Einflüsse hervorgerufen werden. Als Beispiele können hier die Homöostase des Mikromilieus und der pHi-Wert angeführt werden. Maus-Mammakarzinomzellen (EMT6), die mit dem Na⁺/H⁺ Antiport Transporter Inhibitor Hexamethylen Amilorid (HMA) behandelt wurden, haben Resistenzen gegenüber Cisplatin entwickelt (102). In BHK Zellen führte die Behandlung mit HMA hingegen zu einer Erhöhung der durch L-DNAse II vermittelten Apoptoserate (7). Da Na⁺/H⁺ Antiporter auch den pHi von Zellen beeinflussen, kann auch hier ein Zusammenhang zwischen Cisplatinresistenz, pHi und L-DNAse II vermutet werden. Chau und Kollegen konnten in Lungenkrebszellen (HTB56) zeigen, dass ein erhöhter pHi zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin führt (33).

4.1.2 Ist *SERPINB1* ein potentieller zukünftiger Biomarker der Chemosensitivität beim Melanom?

Um *SERPINB1* als Biomarker zu etablieren, sind noch einige Untersuchungen notwendig, die Aufschluss über das genaue Zusammenspiel zwischen seiner Expression und der Chemosensitivität gegenüber Cisplatin geben. Zwar bildet der ATP-TCA die Gegebenheiten *in vivo* relativ genau ab, sind jedoch z.B. Tumor-Stroma-Interaktionen eine ausschlaggebende Größe für Resistenz und Expression, so könnten bereits kleinere Abweichungen große Auswirkungen haben.

Betrachtet man *SERPINB1* als prognostischen Marker, so gibt es zwischen Patienten mit hoher und niedriger Expression keine Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit. Für die etablierten Marker LDH und S100 hingegen konnten die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse auch in diesem Falle reproduziert werden. Schlüsselt man die Patienten nun nochmals auf und betrachtet nur die Gruppe, die mit platinhaltiger Chemotherapie behandelt wurde, so unterschieden sich die Überlebensraten bei unterschiedlich starker *SERPINB1*-Expression. Interessanterweise haben hier die Patienten mit höherer Expression einen Überlebensvorteil. Dies ist

höchstwahrscheinlich durch die pro-apoptotische Funktion von SERPINB1 in Folge der durch die Chemotherapie ausgelösten Stressreaktion zu erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die funktionelle Charakterisierung von SERPINB1 für die Chemosensitivität gegenüber Cisplatin einen genaueren Einblick in einen der Mechanismen der Chemosensitivität gegenüber diesem Zytostatikum geben könnte. Hieraus sollten sich weitere Ansätze zur therapeutischen Intervention herausarbeiten lassen, auch in Bezug auf die duale Funktion des Proteins bei der Apoptose. Ferner könnten im Zusammenspiel mit weiteren platinspezifischen Markern diejenigen Patienten selektiert werden, die von einer solchen Therapie mit höherer Wahrscheinlichkeit profitieren, während Patienten mit voraussichtlich cisplatin-resistenten Tumoren anderen gängigen Chemotherapien oder beispielsweise immunologisch ausgerichteten Therapiestrategien zugeführt werden könnten. Dieser letzte Aspekt würde durch die Identifizierung weiterer Biomarker für verschiedene spezifische Chemotherapien noch an Gewicht gewinnen. Sollte es außerdem möglich sein, z.B. durch Blockierung des IGF1R Signalweges Einfluss auf die Chemoresistenz von Melanomzelllinien zu nehmen, so könnten Kombinationstherapien aus entsprechenden Inhibitoren und Chemotherapeutika vielversprechend sein.

4.2 Merkelzellkarzinom

4.2.1 Wirkungsweise von Interferon auf das MCC

Seit Isaacs und Linderman im Jahr 1957 die Interferone entdeckt haben (82), gelten diese aufgrund ihrer antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften als vielversprechende Medikamente gegen Krebs. Weiterhin lässt sie ihre Fähigkeit, in direkter oder indirekter Form die Expression und Funktion viraler Onkogene zu beeinflussen, ideal für die Behandlung virusinduzierter Tumoren erscheinen. In einem Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von Typ I und Typ II Interferonen auf das MCC, einen seltenen aber hoch aggressiven Tumor der Haut, dessen Onkogenese ursächlich mit dem MCV in Verbindung zu stehen scheint, untersucht.

Klinisch relevant und auch *in vivo* im präklinischen Modell zu beobachten ist die verminderte Viabilität und Proliferation der MCC Zelllinien durch IFN Behandlung, vor allem für Typ I Interferone. Dieser Effekt steht besonders in MCV+ Linien größtenteils in Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose, wobei MKL-1 als einzige der untersuchten Linie die Ausnahme zu bilden scheint. Solche „Ausreißer“ konnten aber auch schon in anderen Arbeiten, wie einer Untersuchung an Lungenkrebszellen (95), festgestellt werden. Weiterhin sollte festgehalten werden, dass für die BroLi Zelllinie bereits ein Großteil apoptotischer Zellen in der unbehandelten Gruppe gefunden werden konnte, wahrscheinlich begründet durch die MCV Infektion an sich. Tatsächlich ist das MCC seit seiner Beschreibung durch Toker im Jahr 1972 (175) bekannt für seine hohe Rate apoptotischer Zellen (127). Für viele DNA-Viren, wie z.B. Polyomaviren, ist die Induktion von Apoptose in den Wirtszellen Teil des viralen Replikationszyklus und dient dem Release reifer Virionen. Ausschlaggebend für diesen Prozess ist die Expression sogenannter viraler *very late proteins* (172), die allerdings für das MCV noch nicht beschrieben werden konnten. Allerdings gibt es auch Vermutungen, dass miRNAs an diesen Prozessen beteiligt sein könnten (85). In der Tat konnte für das MCV bereits eine miRNA beschrieben werden (104, 157).

Wie bereits erwähnt, konnte für andere humane Polyomaviren ein Zusammenhang zwischen IFN und viraler Proteine berichtet werden: die Behandlung von BK Virus infizierten Zellen mit IFN γ (2) und die von JC Virus infizierten Zellen mit Typ I Interferonen (36) führt zur Inhibition der viralen LTAs Expression. Aufgrund (i) dieser Beobachtungen, (ii) dem Effekt von Typ I IFNs auf das Überleben von MCV+ MCC Zelllinien und (iii) der Abhängigkeit von MCV+ Linien von der LTA Expression (77, 78), wurde der Einfluss der IFNs auf die Expression dieses potentiellen Onkogens in MCV+ MCC Zellen untersucht. Hier hat sich gezeigt, dass besonders die Typ I IFNs zu einer hohen Reduktion der LTA Expression in den Zellen führen. Der Effekt ist allerdings nicht homogen über alle untersuchten Linien hinweg. Dies ist ein weiteres Beispiel für die Komplexität und Vielfalt der IFN induzierten Signalwege, sowohl im Allgemeinen als auch im MCC.

Neben diesem direkten Einfluss von IFN auf die LTA Expression gibt es auch die Möglichkeit der indirekten Interaktion. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Infektion humaner Gliazellen mit JC Virus durch die IFN induzierte Expression von PML reduziert werden konnte (64). Dieser Effekt basiert auf einer funktionellen

Inhibierung von LTA. Das virale Protein bindet an *PML nuclear bodies* über Interaktion mit der LXCXE Domäne, einem konservierten Aminosäuremotiv welches auch die Bindung an RB vermittelt (30, 77). Es gibt zahlreiche Arbeiten, die die antiviralen Eigenschaften von PML und den *PML nuclear bodies* aufzeigen (54-56, 64). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auch in MCV+ MCC Zellen nach Behandlung mit IFN zu einer starken Erhöhung der PML Expression kommt. Weiterhin konnte in den MCV+ WaGa Xenotransplantaten eine Ko-Lokalisation von PML und LTA nachgewiesen werden. Wie bereits für andere Polyomaviren beschrieben (30, 54-56, 64), führt der Anstieg der PML Expression zu einer Erhöhung in der Interaktion mit LTA und damit auch zu einer Reduktion an frei vorliegendem LTA in der Wirtszelle (64). Durch diese Interaktion mit viralen- aber auch mit Wirtsproteinen (132), die für die Transkription des Virusgenoms zwingend benötigt werden, könnte PML antiviral wirken. Insgesamt scheint also die Kombination aus verringerter Expression und funktioneller Aktivität von LTA durch IFN für dessen starke und schnelle Inhibition der Viabilität von MCV+ MCC Zelllinien verantwortlich zu sein. Dies wird auch durch die *in vivo* Daten gestützt, da hier ebenfalls ein Effekt auf Seiten der MCV+ WaGa Xenotransplantate, nicht aber bei den MCV- UISO Transplantaten vorlag. Nachdem *in vitro* ein Effekt auf UISO und die anderen MCV- Linien zu beobachten war, ist es etwas erstaunlich, dass keinerlei Effekt im Mausmodell zu beobachten war. Dies könnte aber in dem schnellen und aggressiven Wachstum der UISO Tumoren begründet sein. Zusätzlich könnte eventuell auch die Injektionsdosis an MFN für diesen aggressiveren Tumor zu gering gewesen sein.

