

Institut für Genetik der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Ursprünge epigenetischer Veränderungen in
tumorartigen neuroendokrinen Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Naturwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen



vorgelegt von

Herrn Dipl. Biochem. Christoph Lahtz

geboren am 27.02.1980 in Bad Oldesloe

Gießen 2010

Angefertigt am Institut für Genetik des Fachbereichs Biologie und Chemie
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan des Fachbereichs

Biologie und Chemie: Prof. Dr. V. Wolters

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Dammann

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Renkawitz

Meiner Familie und meiner Freundin gewidmet

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:

*Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in
das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzwerfen.*

*Albert Einstein (*1879-†1955)*

**Ursprünge epigenetischer Veränderungen in
tumorartigen neuroendokrinen Zellen**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

Lahtz C, Helmbold P, Enk A, Herrmann-Trost P, Marsch W, Kutzner H, Dammann RH (2009a). *Frequent occurrence of RASSF1A promoter hypermethylation and Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. Mol Carcinog* **48**: 903-909

Lahtz C, Helmbold P, Herpel E, Schnabel PA, Dammann RH (2009b). *Frequent hypermethylation of RASSF1A tumour suppressor gene promoter and presence of Merkel cell polyomavirus in small cell lung cancer. Eur J Cancer* **45**: 2207-2211

Lahtz C, Stranzenbach R, Fiedler E, Helmbold P, Dammann RH (2010). *Methylation of PTEN as a prognostic factor in malignant melanoma of the skin. J Invest Dermatol* **130**: 620-622

Die Vorstellung der Ergebnisse fand auf folgenden Kongressen statt:

Internationale Kongresse:

XX International Congress of Genetics, Berlin; 07/2008

Epigenetic changes in skin carcinogenesis.

Lahtz C, Stranzenbach R, Fiedler E, Helmbold P, Dammann RH

Nationale Kongresse:

Annual Conference of the German Genetics Society, Cologne; 09/2009

Frequent occurrence of RASSF1A promoter hypermethylation and Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma.

Lahtz C, Helmbold P, Enk A, Herrmann-Trost P, Marsch W, Kutzner H, Dammann RH

Annual Conference of the German Genetics Society, Cologne; 09/2009

Frequent hypermethylation of RASSF1A tumor suppressor gene promoter and presence of Merkel cell polyomavirus in small cell lung cancer.

Lahtz C, Helmbold P, Herpel E, Schnabel PA, Dammann RH

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Allgemeine Tumorentstehung	1
1.1.1 Epigenetische Regulationsmechanismen	2
1.2 Das diffuse neuroendokrine System	3
1.2.1 Tumore des diffusen neuroendokrinen Systems	3
1.2.1.1 Das maligne Melanom	3
1.2.1.2 Das kleinzelliges Lungenkarzinom	6
1.2.1.3 Das Merkelzellkarzinom	7
1.3 Polyomaviren	9
1.3.1 Das <i>Simian virus 40</i>	9
1.3.2 Das Merkelzellpolyomavirus	10
1.4 Die untersuchten Tumorsuppressorgene	10
1.4.1 <i>RASSF1A</i>	10
1.4.2 <i>CDKN2A</i>	11
1.4.3 <i>PTEN</i>	11
1.4.4 <i>p73</i>	12
1.5 Zielsetzung	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Material	14
2.1.1 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials	14
2.1.1.1 Malignes Melanom Paraffingewebe	14
2.1.1.2 Merkelzellkarzinom Paraffingewebe	15
2.1.1.3 Kleinzelliges Lungenkarzinom Paraffingewebe	16
2.1.1.4 Benignes Nävuszellnävus Paraffingewebe	16
2.1.1.5 Blutproben	16