Die Beobachtung, dass der antiproliferative Effekt auch in MCV- Zelllinien, wenn auch nur in schwächerer Form und *in vitro*, zum Tragen kommt, verdeutlicht die Komplexität der IFN Signalwege. In der Tat müssen weitere Mechanismen als die bisher beschriebenen beteiligt sein. So ist zum Beispiel bekannt, dass IFN α in anderen Zellen Apoptose durch eine erhöhte Expression von *tumor necrosis factor related-apoptosis inducing ligand* (TRAIL) herbeiführt. Die Interaktion von TRAIL mit seinen Liganden löst eine Signalkette aus, die zur Aktivierung von Effektor-Caspasen, wie *cleaved-Caspase 3* führt (201). Die Anwesenheit eben dieser Caspase konnte in den WaGa Xenotransplantaten in der IHC festgestellt werden. Weiterhin konnte für Myelomzelllinien gezeigt werden, dass die durch IFN α induzierte Apoptose via TRAIL Induktion über eine Beteiligung von PML vermittelt wird (40). Hier wäre es in-

interessant in weiteren Experimenten die vielfältige Rolle von PML an der verminderten Viabilität in IFN behandelten MCC Zelllinien genauer zu untersuchen. Neben PML und TRAIL gibt es eine ganze Reihe weiterer ISGs, die an zellulären apoptoseinduzierenden Signalwegen beteiligt zu sein scheinen. Somit könnten diese auch zur Sensitivität von MCC Zelllinien beitragen (118). So wurden zum Beispiel ISG54 (170) und USP18 (142) als Vermittler bzw. Regulator des IFN induzierten Zelltodes beschrieben. Die Tatsache wiederum, dass MCC13 und MCC26 von der Behandlung unbeeinflusst blieben, kann mit der Fähigkeit von Krebszellen, Resistenzen gegenüber IFN zu entwickeln, erklärt werden. Dies kann, wie für das Melanom gezeigt, durch eine erhöhte STAT5 Expression (196) induziert werden. Aber auch epigenetische Prozesse können solch eine Resistenzbildung herbeiführen (100, 116). Eine andere Arbeit hat gezeigt, dass in IFN resistenten Leberkrebszellen eine Hemmung von „insulin-like growth factor binding-protein 7“ (IGFBP7) vorliegt (176). Der ursächliche Mechanismus hierfür konnte allerdings nicht geklärt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Beteiligung von miRNAs an der Resistenzbildung von Zellen gegenüber IFN. Wiederum für Leberkrebs ist z.B. beschrieben, dass die miRNA-146a durch Beeinflussung von SMAD4 die Sensitivität der Zellen gegenüber IFN steuert (177). Ob eine, und wenn ja welche, dieser Möglichkeiten an der Resistenzentwicklung von MCC13 oder MCC26 beteiligt ist, konnte im Zuge dieser Arbeit nicht geklärt werden und bedarf weiteren Untersuchungen.

Neben diesen direkten Effekten von IFN auf die Proliferation und Viabilität, gibt es auch weitere Effekte, die man als klinisch indirekt bezeichnen könnte, da sie durch die Stimulation immunologischer Funktionen gekennzeichnet sind und daher nur bei einem funktionierenden Immunsystem sichtbar werden. In vielen Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen kommt es zu einer Herunterregulierung von MHC Klasse I Molekülen, um der Erkennung durch T-Zellen zu entgehen (13, 28, 140). Wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, kann eine Behandlung mit IFN zu einer Re-expression von MHC Klasse I Molekülen führen (122, 126, 148). Auch ein Großteil der untersuchten MCC Zelllinien ist negativ oder weist eine geringe Expression von MHC Klasse I auf. In diesen Zelllinien lässt sich durch den Einsatz von IFNs eine Induktion oder eine Erhöhung der Expression dieses Rezeptors herbeiführen. Die Aufhebung eines solchen *immun escape* Effektes kann z.B. daher rühren, dass IFNs virale Proteine hemmen, die für die Herunterregulierung von MHC Klasse I verant-

wortlich sind, wie es bereits für das Cytomegalievirus gezeigt werden konnte (73). Für die MHC Klasse I negativen MCV+ Linien konnte ein solcher Zusammenhang zwischen LTA Aktivität und Hemmung der MHC I Expression jedoch nicht gezeigt werden; der *knockdown* von LTA in WaGa Zellen z.B. hatte keinen Effekt auf die Expression von MHC Klasse I (*Daten nicht gezeigt*). Auch wenn andere virale Proteine hierfür verantwortlich sein können, spricht die Tatsache, dass auch die MCV- Linien eine geringere MHC Klasse I Expression aufweisen dafür, dass die Tumorzellen an sich verantwortlich für den *immune escape* sind, wie es schon vom malignen Melanom oder dem Nierenzellkarzinom bekannt ist (58, 63, 80). Erfreulich ist jedoch, dass die *in vitro* Beobachtungen in den *in vivo* Xenotransplantationsmodellen bestätigt werden konnten, dass MFN Gabe zu einer Induktion bzw. verstärkten MHC Klasse I Expression in den Tumoren führt. Ob diese Effekte letztendlich eine erhöhte Immunantwort gegen den Tumor induzieren, konnte im Xenotransplantationsmodell mit immunsupprimierten Mäusen verständlicherweise nicht geklärt werden. Allerdings zeigt eine aktuelle Studie an 116 MCC Patienten, dass eine hohe Anzahl an intratumoralen T-Lymphozyten mit einem verbesserten Gesamtüberleben verbunden ist (163). Dies konnte sowohl für MCV+ als auch für MCV- Tumoren bestätigt werden.

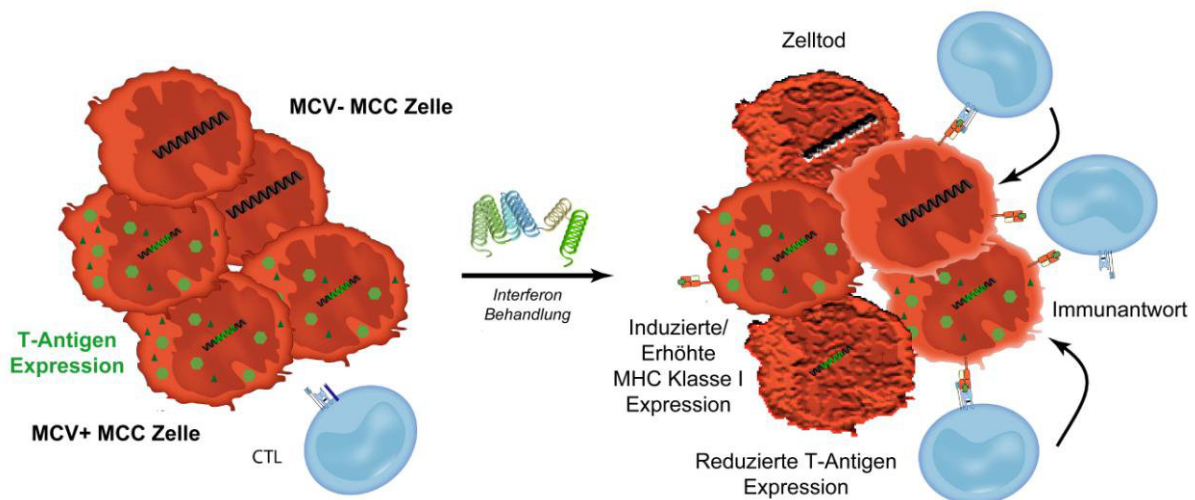


Abb. 25: Direkte und indirekte therapeutische Effekte von IFNs auf MCV+ und MCV- MCC Zelllinien. Durch die Anwendung von IFNs wird in MCC Zelllinien Apoptose herbeigeführt, die für die MCV+ Linien zum Teil auf eine Inhibition des MCV LTA zurückgeführt werden kann. Neben diesem direkten Effekt führt die erhöhte Expression der MHC Klasse I Expression zu einer gesteigerten Sensitivität der Tumorzellen gegenüber einer Immunantwort z.B. durch zytotoxische T-Zellen (CTL).

In dieser Arbeit konnten verschiedene Anhaltspunkte für den direkten antiproliferativen Effekt von IFN, besonders des Typ I, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* dargelegt

werden. Diese Effekte sind maßgeblich auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen. Für die MCV+ MCC Linien dürfte der Effekt größtenteils über die Inhibition der Expression des viralen LTA sowie die verstärkte Expression von zellulärem PML, welches die LTA Funktion einschränken kann, vermittelt werden. Die indirekten immunmodulatorischen Effekte von IFN zeigen sich in den Tumorzellen in einer erhöhten MHC Klasse I Expression. Diese Beobachtungen zusammengenommen (Vgl. Abb. 25) lassen die Behandlung von MCC Patienten mit Interferonen zu einer vielversprechenden Therapiemöglichkeit werden. Dies wird von einzelnen Fallberichten bestätigt, die bereits von einer erfolgreichen Behandlung des metastasierenden MCC durch lokale IFN Therapie berichten (26, 123).

4.2.2 Wirkungsweise von Artemisininen auf das MCC

Seit ihrer Wiederentdeckung zu Beginn der 70'er Jahre des vorigen Jahrhunderts (182) werden Artemisinin und seine Derivate weltweit zur Behandlung von Malaria eingesetzt und sind hierfür von der WHO empfohlen worden (3, 14). Neben ihrer toxischen Wirkung auf *Plasmodium spec.* haben sie antitumorale (42, 48, 49, 69) und antivirale (51, 87, 136, 150) Eigenschaften, die mehrfach belegt werden konnten. Diese doppelte Wirksamkeit macht sie, wie schon die Interferone, zu einem geeigneten Kandidaten im Einsatz gegen das MCC. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Artemisinin und seinem Derivat Artesunate sowohl auf MCV+ als auch MCV-MCC Zelllinien untersucht.

Während Artemisinin nur einen leichten Einfluss auf die MCV+ Linien MKL-2 und WaGa aufwies, zeigte sich für Artesunate ein deutlicher antiproliferativer Effekt sowohl auf die MCV+ als auch MCV- Linien. Dieser schien dabei nochmals unterschiedlich stark auszufallen. Für die MCV- Zellen lag der IC50 eher zwischen Konzentrationen von 10 bis 100 μM , während für zwei der MCV+ Linien der IC50 zwischen 1 und 10 μM erreicht wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der antiproliferative Effekt, den Artesunate gegenüber Tumorzellen hat, durch den antiviralen Effekt verstärkt wird. Tatsächlich konnte eine antivirale Aktivität mit IC50 Werten $< 10 \mu\text{M}$ bereits für verschiedene Typen von Herpesviren nachgewiesen werden (50, 87). Diese fallen wie das MCV in die Gruppe der doppelsträngigen DNA-Viren.

Auch zeigen verschiedene Arbeiten, dass Artemisinin eine geringere Wirkung gegenüber Viren aufweist als Artesunate (87, 130).

Wie bereits in 4.2.1 erläutert, benötigen MCV+ Linien das LTA zur Aufrechterhaltung ihrer Viabilität (78). Im Western Blot zeigte sich tatsächlich, dass es durch Anwendung von 5 μ M Artesunate zu einer verminderten Expression des LTA in den MCV+ Linien kommt. Auch durch eine gezielte Überexpression des LTA wird der Einfluss auf dessen Expression und die Viabilität der untersuchten Zelllinien nicht verbessert. Dies spricht dafür, dass der direkte Effekt von Artesunat auf die LTA Expression sehr stark zu sein scheint und in den MCV+ Linien einen entscheidenden Beitrag zum antiproliferativen Effekt leistet. Bemerkenswert ist jedenfalls, dass Artemisinine scheinbar einen direkten Einfluss auf die Expression von MCV LTA haben. Dies konnte bislang weder für Artemisinin oder eines seiner Derivate beschrieben werden. Der genaue Mechanismus dieses Effektes bleibt daher weitestgehend unbekannt. Seine Untersuchung könnte aber neue Einblicke in die antivirale Wirkungsweise der Artemisinine ergeben und die Entwicklung neuer Therapieansätze bei anderen Viruserkrankungen ermöglichen. Bislang wurde davon ausgegangen, dass die antivirale Wirkung auf einer Inhibition von Wirtsproteinen beruht, die der Virus für seine Replikation benötigt. Im spezifischen Falle von HCMV handelt es sich hierbei z.B. um AKT oder p70S6K, die von Artesunat inhibiert werden (51). Im Falle von MCV könnte es daher eher ausschlaggebend sein, dass es vielleicht, wie bei Gravett et al gezeigt, zu einer Herabregulation von RB nach Anwendung von Artesunate kommen kann (69). Zur Aufrechterhaltung des Tumorwachstums wird die Interaktion zwischen viralen LTA und RB benötigt (77), die durch Anwendung von Artesunat eventuell nicht mehr gegeben ist.

In vivo konnte durch die tägliche i.t. Injektion von 100 mg/kg Artesunat eine Stagnation des Tumorwachstums herbeigeführt werden, während Tumoren einer unbehandelten Kontrollgruppe immer weiter anwachsen. Diese Beobachtung entspricht denen von Du *et al* (43). Die Gruppe zeigte, dass Tumoren aus Xenotransplantationsmodellen von Bauchspeicheldrüsenkrebszellen ebenfalls bei Behandlung mit 100 mg/kg Artesunat im Wachstum stagnieren.

Die Wirkung von Artesunat ist aber nicht auf die MCV+ MCC Linien beschränkt, auch wenn diese eine höhere Sensitivität aufweisen. Es müssen daher zusätzlich noch andere Mechanismen als die antiviralen an der Wirkung von Artesunate in den MCC

Zelllinien beteiligt sein. Der PI3K/AKT Signalweg könnte hier eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits erwähnt, wird dieser durch den Einsatz von Artesunat gehemmt (34, 51). In der Mehrheit der MCC Fälle liegt der PI3K/AKT Signalweg aktiviert vor, unabhängig vom MCV Status des Tumors und seine Hemmung führt zu einer verminderten Proliferation in MCV+ und MCV- MCC Zellen (70). Eine solche Hemmung könnte durch den Einsatz von Artesunat hervorgerufen werden. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den antiproliferativen Effekt unabhängig vom Virusstatus sein. Ein weiterer ausschlaggebender Faktor könnte die Entstehung von ROS nach Behandlung mit Artesunate sein. In Anwesenheit von Eisen zerfällt die für Artemisinine typische Peroxibrücke (s. Abb. 3) und der reaktive Sauerstoff wird freigesetzt. Dieser Mechanismus trägt z.B. zu dem Effekt von Artemisinin und Artesunate auf *Plasmodium* bei (12). Zusätzlich konnte in Glioblastomzellen nachgewiesen werden, dass die Entstehung von ROS durch den Einsatz von Artesunate zu DNA-Schäden führt, die letzten Endes Apoptose und Nekrose zur Folge haben. Die Zugabe von Eisen verstärkt den Effekt, während sogenannte *ROS-scavenger* hingegen den Effekt abschwächen, indem sie den reaktiven Sauerstoff in den Zellen abfangen (23). Eine andere Arbeit demonstriert in MCF-7 Brustkrebszellen, dass die Anwendung von Artesunate zur mitochondrialen Apoptose führt, deren Auslöser wiederum ROS ist, dessen Entstehung durch lysosomales Eisen katalysiert wird (71). Zhou und Kollegen konnten in Lungenadenokarzinom Zelllinien zeigen, dass durch Artesunate Caspase-unabhängige Apoptose ausgelöst wird (210). Dies erfolgt durch Induktion von Bak, dass zur Freisetzung des mitochondrialen Apoptose induzierenden Faktors (AIF) führt und damit einhergehend den Zelltod auslöst. Eine andere Gruppe stellte wiederum den Zusammenhang zwischen Artesunate und dem Tumorsuppressor p53, her (115). Hier führte die Behandlung von HSC Leberzellen zu einer erhöhten Expression von p53 was wiederum Apoptose auslöste.

Die vorausgegangenen beschriebenen Arbeiten haben gemeinsam, dass es nötig war, Konzentrationen von 50 bis 100 μM Artesunat zu verwenden, um erste Auswirkungen sehen zu können. Dies ist das 10 bis 20 fache dessen, was benötigt wird, um einen antiproliferativen Effekt in MCV+ MCC Zellen zu beobachten. Diese Beobachtung spricht ebenfalls dafür, dass der antivirale Effekt von Artesunate additiv zum antitumoralen wirkt. Eine Tatsache, die Artesunate zu einem äußerst interessanten Kandidaten zur Behandlung des MCC macht, da es verspricht sowohl auf MCV+ als

auch MCV- MCCs zu wirken. Es werden aber weitere *in vitro* und *in vivo* Experimente durchgeführt werden müssen, um die genaue Wirkungsweise von Artesunate in MCC Zelllinien zu klären und somit die Austestung von Artesunate in klinischen Studien zu rechtfertigen.

4.2.3 Interferon und Artesunate als Therapieoptionen beim MCC

Sowohl Interferone als auch Artemisinine besitzen antitumorale und antivirale Eigenschaften. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Stoffgruppen vielversprechend für die Behandlung von MCV+ und MCV- MCCs sind. Ein weiterer Ansatz der hierbei verfolgt werden sollte, ist die Kombination beider Behandlungsoptionen. Es hat sich gezeigt, dass die antiviralen Eigenschaften von Artesunate und Interferon auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen (27, 45, 153, 203). Ebenso verhält es sich mit den antitumoralen Unterschieden, die bei IFN eher auf Caspase abhängiger (27) und bei Artesunate scheinbar eher auf Caspase unabhängiger Apoptose (23, 71) beruhen. Da sowohl für IFNs als auch für Artesunate bereits Resistenzbildungen gegen den jeweiligen antitumoralen Effekt bekannt sind (15), könnte eine Kombination der Anwendung beider Stoffe große Therapievorteile mit sich bringen. Erste Kombinationen aus Artesunate und anderen Medikamenten konnten *in vitro* bereits erfolgreich getestet werden (111). Eine Tatsache die zuversichtlich macht, auch in Zukunft immer neue und vielversprechende Therapien gegen Tumorerkrankungen, nicht nur im Bereich der Dermatologie, entwickeln zu können.

5. Zusammenfassung

Für Patienten mit malignem Melanom im Stadium der Fernmetastasierung gibt es bis heute lediglich Therapieoptionen mit sehr eingeschränkten Erfolgsaussichten. Diese Tatsache bestätigt die Notwendigkeit von Biomarkern zur Vorhersage des Erfolgs verschiedener Therapien. Der ATP-basierende *ex vivo* Chemosensitivitätsassay hat sich als erfolgreiche Methode zur individuellen Vorhersage eines Chemotherapieerfolgs herausgestellt. Tatsächlich zeigte der Assay ein heterogenes Sensitivitätsprofil gegen verschiedene Chemotherapeutika und ließ in getesteten Patienten ein *ex vivo* wirksames Chemotherapieregime identifizieren, das anschließend auch klinische Therapieerfolge bei Verwendung der Therapie mit dem besten individuellen Chemosensitivitätsindex (BICSI) zeigte. Um diesen sehr aufwendigen Assay zukünftig zu umgehen, sollten in der vorliegenden Arbeit prädiktive molekulare Biomarker der Chemosensitivität identifiziert werden. Hierfür wurden im Voraus durch einen Microarray die Kandidaten Secernin 1 (SCRN1), Lysyl oxidaselike 1 (LOXL1), Thyrosin beta 4 X-linked (TMSB4X), Vesicle-associated membrane protein 5 (VAMP5) und Serine protease inhibitor B1 (SERPINB1) als differentiell exprimierte Gene in chemosensitivem gegenüber chemoresistentem Gewebe identifiziert. Die relative Expression dieser Kandidatengene wurde daraufhin in bis zu 128 verschiedenen Melanomgeweben mit dem Chemosensitivitätsindex verschiedener Chemotherapeutika korreliert. Hierbei konnte eine signifikante Korrelation zwischen SerpinB1 mit der Chemosensitivität gegenüber der Therapiekombination mit Paclitaxel und Cisplatin auf Gen- aber nicht auf Proteinebene identifiziert werden. Weiterhin konnte eine differentielle Expression ebenfalls in chemosensitiven und -resistenten Melanomzelllinien nachgewiesen werden, die allerdings im Vergleich mit dem analysierten Gewebe in gegensätzlicher Richtung verlief. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SerpinB1 ein vielversprechender Marker für die Chemosensitivität gegenüber Paclitaxel und Cisplatin ist, dessen funktionelle Bedeutung aber unklar bleibt.