2.1.1.6	Humane Zelllinien _____	17
2.1.2.	Chemokompetente <i>Escherichia coli</i> – Stämme (<i>E. coli</i>) _____	17
2.1.3	Vektoren _____	18
2.1.4	Oligonukleotide _____	18
2.1.5	Enzyme _____	19
2.1.6	Vorgefertigte Systeme (Kits) _____	20
2.1.7	Chemikalien _____	20
2.1.8	Gebrauchslösungen _____	22
2.1.8.1	Kulturmedien für chemokompetente <i>E. coli</i> – Stämme und humane Zellen _____	24
2.1.9	Gebrauchswaren _____	24
2.1.10	Sterilisation/Autoklavierung von Lösungen und Gebrauchswaren _____	25
2.1.11	Geräte _____	25
2.1.12	Verwendete Software _____	27
2.2	Methoden _____	28
2.2.1	Zellkultur _____	28
2.2.1.1	Supplementierung von humanen Zellen mit Interleukin-6 _____	28
2.2.1.2	Behandlung von humanen Zellen mit UV-B Licht _____	28
2.2.2	Präparation von DNA und RNA _____	29
2.2.2.1	Isolation genomischer DNA aus Zelllinien _____	29
2.2.2.2	Isolation von RNA aus Zelllinien _____	30
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA _____	31
2.2.3.1	Spektrometrische Konzentrationsbestimmung _____	31
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung durch empirischen Vergleich _____	32
2.2.4	Gelelektrophorese _____	33
2.2.5	<i>In vitro</i> DNA-Methylierung _____	33
2.2.6	Bisulfit-Konvertierung der DNA _____	34
2.2.7	<i>Polymerase-chain-reaction</i> (PCR) _____	35
2.2.7.1	Allgemein _____	35
2.2.7.2	<i>Methylation specific</i> PCR (MSP) _____	35
2.2.7.3	<i>Combined bisulfite-restriction-analysis</i> (COBRA) _____	36
2.2.7.4	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) _____	37
2.2.7.5	Parameter für PCR basierende Methylierungs- und Expressionsanalysen _____	38
2.2.8	Restriktion _____	40
2.2.8.1	Restriktion für <i>combined bisulfite-restriction-analysis</i> _____	40
2.2.8.2	Restriktion für Klonierungen _____	41
2.2.8.3	Kontrollrestriktion für Vektor-Konstrukte _____	41
2.2.9	Gelextraktion _____	42
2.2.10	Vektor-Konstrukt Klonierung _____	43
2.2.10.1	Ligation _____	43
2.2.10.2	Transformation von chemokompetenten <i>E. coli</i> _____	44

2.2.10.3	Vektor-Konstrukt-Isolation aus <i>E. coli</i>	44
2.2.11	Transfektion von humanen Zelllinien	45
2.2.12	Statistische Verfahren	46
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Promoter-Methylierungsstatus-Analysen von Tumorsuppressorgenen in neuroendokrinen Tumoren	50
3.1.1	Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen in Kontrollgewebe	51
3.1.1.1	Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen in Nävuszellnävus-Gewebe	51
3.1.1.2	Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen in Blutproben	53
3.1.1.3	Zusammenfassung der Methylierungsdaten der Nävuszellnävus-Gewebeproben und der Blutproben	54
3.1.2	Hypermethylierung von <i>PTEN</i> im malignen Melanom	55
3.1.3	Hypermethylierung von <i>RASSF1A</i> im Merkelzellkarzinom	57
3.1.4	Hypermethylierung von <i>RASSF1A</i> , <i>CDKN2A</i> und <i>PTEN</i> im kleinzelligen Lungenkarzinom	59
3.1.5	Zusammenfassung der Methylierungsdaten	60
3.2	Statistische Auswertung der klinisch-pathologischen Charakteristika und Mutationsanalysen im malignen Melanom	63
3.2.1	Korrelationsanalysen der Mutationsdaten von <i>BRAF</i> / <i>NRAS</i> und den Methylierungsbefunden mit den klinisch-pathologischen Daten im malignen Melanom	63
3.2.2	Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier im malignen Melanom	64
3.2.3	Cox Regressionsanalysen	66
3.3	Analysen auf eine virale Präsenz von Polyomaviren in neuroendokrinen Tumoren	69
3.3.1	Virale Präsenz von Polyomaviren in Kontrollgewebe	69
3.3.1.1	Virusanalyse von Polyomaviren in Nävuszellnävus-Gewebe	70
3.3.1.2	Virusanalyse von Polyomaviren in Blut	71
3.3.2	Präsenz des Merkelzellpolyomavirus im malignen Melanom	72
3.3.3	Präsenz des Merkelzellpolyomavirus im Merkelzellkarzinom	73
3.3.4	Präsenz des Merkelzellpolyomavirus im kleinzelligen Lungenkarzinom	73
3.3.5	Zusammenfassung der Virusanalysen	74
3.4	Auswirkungen auf den Methylierungsstatus durch exo- und endogene Faktoren	77
3.4.1	<i>Latent membrane proteine 1</i>	77
3.4.1.1	Keine Auswirkungen auf den Methylierungsstatus einer transienten Transfektion von <i>LMP-1</i> in IGR-I Zellen	78
3.4.2	DNA-Methyltransferase delta 3b Variante 4	80
3.4.2.1	Keine Auswirkungen auf den Methylierungsstatus einer transienten Transfektion von <i>ΔDNMT3b4</i> in IGR-I Zellen	80