Das Merkelzellkarzinom (MCC) ist ein seltener und hoch aggressiver Tumor der mit dem Merkelzellpolyomavirus (MCV) in Zusammenhang steht. Da MCC Zelllinien zur Aufrechterhaltung ihrer Viabilität die MCV T-Antigene benötigen, könnte der Einsatz von Interferonen (IFN) ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung dieser

Krebserkrankung sein. In der vorliegenden Arbeit haben wir daher die Effekte von IFNs auf MCC Zelllinien, mit besonderer Berücksichtigung der MCV+ Linien, untersucht. IFNs vom Typ I (hier Multiferon, ein Mix verschiedener IFN α Subtypen, und IFN β) wirkten stark inhibierend auf die zelluläre Viabilität. Die Zellzyklusanalyse zeigte eine Erhöhung des sub-G Anteils der Zellen nach Behandlung mit IFN, was auf Apoptose als ausschlaggebenden Grund schließen ließ. Diese Effekte waren für die Behandlung mit IFN γ weniger stark ausgeprägt. Der inhibitorische Effekt von Typ I IFNs auf MCV+ MCC Zelllinien war assoziiert mit einer verringerten Expression des viralen großen T-Antigens (LTA) und einer Erhöhung in der Expression von promyelocytic leukemia protein (PML), das dafür bekannt ist, die Funktion des LTA störend zu beeinflussen. Zusätzlich führte die intratumorale Anwendung von Multiferon *in vivo* zu einer Regression im Wachstum von MCV+, aber nicht MCV- MCC Xenotransplantaten. Die Ergebnisse zeigen das Typ I IFNs einen starken antitumoralen Effekt haben, der zum Teil durch die Regulierung des LTA herbeigeführt wird. Neben diesen direkten Effekten der IFNs auf die Zellproliferation induzieren diese auch die Expression von MHC Klasse I Molekülen in MCC Zelllinien. Die Durchflusszytometrie zeigte eine Induktion der MHC Klasse I Expression in drei MHC I negativen MCC Zelllinien und eine Erhöhung der Expression, die vor der Behandlung eine geringe Menge an MHC I aufwies. Diese Effekte konnten auch in den *in vivo* Xenotransplantaten beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit IFN sowohl direkte als auch indirekte Effekte auf das MCC hat und eine breite Anwendung in Patienten mit MCV+ und MCV- Tumoren finden kann. Neben IFNs sind auch Artemisinin und seine Derivate bekannt für ihre antitumoralen und antiviralen Eigenschaften. Daher haben wir den Effekt des Artemisininderivats Artesunate auf MCV+ und MCV- MCC Zelllinien getestet. Tatsächlich konnten wir auch hier einen anti-proliferativen Effekt des Stoffes nachweisen, der stärker auf MCV+ als auf MCV- Zelllinien wirkte und bei ersteren wiederum mit einer reduzierten LTA Expression einherging. Im Vergleich dazu blieben Fibroblasten von der Behandlung unbeeinflusst. Das verringerte Tumorstadium konnte ebenfalls für *in vivo* Xenotransplantationsmodelle gezeigt werden. Auf Grundlage dieser Erkenntnis sollte eine genauere Untersuchung dieses alten Naturheilstoffes für die Behandlung von MCC Patienten in Betracht gezogen werden.

5. Abstract

For melanoma patients with distant metastases all available therapeutic options demonstrate only very limited efficacy up to date. This fact substantiates the need of predictive markers for therapy response. For example, ex-vivo chemosensitivity testing by an ATP-based luminescence assay is a promising tool to predict the individual outcome of different chemotherapy regimens. Indeed, this assay demonstrates a heterogeneous chemosensitivity against different cytotoxic drugs which correlates with chemotherapy outcome in terms of therapy response and overall survival; for the treatment of the patient the drug with the best individual chemosensitivity index (BICSI) is used. To circumvent this elaborate assay in the future, we want to identify and characterize predictive molecular biomarkers of specific chemosensitivity. Initially, predictive biomarker aspirants were identified by a microarray comparing chemosensitive and chemoresistant melanoma cell lines. To this end, we found Secernin 1 (SCRN1), Lysyl oxidaselike 1 (LoxL1), Thymosin beta 4 X-linked (TMSB4X), Vesicle-associated membrane protein 5 (Vamp 5) and Serine protease inhibitor B1 (SerpinB1) as differentially expressed in chemosensitive versus chemoresistant melanoma cells. Furthermore, we correlated the relative expression of our candidates with the chemosensitivity index of different chemotherapy regimes in up to 128 melanoma tissues so far. Importantly, we found a significant correlation between SerpinB1 gene but not protein expression and chemosensitivity towards Paclitaxel and Platin. Moreover, we also detected a differential expression of SerpinB1 in melanoma cell lines which however was running in reverse direction compared to the analyzed tissues. In conclusion, SerpinB1 seems to be a promising biomarker for prediction of Paclitaxel and Platin chemosensitivity.

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare and highly aggressive skin cancer associated with the Merkel cell polyomavirus (MCV). As MCC cell lines demonstrate oncogene addiction to the MCV T-antigens, pharmacological interference of the large T-antigen (LTA) may represent an effective therapeutic approach for this deadly cancer. In this study, we investigated the effects of interferons (IFNs) on MCC cell lines, especially on MCV positive (MCV+) lines. Type I IFNs (i.e. Multiferon, a mix of different IFN α subtypes, and IFN β) strongly inhibited the cellular viability. Cell cycle analysis

demonstrated increased sub-G fractions for these cells upon IFN treatment indicating apoptotic cell death; these effects were less pronounced for IFN γ . Notably, this inhibitory effect of type I IFNs on MCV+ MCC cell lines was associated with a reduced expression of the MCV LTA as well as an increased expression of promyelocytic leukemia protein (PML), which is known to interfere with the function of the LTA. In addition, the intra-tumoural application of multiferon resulted in a regression of MCV+ but not MCV- MCCs *in vivo*. Together, our findings demonstrate that type I IFNs have a strong antitumour effect, which is at least in part explained by modulation of the virally encoded LTA. Moreover, in addition to directly affecting MCC cell proliferation, IFNs strongly reinduce MHC class I expression in MCC cells. Flowcytometry demonstrated a re-induction of MHC class I expression upon IFN treatment in three MHC class I- MCV+ cell lines and an increase in MHC class I expression in cell lines that were characterized by a weak expression prior to treatment. Importantly, the increase or induction of MHC class I expression could also be demonstrated *in vivo* in xenotransplantation models. These results imply that IFN treatment has both a direct and an indirect effect in MCC and should be applicable in a general manner, i.e. irrespective of the MCV status of the patient. Beside IFN, Artemisinins are also known for their antitumoral and antiviral properties. In consequence, we tested the effect of Artesunate, i.e., an Artemisinin derivative, on MCV+ and MCV- MCC cell lines. In this regard, we could demonstrate an antiproliferative effect which was stronger on MCV+ cell lines, and which was associated with a reduced expression of the viral LTA. In contrast, fibroblasts were unaffected by Artesunate treatment. The reduced tumor growth could also be shown *in vivo* by intra-tumoural injection of Artesunate in MCV+ xenotransplantation models. According to these findings, a more detailed investigation of this ancient natural drug for the treatment of MCC patients should be considered.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Merkel cell carcinoma. XIV ed, 377-386. 2010. AJCC cancer staging handbook. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, and Trotti A.
- (2) Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Inhibitory effect of gamma interferon on BK virus gene expression and replication. *J Virol* 2007;81:272-9.
- (3) Adjuik M, Babiker A, Garner P, Olliaro P, Taylor W, White N. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet* 2004;363:9-17.
- (4) Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* 2010;7:543-66.
- (5) Ahuja D, Saenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 2005;24:7729-45.
- (6) Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004;23:7274-82.
- (7) Altairac S, Zeggai S, Perani P, Courtois Y, Torriglia A. Apoptosis induced by Na⁺/H⁺ antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway. *Cell Death Differ* 2003;10:548-57.
- (8) Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, Hartmann DM, Linder D, Harel G, et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:5276-82.
- (9) Ank N, Paludan SR. Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. *Biofactors* 2009;35:82-7.
- (10) Arnou B, Montigny C, Morth JP, Nissen P, Jaxel C, Moller JV, et al. The *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase PfATP6: insensitive to artemisinin, but a potential drug target. *Biochem Soc Trans* 2011;39:823-31.
- (11) Arroyo JD, Hahn WC. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene* 2005;24:7746-55.
- (12) Asawamahsakda W, Ittarat I, Pu YM, Ziffer H, Meshnick SR. Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1854-8.
- (13) Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res* 2006;120:208-11.
- (14) Attaran A, Barnes KI, Curtis C, d'Alessandro U, Fanello CI, Galinski MR, et al. WHO, the Global Fund, and medical malpractice in malaria treatment. *Lancet* 2004;363:237-40.
- (15) Bachmeier B, Fichtner I, Killian PH, Kronski E, Pfeffer U, Efferth T. Development of resistance towards artesunate in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *PLoS One* 2011;6:e20550.
- (16) Bakker AB, Phillips JH, Figdor CG, Lanier LL. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK

- cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J Immunol* 1998;160:5239-45.
- (17) Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27:6199-206.
- (18) Becker JC. Merkel cell carcinoma. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 7:vii81-vii85.
- (19) Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pfohler C, Schrama D. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol* 2009;129:248-50.
- (20) Becker JC, Schrama D, Houben R. Merkel cell carcinoma. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1-8.
- (21) Belmokhtar CA, Torriglia A, Counis MF, Courtois Y, Jacquemin-Sablon A, Segal-Bendirdjian E. Nuclear translocation of a leukocyte elastase Inhibitor/Elastase complex during staurosporine-induced apoptosis: role in the generation of nuclear L-DNase II activity. *Exp Cell Res* 2000;254:99-109.
- (22) Benarafa C, Priebe GP, Remold-O'Donnell E. The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Exp Med* 2007;204:1901-9.
- (23) Berdelle N, Nikolova T, Quiros S, Efferth T, Kaina B. Artesunate induces oxidative DNA damage, sustained DNA double-strand breaks, and the ATM/ATR damage response in cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2011;10:2224-33.
- (24) Berman PA, Adams PA. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1283-8.
- (25) Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)* 2009;23:488-96.
- (26) Biver-Dalle C, Nguyen T, Touze A, Saccomani C, Penz S, Cunat-Peultier S, et al. Use of interferon-alpha in two patients with Merkel cell carcinoma positive for Merkel cell polyomavirus. *Acta Oncol* 2010.
- (27) Bracarda S, Eggermont AM, Samuelsson J. Redefining the role of interferon in the treatment of malignant diseases. *Eur J Cancer* 2010;46:284-97.
- (28) Bubenik J. MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). *Int J Oncol* 2004;25:487-91.
- (29) Butt AS, Mumtaz K, Aqeel I, Shah HA, Hamid S, Jafri W. Sustained virological response to pegylated interferon and ribavirin in patients with genotype 3 HCV cirrhosis. *Trop Gastroenterol* 2009;30:207-12.
- (30) Carvalho T, Seeler JS, Ohman K, Jordan P, Pettersson U, Akusjarvi G, et al. Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* 1995;131:45-56.
- (31) Cha HJ, Jeong MJ, Kleinman HK. Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1674-80.
- (32) Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507-16.
- (33) Chau Q, Stewart DJ. Cisplatin efflux, binding and intracellular pH in the HTB56 human lung adenocarcinoma cell line and the E-8/0.7 cisplatin-resistant variant. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;44:193-202.

- (34) Cheng C, Ho WE, Goh FY, Guan SP, Kong LR, Lai WQ, et al. Anti-malarial drug artesunate attenuates experimental allergic asthma via inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *PLoS One* 2011;6:e20932.
- (35) Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol* 2009;19:218-28.
- (36) Co JK, Verma S, Gurjav U, Sumibcay L, Nerurkar VR. Interferon- alpha and - beta restrict polyomavirus JC replication in primary human fetal glial cells: implications for progressive multifocal leukoencephalopathy therapy. *J Infect Dis* 2007;196:712-8.
- (37) Cooley J, Takayama TK, Shapiro SD, Schechter NM, Remold-O'Donnell E. The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites. *Biochemistry* 2001;40:15762-70.
- (38) Cox NH, Aitchison TC, Sirel JM, MacKie RM. Comparison between lentigo maligna melanoma and other histogenetic types of malignant melanoma of the head and neck. Scottish Melanoma Group. *Br J Cancer* 1996;73:940-4.
- (39) Cree IA, Neale MH, Myatt NE, de Takats PG, Hall P, Grant J, et al. Heterogeneity of chemosensitivity of metastatic cutaneous melanoma. *Anticancer Drugs* 1999;10:437-44.
- (40) Crowder C, Dahle O, Davis RE, Gabrielsen OS, Rudikoff S. PML mediates IFN-alpha-induced apoptosis in myeloma by regulating TRAIL induction. *Blood* 2005;105:1280-7.
- (41) Dalpe G, Leclerc N, Vallee A, Messer A, Mathieu M, De RY, et al. Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization. *Mol Cell Neurosci* 1998;10:243-57.
- (42) Dell'Eva R, Pfeffer U, Vene R, Anfosso L, Forlani A, Albini A, et al. Inhibition of angiogenesis in vivo and growth of Kaposi's sarcoma xenograft tumors by the anti-malarial artesunate. *Biochem Pharmacol* 2004;68:2359-66.
- (43) Du JH, Zhang HD, Ma ZJ, Ji KM. Artesunate induces oncosis-like cell death in vitro and has antitumor activity against pancreatic cancer xenografts in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:895-902.
- (44) Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998;72:8463-71.
- (45) Durantel D, Carrouee-Durantel S, Branza-Nichita N, Dwek RA, Zitzmann N. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:497-504.
- (46) Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, et al. Artemisinin targets the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature* 2003;424:957-61.
- (47) Efferth T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2005;8:85-97.
- (48) Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol* 2001;18:767-73.
- (49) Efferth T, Herrmann F, Tahrani A, Wink M. Cytotoxic activity of secondary metabolites derived from *Artemisia annua* L. towards cancer cells in

- comparison to its designated active constituent artemisinin. *Phytomedicine* 2011;18:959-69.
- (50) Efferth T, Marschall M, Wang X, Huong SM, Hauber I, Olbrich A, et al. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med (Berl)* 2002;80:233-42.
- (51) Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJ, Marschall M. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin Infect Dis* 2008;47:804-11.
- (52) Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 2003;4:748-59.
- (53) Elder DE. Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites. *Mod Pathol* 2006;19 Suppl 2:S4-20.
- (54) Everett RD. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 2001;20:7266-73.
- (55) Everett RD, Chelbi-Alix MK. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 2007;89:819-30.
- (56) Everett RD, Rechter S, Papior P, Tavalai N, Stamminger T, Orr A. PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol* 2006;80:7995-8005.
- (57) Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008;319:1096-100.
- (58) Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 1995;16:487-94.
- (59) Fromigue O, Louis K, Dayem M, Milanini J, Pages G, Tartare-Deckert S, et al. Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. *Oncogene* 2003;22:8487-97.
- (60) Gallagher SJ, Thompson JF, Indsto J, Scurr LL, Lett M, Gao BF, et al. p16INK4a expression and absence of activated B-RAF are independent predictors of chemosensitivity in melanoma tumors. *Neoplasia* 2008;10:1231-9.
- (61) Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2010;46:270-83.
- (62) Garbe C, Radny P, Linse R, Dummer R, Gutzmer R, Ulrich J, et al. Adjuvant low-dose interferon α 2a with or without dacarbazine compared with surgery alone: a prospective-randomized phase III DeCOG trial in melanoma patients with regional lymph node metastasis. *Ann Oncol* 2008;19:1195-201.
- (63) Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997;18:89-95.
- (64) Gasparovic ML, Maginnis MS, O'Hara BA, Dugan AS, Atwood WJ. Modulation of PML protein expression regulates JCV infection. *Virology* 2009;390:279-88.

- (65) Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1417-23.
- (66) Glaysher S, Gabriel FG, Johnson P, Polak M, Knight LA, Parker K, et al. Molecular basis of chemosensitivity of platinum pre-treated ovarian cancer to chemotherapy. *Br J Cancer* 2010;103:656-62.
- (67) Gore ME, Griffin CL, Hancock B, Patel PM, Pyle L, Aitchison M, et al. Interferon alfa-2a versus combination therapy with interferon alfa-2a, interleukin-2, and fluorouracil in patients with untreated metastatic renal cell carcinoma (MRC RE04/EORTC GU 30012): an open-label randomised trial. *Lancet* 2010;375:641-8.
- (68) Gould VE, Moll R, Moll I, Lee I, Franke WW. Neuroendocrine (Merkel) cells of the skin: hyperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab Invest* 1985;52:334-53.
- (69) Gravett AM, Liu WM, Krishna S, Chan WC, Haynes RK, Wilson NL, et al. In vitro study of the anti-cancer effects of artemisone alone or in combination with other chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;67:569-77.
- (70) Hafner C, Houben R, Baeurle A, Ritter C, Schrama D, Landthaler M, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway in Merkel cell carcinoma. *PLoS One* 2012;7:e31255.
- (71) Hamacher-Brady A, Stein HA, Turschner S, Toegel I, Mora R, Jennewein N, et al. Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 2011;286:6587-601.
- (72) Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang LC, Penas PF, et al. Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:375-81.
- (73) Hengel H, Esslinger C, Pool J, Goulmy E, Koszinowski UH. Cytokines restore MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells. *J Gen Virol* 1995;76 (Pt 12):2987-97.
- (74) Hodgson NC. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol* 2005;89:1-4.
- (75) Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:711-23.
- (76) Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, Sucker A, Ugurel S, Kumar R, et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 2006;19:290-302.
- (77) Houben R, Adam C, Baeurle A, Hesbacher S, Grimm J, Angermeyer S, et al. An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 2011.
- (78) Houben R, Shuda M, Weinkam R, Schrama D, Feng H, Chang Y, et al. Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol* 2010;84:7064-72.
- (79) Hsiao HL, Wang WS, Chen PM, Su Y. Overexpression of thymosin beta-4 renders SW480 colon carcinoma cells more resistant to apoptosis triggered by FasL and two topoisomerase II inhibitors via downregulating Fas and

- upregulating Survivin expression, respectively. *Carcinogenesis* 2006;27:936-44.
- (80) Hsieh CH, Hsu YJ, Chang CC, Liu HC, Chuang KL, Chuang CK, et al. Total HLA class I loss in a sarcomatoid renal carcinoma cell line caused by the coexistence of distinct mutations in the two encoding beta2-microglobulin genes. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:395-408.
- (81) Imperiale MJ, Major EO. *Polyomaviruses*. 5th Edition[2 vols.], 2263-2298. 2007. Philadelphia, PA, Lippincott Williams and Wilkins. *Fields Virology*, Vol.2. Knipe, D. M. and Howley, P. M.
- (82) Isaacs A, Lindenmann J. *Virus interference*. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 1987;7:429-38.
- (83) Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P, Wheatley K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J Clin Oncol* 2007;25:5426-34.
- (84) Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2003;22:8031-41.
- (85) Johnson EM. Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. *Trends Microbiol* 2010;18:215-23.
- (86) Jung Y, Lippard SJ. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* 2007;107:1387-407.
- (87) Kaptein SJ, Efferth T, Leis M, Rechter S, Auerochs S, Kalmer M, et al. The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 2006;69:60-9.
- (88) Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, et al. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res* 1991;51:3237-42.
- (89) Kassem A, Schopflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M, et al. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res* 2008;68:5009-13.
- (90) Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS, et al. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 2000;18:2444-58.
- (91) Kirkwood JM, Tarhini AA, Moschos SJ, Panelli MC. Adjuvant therapy with high-dose interferon alpha 2b in patients with high-risk stage IIB/III melanoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:2-3.
- (92) Kirkwood JM, Tawbi HA, Tarhini AA, Moschos SJ. Does pegylated interferon alpha-2b confer additional benefit in the adjuvant treatment of high-risk melanoma? *Nat Clin Pract Oncol* 2009;6:70-1.
- (93) Koberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806:172-82.
- (94) Krasagakis K, Kruger-Krasagakis S, Tzanakakis GN, Darivianaki K, Stathopoulos EN, Tosca AD. Interferon-alpha inhibits proliferation and induces apoptosis of merkel cell carcinoma in vitro. *Cancer Invest* 2008;26:562-8.