3.4.2.2	Eine stabile Transfektion von <i>ADNMT3b4</i> erhöht die Expression von <i>RASSF1A</i> , <i>PTEN</i> und <i>IL-6</i>	83
3.4.3	Mittleres ultraviolettes Licht beeinflusst die Expression von <i>IL-6</i> und Methyltransferasen	85
3.4.4	Exogene Supplementierung des Cytokins Interleukin-6	91
4	DISKUSSION	96
4.1	Hypermethylierung von <i>RASSF1A</i> und <i>PTEN</i> im malignen Melanom	96
4.1.1	Erhöhte <i>PTEN</i> Methylierung durch Sonnenexposition korreliert negativ mit der Überlebenswahrscheinlichkeit	98
4.1.2	Kein Einfluss von UV Licht auf die <i>BRAF</i> Mutagenese im malignen Melanom	100
4.2	Hypermethylierung von <i>RASSF1A</i> im Merkelzellkarzinom	101
4.3	Hypermethylierung von <i>RASSF1A</i> im kleinzelligen Lungenkarzinom	102
4.4	Virusanalysen in neuroendokrinen Tumoren	103
4.4.1	Präsenz des Merkelzellpolyomavirus im malignem Melanom, Merkelzellkarzinom und kleinzelligem Lungenkrebs	104
4.5	Endo- und exogene methylierende Noxen	105
4.5.1	<i>LMP-1</i> und <i>ADNMT3b4</i> zeigen keine Auswirkungen auf den Methylierungsstatus	105
4.5.2	UV-B löst einen Anstieg von <i>IL-6</i> und <i>DNMT1</i> aus	108
4.5.3	Supplementiertes <i>IL-6</i> zeigt keine Auswirkungen auf den Methylierungsstatus	110
5	ZUSAMMENFASSUNG	112
5.1	Summary	113
6	ANHANG	114
6.1.	Abbildungen	114
6.2.	Tabellen	117
7	LITERATURVERZEICHNIS	136

Abkürzungsverzeichnis

α	griech.: <i>alpha</i>
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
<i>ad</i>	zufügen (lat.: zu)
ALM	<i>acral-lentiginous melanoma</i> (dtsch.: akrolentiginöses Melanom)
Amp.	Ampicillin
ATP	Adenosin-triphosphat
β	griech. beta
bp	Basenpaar
BS	Bisulfit-behandelt
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (dtsch.: Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
<i>CDKN2A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> -Gen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	humanes Cytomegalie Virus , Promotorregionen für virale RNA Polymerasen (in dieser Arbeit als Sequenzierprimer verwendet)
COBRA	<i>combined bisulfite-restriction-analysis</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin Dinukleotid
<i>CTCF</i>	<i>CCCTC-binding factor</i> -Gen
CK20	Cytokeratin 20
Δ	griech.: <i>delta</i> steht für Deletion
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	desoxyribonucleic acid (dtsch.: Desoxyribonukleinsäure)