- (95) Krejcova D, Prochazkova J, Kubala L, Pachernik J. Modulation of cell proliferation and differentiation of human lung carcinoma cells by the interferon-alpha. *Gen Physiol Biophys* 2009;28:294-301.
- (96) Krishna S, Bustamante L, Haynes RK, Staines HM. Artemisinins: their growing importance in medicine. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:520-7.
- (97) Krishna S, Pulcini S, Fatih F, Staines H. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. *Trends Parasitol* 2010;26:517-23.
- (98) Kuhlenbaumer G, Friedrichs F, Kis B, Berlit P, Maintz D, Nassenstein I, et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the lysyl oxidase-like 1 gene and spontaneous cervical artery dissection. *Cerebrovasc Dis* 2007;24:343-8.
- (99) Kuhr T, Burgstaller S, Apfelbeck U, Linkesch W, Seewann H, Fridrik M, et al. A randomized study comparing interferon (IFN alpha) plus low-dose cytarabine and interferon plus hydroxyurea (HU) in early chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML). *Leuk Res* 2003;27:405-11.
- (100) Kulaeva OI, Draghici S, Tang L, Kraniak JM, Land SJ, Tainsky MA. Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. *Oncogene* 2003;22:4118-27.
- (101) Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, Brenne U, Kurbacher JA, Muller K, et al. Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs* 1998;9:51-7.
- (102) Laurencot CM, Andrews PA, Kennedy KA. Inhibitors of intracellular pH regulation induce cisplatin resistance in EMT6 mouse mammary tumor cells. *Oncol Res* 1995;7:363-9.
- (103) Laurencot CM, Kennedy KA. Influence of pH on the cytotoxicity of cisplatin in EMT6 mouse mammary tumor cells. *Oncol Res* 1995;7:371-9.
- (104) Lee S, Paulson KG, Murchison EP, Afanasiev OK, Alkan C, Leonard JH, et al. Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas. *J Clin Virol* 2011;52:272-5.
- (105) Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 2008;624:89-103.
- (106) Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, Phillips JL, Bichakjian CK, Fang LC, et al. Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in Merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the first consensus staging system. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:751-61.
- (107) Lepretre C, Fleurier Y, Martin E, Torriglia A. Nuclear export of LEI/L-DNase II by Crm1 is essential for cell survival. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:1068-75.
- (108) Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:62-70.
- (109) Lin H, Wong RP, Martinka M, Li G. Loss of SNF5 expression correlates with poor patient survival in melanoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:6404-11.
- (110) Liu CH, Liang CC, Liu CJ, Lin JW, Chen SI, Hung PH, et al. Pegylated interferon alfa-2a monotherapy for hemodialysis patients with acute hepatitis C. *Clin Infect Dis* 2010;51:541-9.

- (111) Liu WM, Gravett AM, Dalglish AG. The antimalarial agent artesunate possesses anticancer properties that can be enhanced by combination strategies. *Int J Cancer* 2011;128:1471-80.
- (112) Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 2004;36:178-82.
- (113) Loh SY, Mistry P, Kelland LR, Abel G, Harrap KR. Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes. *Br J Cancer* 1992;66:1109-15.
- (114) Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A Systematic Review of worldwide incidence of Non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2012.
- (115) Longxi P, Buwu F, Yuan W, Sinan G. Expression of p53 in the effects of artesunate on induction of apoptosis and inhibition of proliferation in rat primary hepatic stellate cells. *PLoS One* 2011;6:e26500.
- (116) Lu R, Au WC, Yeow WS, Hageman N, Pitha PM. Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. Activation by interferon and silencing by hypermethylation. *J Biol Chem* 2000;275:31805-12.
- (117) Lublin F. History of modern multiple sclerosis therapy. *J Neurol* 2005;252 Suppl 3:iii3-iii9.
- (118) Maher SG, Romero-Weaver AL, Scarzello AJ, Gamero AM. Interferon: cellular executioner or white knight? *Curr Med Chem* 2007;14:1279-89.
- (119) Mallone S, De VE, Guzzo M, Midena E, Verne J, Coebergh JW, et al. Descriptive epidemiology of malignant mucosal and uveal melanomas and adnexal skin carcinomas in Europe. *Eur J Cancer* 2011.
- (120) Martin D, Gutkind JS. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 2008;27 Suppl 2:S31-S42.
- (121) Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008;14:1291-5.
- (122) Martini M, Testi MG, Pasetto M, Picchio MC, Innamorati G, Mazzocco M, et al. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* 2010;28:3548-57.
- (123) Matsushita E, Hayashi N, Fukushima A, Ueno H. [Evaluation of treatment and prognosis of Merkel cell carcinoma of the eyelid in Japan]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2007;111:459-62.
- (124) Mellish KJ, Kelland LR, Harrap KR. In vitro platinum drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. *Br J Cancer* 1993;68:240-50.
- (125) Mian S, Ugurel S, Parkinson E, Schlenzka I, Dryden I, Lancashire L, et al. Serum proteomic fingerprinting discriminates between clinical stages and predicts disease progression in melanoma patients. *J Clin Oncol* 2005;23:5088-93.
- (126) Mohty AM, Grob JJ, Mohty M, Richard MA, Olive D, Gaugler B. Induction of IP-10/CXCL10 secretion as an immunomodulatory effect of low-dose adjuvant interferon-alpha during treatment of melanoma. *Immunobiology* 2010;215:113-23.

- (127) Mori Y, Hashimoto K, Tanaka K, Cui CY, Mehregan DR, Stiff MA. A study of apoptosis in Merkel cell carcinoma: an immunohistochemical, ultrastructural, DNA ladder, and TUNEL labeling study. *Am J Dermatopathol* 2001;23:16-23.
- (128) Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, et al. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* 2004;64:1331-7.
- (129) Myatt N, Cree IA, Kurbacher CM, Foss AJ, Hungerford JL, Plowman PN. The ex vivo chemosensitivity profile of choroidal melanoma. *Anticancer Drugs* 1997;8:756-62.
- (130) Naesens L, Bonnafous P, Agut H, De CE. Antiviral activity of diverse classes of broad-acting agents and natural compounds in HHV-6-infected lymphoblasts. *J Clin Virol* 2006;37 Suppl 1:S69-S75.
- (131) Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* 2010;49:978-86.
- (132) Negorev D, Maul GG. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 2001;20:7234-42.
- (133) Netscher DT, Leong M, Orengo I, Yang D, Berg C, Krishnan B. Cutaneous malignancies: melanoma and nonmelanoma types. *Plast Reconstr Surg* 2011;127:37e-56e.
- (134) Oh SY, Song JH, Gil JE, Kim JH, Yeom YI, Moon EY. ERK activation by thymosin-beta-4 (TB4) overexpression induces paclitaxel-resistance. *Exp Cell Res* 2006;312:1651-7.
- (135) Padron-Barthe L, Courta J, Lepretre C, Nagbou A, Torriglia A. Leukocyte Elastase Inhibitor, the precursor of L-DNase II, inhibits apoptosis by interfering with caspase-8 activation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:1755-66.
- (136) Paeshuyse J, Coelmont L, Vliegen I, Van hJ, Vandekerckhove J, Peys E, et al. Hemin potentiates the anti-hepatitis C virus activity of the antimalarial drug artemisinin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:139-44.
- (137) Papastefanou VP, Cohen VM. Uveal melanoma. *J Skin Cancer* 2011;2011:573974.
- (138) Park HS, Saida T, Park SY, Cho KH, Lee JH, Cho S. Case of mucosal lentiginous melanoma in situ on the upper lip with a long radial growth phase. *J Dermatol* 2012.
- (139) Parker KA, Glaysher S, Polak M, Gabriel FG, Johnson P, Knight LA, et al. The molecular basis of the chemosensitivity of metastatic cutaneous melanoma to chemotherapy. *J Clin Pathol* 2010;63:1012-20.
- (140) Piguet V. Receptor modulation in viral replication: HIV, HSV, HHV-8 and HPV: same goal, different techniques to interfere with MHC-I antigen presentation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;285:199-217.
- (141) Plettenberg A, Kern P, Dietrich M, Meigel W. [Recombinant interferon alpha-2A in the treatment of HIV-associated Kaposi sarcoma. Long-term results]. *Med Klin (Munich)* 1990;85:647-52.
- (142) Potu H, Sgorbissa A, Brancolini C. Identification of USP18 as an important regulator of the susceptibility to IFN-alpha and drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 2010;70:655-65.

- (143) Reinertsen T, Halgunset J, Viset T, Flatberg A, Haugsmoen LL, Skogseth H. Gene expressional changes in prostate fibroblasts from cancerous tissue. *APMIS* 2012;120:558-71.
- (144) Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Hautkrebs. Robert Koch Institut; 2004.
- (145) Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends. Robert Koch Institut; 2010.
- (146) Robert C, Arnault JP, Mateus C. RAF inhibition and induction of cutaneous squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2011;23:177-82.
- (147) Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, Laga AC, et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest* 2012;122:4645-53.
- (148) Rodriguez T, Mendez R, Del CA, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F, et al. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer* 2007;7:34.
- (149) Rollison DE, Giuliano AR, Becker JC. New virus associated with merkel cell carcinoma development. *J Natl Compr Canc Netw* 2010;8:874-80.
- (150) Romero MR, Efferth T, Serrano MA, Castano B, Macias RI, Briz O, et al. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system. *Antiviral Res* 2005;68:75-83.
- (151) Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchiocchi A, et al. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 2010;8:67.
- (152) Rywlin AM. Malignant Merkel-cell tumor is a more accurate description than trabecular carcinoma. *Am J Dermatopathol* 1982;4:513-5.
- (153) Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:778-809, table.
- (154) Sastre-Garau X, Peter M, Avril MF, Laude H, Couturier J, Rozenberg F, et al. Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol* 2009;218:48-56.
- (155) Schrama D, Ugurel S, Becker JC. Merkel cell carcinoma: recent insights and new treatment options. *Curr Opin Oncol* 2012;24:141-9.
- (156) Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-89.
- (157) Seo GJ, Chen CJ, Sullivan CS. Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression. *Virology* 2009;383:183-7.
- (158) Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19:21-34.
- (159) Shaikh WR, Xiong M, Weinstock MA. The contribution of nodular subtype to melanoma mortality in the United States, 1978 to 2007. *Arch Dermatol* 2012;148:30-6.
- (160) Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 2010;141:69-80.

- (161) Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, et al. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16272-7.
- (162) Shuda M, Kwun HJ, Feng H, Chang Y, Moore PS. Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *J Clin Invest* 2011;121:3623-34.
- (163) Sihto H, Bohling T, Kavola H, Koljonen V, Salmi M, Jalkanen S, et al. Tumor infiltrating immune cells and outcome of Merkel cell carcinoma: a population-based study. *Clin Cancer Res* 2012;18:2872-81.
- (164) Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Bohling T, Joensuu H. Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:938-45.
- (165) Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol* 1995;33:1000-7.
- (166) Smalley KS. PLX-4032, a small-molecule B-Raf inhibitor for the potential treatment of malignant melanoma. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11:699-706.
- (167) Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 2006;3:995-1000.
- (168) Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006;439:358-62.
- (169) Spagnolo F, Caltabiano G, Queirolo P. Uveal melanoma. *Cancer Treat Rev* 2012.
- (170) Stawowczyk M, Van SS, Kumar KP, Reich NC. The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J Biol Chem* 2011;286:7257-66.
- (171) Suda T, Tsunoda T, Uchida N, Watanabe T, Hasegawa S, Satoh S, et al. Identification of secernin 1 as a novel immunotherapy target for gastric cancer using the expression profiles of cDNA microarray. *Cancer Sci* 2006;97:411-9.
- (172) Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, et al. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000801.
- (173) Tai PT, Yu E, Winquist E, Hammond A, Stitt L, Tonita J, et al. Chemotherapy in neuroendocrine/Merkel cell carcinoma of the skin: case series and review of 204 cases. *J Clin Oncol* 2000;18:2493-9.
- (174) Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, Walters GB, Gudbjartsson DF, Stefansson H, et al. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 2007;317:1397-400.
- (175) Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 1972;105:107-10.
- (176) Tomimaru Y, Eguchi H, Wada H, Noda T, Murakami M, Kobayashi S, et al. Insulin-like growth factor-binding protein 7 alters the sensitivity to interferon-based anticancer therapy in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2010;102:1483-90.
- (177) Tomokuni A, Eguchi H, Tomimaru Y, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, et al. miR-146a suppresses the sensitivity to interferon-alpha in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;414:675-80.

- (178) Torriglia A, Lepretre C. LEI/L-DNase II: interplay between caspase-dependent and independent pathways. *Front Biosci* 2009;14:4836-47.
- (179) Torriglia A, Lepretre C, Padron-Barthe L, Chahory S, Martin E. Molecular mechanism of L-DNase II activation and function as a molecular switch in apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1490-502.
- (180) Trakatelli M, Ulrich C, del M, V, Euvrard S, Stockfleth E, Abeni D. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions. *Br J Dermatol* 2007;156 Suppl 3:1-7.
- (181) Tseng MY, Liu SY, Chen HR, Wu YJ, Chiu CC, Chan PT, et al. Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 promotes oral cancer cell motility and is over-expressed in invasive oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2009;45:771-6.
- (182) Tu Y. The development of new antimalarial drugs: qinghaosu and dihydro-qinghaosu. *Chin Med J (Engl)* 1999;112:976-7.
- (183) Tucker MA. Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:383-95, vii.
- (184) Ugurel S, Houben R, Schrama D, Voigt H, Zapatka M, Schadendorf D, et al. Microphthalmia-associated transcription factor gene amplification in metastatic melanoma is a prognostic marker for patient survival, but not a predictive marker for chemosensitivity and chemotherapy response. *Clin Cancer Res* 2007;13:6344-50.
- (185) Ugurel S, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol* 2001;19:577-83.
- (186) Ugurel S, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U. Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:1282-6.
- (187) Ugurel S, Schadendorf D, Pfohler C, Neuber K, Thoenke A, Ulrich J, et al. In vitro drug sensitivity predicts response and survival after individualized sensitivity-directed chemotherapy in metastatic melanoma: a multicenter phase II trial of the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *Clin Cancer Res* 2006;12:5454-63.
- (188) Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. Chemosensitivity testing in malignant melanoma. *Recent Results Cancer Res* 2003;161:81-92.
- (189) Utikal J, Schadendorf D, Ugurel S. Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res* 2007;298:469-77.
- (190) Van KA, Mascre G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, De GN, et al. Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol* 2009;187:91-100.
- (191) Veness MJ, Harris D. Role of radiotherapy in the management of organ transplant recipients diagnosed with non-melanoma skin cancers. *Australas Radiol* 2007;51:12-20.
- (192) Verhaegen M, Bauer JA, Martin dl, V, Wang G, Wolter KG, Brenner JC, et al. A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species. *Cancer Res* 2006;66:11348-59.

- (193) Wang WS, Chen PM, Hsiao HL, Wang HS, Liang WY, Su Y. Overexpression of the thymosin beta-4 gene is associated with increased invasion of SW480 colon carcinoma cells and the distant metastasis of human colorectal carcinoma. *Oncogene* 2004;23:6666-71.
- (194) Way G, Morrice N, Smythe C, O'Sullivan AJ. Purification and identification of secernin, a novel cytosolic protein that regulates exocytosis in mast cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:3344-54.
- (195) Weeraratna AT. RAF around the edges--the paradox of BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 2012;366:271-3.
- (196) Wellbrock C, Weisser C, Hassel JC, Fischer P, Becker J, Vetter CS, et al. STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells. *Curr Biol* 2005;15:1629-39.
- (197) White MK, Gordon J, Khalili K. The rapidly expanding family of human polyomaviruses: recent developments in understanding their life cycle and role in human pathology. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003206.
- (198) Wong GL, Yiu KK, Wong VW, Tsoi KK, Chan HL. Meta-analysis: reduction in hepatic events following interferon-alfa therapy of chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2010.
- (199) Wu G, Guo Z, Chang X, Kim MS, Nagpal JK, Liu J, et al. LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. *Cancer Res* 2007;67:4123-9.
- (200) Yamada PM, Lee KW. Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C954-C976.
- (201) Yanase N, Kanetaka Y, Mizuguchi J. Interferon-alpha-induced apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-dependent and -independent manner. *Oncol Rep* 2007;18:1031-8.
- (202) Yang YZ, Asawamahasakda W, Meshnick SR. Alkylation of human albumin by the antimalarial artemisinin. *Biochem Pharmacol* 1993;46:336-9.
- (203) Yang YZ, Little B, Meshnick SR. Alkylation of proteins by artemisinin. Effects of heme, pH, and drug structure. *Biochem Pharmacol* 1994;48:569-73.
- (204) Yasumatsu R, Altiok O, Benarafa C, Yasumatsu C, Bingol-Karakoc G, Remold-O'Donnell E, et al. SERPINB1 upregulation is associated with in vivo complex formation with neutrophil elastase and cathepsin G in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L619-L627.
- (205) Yee JK, Friedmann T, Burns JC. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 1994;43 Pt A:99-112.
- (206) Yellin SA, Davidson BJ, Pinto JT, Sacks PG, Qiao C, Schantz SP. Relationship of glutathione and glutathione-S-transferase to cisplatin sensitivity in human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 1994;85:223-32.
- (207) Yi JH, Yi SY, Lee HR, Lee SI, Lim dH, Kim JH, et al. Dacarbazine-based chemotherapy as first-line treatment in noncutaneous metastatic melanoma: multicenter, retrospective analysis in Asia. *Melanoma Res* 2011;21:223-7.
- (208) Young KG, Pinheiro B, Kothary R. A Bpag1 isoform involved in cytoskeletal organization surrounding the nucleus. *Exp Cell Res* 2006;312:121-34.

6. Literaturverzeichnis

- (209) Zeng Q, Subramaniam VN, Wong SH, Tang BL, Parton RG, Rea S, et al. A novel synaptobrevin/VAMP homologous protein (VAMP5) is increased during in vitro myogenesis and present in the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 1998;9:2423-37.
- (210) Zhou C, Pan W, Wang X, Chen T. Artesunate induces apoptosis via a Bak-mediated caspase-independent intrinsic pathway in human lung adenocarcinoma cells. *J Cell Physiol* 2012.
- (211) zur Hausen H. Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol* 1967;1:1174-85.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der <i>ex vivo</i> Chemosensitivitätstestung.....	9
Abb. 2: Übersicht über die verschiedenen T-Antigene des MCV.....	12
Abb. 3: Der einjährige Beifuss (<i>Artemisia annua</i>) und seine Inhaltsstoffe.....	18
Abb. 4: Signifikante Korrelationen zwischen der relativen Quantifizierung von <i>SERPINB1</i> und dem jeweils zugehörigen ICSI.....	57
Abb. 5: Korrelationen zwischen der Expression von <i>SERPINB1</i> und dem ICSI von Paclitaxel und Cisplatin.....	58
Abb. 6: Differentielle Expression von SerpinB1 auf Proteinebene.....	59
Abb. 7: SERPINB1 Expression in Melanomzellen und dem umliegenden Tumorstroma.....	60
Abb. 8: Korrelation der Expression von <i>SERPINB1</i> mit dem ICSI von Paclitaxel und Cisplatin in primären Melanomzelllinien.....	62
Abb. 9: <i>Knockdown</i> von SERPINB1 in drei Melanomzelllinien.....	63
Abb. 10: Kaplan-Meyer-Kurven zum Zusammenhang der Überlebenswahrscheinlichkeit mit dem SerpinB1, LDH und S100 Gehalt und Korrelation zwischen LDH und S100 Gehalt mit der <i>SERPINB1</i> Expression.....	65
Abb. 11: Typ I und Typ II IFNs zeigen einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Proliferation von MCC Zelllinien.....	67
Abb. 12: Type I IFNs induzieren Apoptose in MCC Zelllinien.....	68
Abb. 13: Der <i>knockdown</i> der viralen T-Antigene führt zu einer verminderten Viabilität in MCV+ MCC Zelllinien.....	69

Abb. 14: Die Behandlung MCV+ MCC Zelllinien mit IFN beeinflusst die Expression des MCV LTA und des PML Proteins.....	70
Abb. 15: Multiferon führt zu erhöhter PML Expression in WaGa Zellen.....	71
Abb. 16: Die Behandlung von MCC Xenotransplantaten mit MFN führte zu einem verminderten Wachstum von MCV+ WaGa Tumoren, nicht aber für MCV- UIISO Tumoren.....	72
Abb. 17: MFN induziert in MCV+ WaGa Xenotransplantaten eine erhöhte Expression von <i>cleaved caspase 3</i> und eine Ko-Lokalisation von PML und LTA.....	73
Abb. 18: Induktion und Erhöhung der MHC Klasse I Expression in MCC Zelllinien nach siebentägiger Behandlung mit IFN.....	74
Abb. 19: Induktion und Erhöhung der MHC Klasse I Expression in MCC Xenotransplantaten nach Behandlung mit MFN.....	76
Abb. 20: Artesunate hat einen stärkeren Einfluss auf die Viabilität von MCC Zelllinien als Artemisinin.....	77
Abb. 21: MCC Zelllinien, nicht aber Melanomlinien und Fibroblasten reagieren sensitiv auf die Behandlung mit Artesunate.....	79
Abb. 22: Artesunate bedingte Inhibition der LTA Expression in MCV+ Zelllinien.....	81
Abb. 23: Bei Behandlung von WaGa Xenotransplantaten mit Artesunat kam es zu einer Stagnation des Tumorwachstums im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe.....	82
Abb. 24: Synthese von LEI abgeleiteter DNase II und ihre Funktion in der caspase-unabhängigen Apoptose.....	86
Abb. 25: Direkte und indirekte therapeutische Effekte von IFNs auf MCV+ und MCV-MCC Zelllinien.....	93

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die ausgewählten Kandidatengene, die in Zelllinien aus chemosensitiven und chemoresistenten Melanometastasen differentiell exprimiert werden.....	15
Tab. 2: Übersicht über die verwendeten MCC Zelllinien.....	31
Tab. 3: Verwendete Melanomzelllinien.....	32
Tab. 4: Übersicht über die Korrelationen zwischen den einzelnen individuellen Chemosensitivitätsindices (ICSI) und der jeweiligen zugehörigen relativen Quantifizierung der einzelnen Kandidatenmarker.....	56
Tab. 5: Übersicht über die One-Way-Anova Statistik der MCC-Zelllinien unter Artesunat Behandlung und Einzelvergleich durch Bonferroni's-Multiple-Comparison-Test.....	80

9. Abkürzungen

7-AAD	7-Amino-Actinomycin
aka	<i>also known as</i> ; auch bekannt als
ATM	Artemisinin
ATS	Artesunat
BKV	Budgerigar fledgling disease polyomavirus
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CDK	cyclinabhängige Kinase
CK-20	Zytokeratin 20
CM	Komplettmedium
Cq	quantification cycle (aka Ct = cycle threshold)
Cy3	Cytochrom 3
d. / dest.	destilliert
ds	double stranded (Doppelstrang)
DBD	DNA-binding domain
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTS	digital transcriptome subtraction
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
env	enveloped
<i>et al.</i>	und andere
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter/Scanner
FCS	Fetal Calf Serum
FSC	Forward Scatter
fw	forward; vorwärts
g	Erdbeschleunigung

9. Abkürzungen

gag	gruppenspezifische Antigene
GFP	Green Fluorescent Protein
GRE	glucocorticoid-responsive element
h	Stunde(n)
IFN	Interferon
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral
JCV	<i>JC polyomavirus</i>
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobasenpaare
KIV	KI Polyomavirus
l	Liter
LTA	large T-Antigen
M	Mol
min.	Minute(n)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	molar
MCC	Merkelzellkarzinom
MCV	Merkelzellpolyomavirus
MCV+	Merkelzellpolyomavirus positiv
MCV-	Merkelzellpolyomavirus negativ
mg	Milligramm
MHC I	MHC Klasse I Molekül
ml	Milliliter
MTA	middle T Antigen
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
ori	origin of replication; Replikationsursprung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

9. Abkürzungen

PE	Phycoerythrin
pM	Picomolar
pol	polymerase
PP2A	Protein Phosphatase 2A
qPCR	quantitative PCR
RB	Retinoblastomprotein
rev.	revers(e); rückwärts
RRE	rev-responsive Element
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
scr	scrambled
SE	Standard Error; Standardfehler
sek.	Sekunde(n)
shRNA	small hairpin RNA
ss	single stranded (Einzelstrang)
SSC	Sideward Scatter
sTA	small T Antigen
SV40	Simian Vacuolating Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
u. a.	unter anderem; und anderer
V	Volt
Vol.	Volumen
WUV	WU Polyomavirus
WPRE	woodchuck hepatitis virus regulatory element
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel

10. Publikationen

Willmes C, Adam C, Alb M, Völkert L, Houben R, Becker JC, Schrama D. Type I and Type II interferons impact viability of merkel cell carcinoma cell lines via modulation of the merkel cell polyomavirus T-antigens. *Cancer Res.* 72(8): 2120-8. (2012)

Houben R, Grimm J, **Willmes C**, Weinkam R, Becker JC, Schrama D. Merkel Cell Carcinoma and Merkel Cell Polyomavirus: Evidence for Hit-and-Run Oncogenesis. *J Invest Dermatol.* 132(1): 254-6. (2012)

Willmes C, Adam C, Alb M, Völkert L, Houben R, Becker JC, Schrama D. Interferons affect cellular viability and class I major histocompatibility complex expression in both MCV positive and negative merkel cell carcinoma cell lines. Poster auf der "38. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft dermatologische Forschung". Tübingen. (2011)

Schrama D, Kneitz H, **Willmes C**, Adam C, Houben R, Becker JC. Lack of correlation between IGFBP7 expression and BRAF mutational status in melanoma. *J Invest Dermatol.* 130(3): 897-8. (2010)

Willmes C, Kumar R, Becker JC, Schrama D, Ugurel S. Identification of SerpinB1 as a novel predictive molecular marker for chemosensitivity in melanoma. Poster auf der "37. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft dermatologische Forschung". Lübeck. (2010)

Willmes C, Adam C, Houben R, Schrama D, Becker JC. Influence of interferons on merkel cell carcinoma cell lines. Vortrag auf dem "Emerging Oncogenic Viruses" Kongress. San Pietro in Bevagna, Mandurien, Italien. (2010)

Bauer U, **Willmes C**, Federle W. Effect of pitcher age on trapping efficiency and natural prey capture in carnivorous *Nepenthes rafflesiana* plants. *Ann Bot.* 103(8): 1219-26. (2009)

Willmes C, Kumar R, Becker JC, Schrama D, Ugurel S. Identifikation, Evaluierung und funktionelle Charakterisierung von molekularen Biomarkern der *ex-vivo* Chemosensitivität und des klinischen Chemotherapieerfolgs beim malignen Melanom. Vortrag auf der „19. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft dermatologische Onkologie“. Köln. (2009)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Willmes C, Adam C, Alb M, Völkert L, Houben R, Becker JC, Schrama D. Type I and Type II interferons impact viability of merkel cell carcinoma cell lines via modulation of the merkel cell polyomavirus T-antigen. *Cancer Res.* 72(8): 2120-8. (2012)

11. Lebenslauf

12. Eidesstattliche Erklärung

Diese Arbeit wurde von November 2008 bis März 2012 an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Therapie kutaner Tumoren: Identifizierung molekularer Biomarker der *ex vivo* Chemosensitivität des malignen Melanoms und Evaluierung der Wirkungsweise von Interferonen und Artemisininen auf das Merkelzellkarzinom“ selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Die Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Weiterhin habe ich keine weiteren akademischen Grade, außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten, erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, im Juli 2013

13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jürgen C. Becker und Prof. Dr. Selma Ugurel-Becker für die Bereitstellung der beiden spannenden Themengebiete, dem beständigen Austausch, die Diskussion der Ergebnisse sowie ihr entgegengebrachtes Vertrauen. Bei Prof. Becker möchte ich mich zusätzlich herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens dieser Arbeit bedanken.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. J. Engstler für seine Hilfsbereitschaft und das Übernehmen des Zweitgutachtens.

Ebenfalls großer Dank gilt Frau Prof. Dr. E.-B. Bröcker, der ehemaligen Direktorin der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, für die Möglichkeit der Promotion in Ihrem Hause und Herrn Prof. Dr. M. Goebeler, dem jetzigen Direktor der Klinik, für seine Unterstützung in den letzten Monaten dieser Arbeit.

Mein besonders herzlicher Dank gilt David für die ständige Diskussion und Hilfe bei auftretenden Problemen sowohl im wissenschaftlichen als auch methodischen Bereich, sowie die Herberge bei den Besprechungsterminen in Graz.

Großer Dank gilt auch Roland, der mir immer wieder - gerade in den letzten Monaten der Arbeit - mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Christian, Miriam und Ingolf, euch vielen Dank für die Diskussion und den Austausch über unsere wissenschaftliche Arbeit, die ständige schnelle und unkomplizierte Hilfe während der Laborarbeit und beim Korrekturlesen, sowie die vielen spaßigen Aktionen in den letzten Jahren.

Claudia, Lena, Michelle, Eva-Maria, Katharina, Sue und Kerstin; vielen Dank für euren stetigen Einsatz im Laborbetrieb und die unzähligen Male, die ihr mich unterstützt habt.

13. Danksagung

Allen aktuellen und ehemaligen Diplomanden, besonders Rita, Anne, Cathrin, Sabrina und Andi, vielen lieben Dank für die gute Zusammenarbeit während unserer Laborzeit und die Organisation der Spiele-Abende.

Herzlichen Dank auch an Daniela, Lisa, Eva, Anne, Anja, Nis, Stefan, Anand, Ebi, Wolfram und Christian für Ihre Freundschaft und die aufmunternden Worte während der letzten Jahre.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für Ihre Unterstützung während der Promotion und der gesamten vorangegangenen Studienzeit. Ohne euch hätte ich all das niemals geschafft.