DNase I	Desoxyribonuklease I
DNES	diffuses neuroendokrine System
DNMT	DNA Methyltransferase
dtsch.	deutsch
dNTPs	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus (Vgl. HHV4)
EDTA • Na ₂	Di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat
Endkonz.	Endkonzentration
<i>et al.</i>	<i>et alterae</i> (dtsch.: und andere)
EthBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EtOH _{DEPC}	Ethanol mit H₂O_{DEPC} verdünnt
FA	Formamid
FCS	<i>fetal calf serum</i> (dtsch.: fötales Kälberserum)
<i>FHIT</i>	<i>fragile histidine triad</i>-Gen
g	Gramm
<i>g</i>	<i>g</i>-Faktor (1 <i>g</i> = 9,81 m/s²)
G	Guanin
G418	Geneticin
<i>GAPDH</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>-Gen
h	<i>hour</i> (dtsch.: Stunde)
HaCat	<i>human adult low calcium temperature keratinocytes</i>
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HF53	humane Fibroblasten
HHV 4	humanes Herpes Virus 4 (Vgl. EBV)
HHV 5	humanes Herpes Virus 5 (Vgl. CMV)
HPF	<i>high power field</i> (mikroskopisches Gesichtsfeld bei größter Auflösung; 40x)
i.d.R.	in der Regel
i.e.S.	im eigentlichen Sinne
inkl.	inklusive
IL-6	Interleukin-6
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Kan.	Kanamycin
kb	Kilobasen

kSm	kein Signifikanztest möglich
l	Liter (1 Kubikdezimeter)
LB	<i>lysogeny broth</i>
LMM	<i>lentigo-maligna-melanoma</i> (dtisch.: Lentigo-maligna-Melanom)
LMP-1	<i>latent mambrane proteine 1</i>
Lsg.	Lösung
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	molar (Stoffmengenkonzentration mol/l)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
max.	maximal
MCC	<i>Merkel cell carcinoma</i> (dtisch.: Merkelzell Karzinom)
MCPyV	<i>Merkel cell polyomavirus</i> (dtisch.: Merkelzellpolyomavirus)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
methyI.	methyliert
min	Minute
MLV	<i>murine leukemia virus</i>
MM	<i>malignant melanoma</i> (dtisch.: malignes Melanom)
mol	Stoffmenge (6,02214179 (30) • 10 ²³ Teilchen/mol)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSP	<i>methylation specific PCR</i>
n	Anzahl und nano (10 ⁻⁹)
N	Standardisiertes IUPAC Symbol für <i>any</i> (alle Nukleotide möglich: G, A, C oder T)
na	nicht analysiert
NaOAc.	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCT	nationales Centrum für Tumorerkrankungen, Heidelberg
NET	neuroendokriner Tumor
NHEM	<i>normal human epidermal melanocytes</i>
NH ₄ OAc.	Ammoniumacetat
nk	nicht klassifiziert
NMM	<i>nodular malignant melanoma</i> (dtisch.: noduläres malignes Melanom)
NP40	Nonidet P40

Nr.	Nummer
NZN	N ävuszell n ävus
NZY	NZ Amine <i>yeast extract</i>
OD	o ptische D ichte
p	P hosphatgruppe
<i>p</i>	in Begriff <i>p</i> -Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit (Fehler erster Art)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (dtsch.: Polymerase-Kettenreaktion)
Pen.	Penicillin
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (negativ dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration)
PS	P enicillin- S treptomycin Lösung
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tensin homolog-Gen</i>
<i>PTPRG</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, G-Gen</i>
R	Standardisiertes IUPAC Symbol für Purine (Adenin oder Guanin)
<i>RASSF1A</i>	<i>RAS-association domain family 1A-Gen</i>
RNA	r ibonucleic acid (dtsch.: Ribonukleinsäure)
RNase A	R ibonuklease A
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	R aum t emperatur
RT-PCR	<i>reverse transkriptase PCR</i>
s	S ekunde
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> (dtsch.: Plattenepithelkarzinom)
SCLC	<i>small cell lung cancer</i> (dtsch.: kleinzelliger Lungenkrebs)
SDS	sodium d odecyl sulfat (dtsch.: Natriumdodecylsulfat)
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
sog.	so genannt(e,er,es)
spez.	s peziell
sq.	<i>semi-quantitativ</i>
SSM	<i>superficial spreading melanoma</i> (dtsch.: oberflächlich spreitendes Melanom)
Strep.	S treptomycin
SV40	<i>Simian virus 40</i> (dtsch.: Affenvirus 40)
T	T hymिन

T3,T7	Promotorregionen für virale RNA Polymerasen (in dieser Arbeit als Sequenzierprimer verwendet)
t	Zeit (engl.: <i>time</i>)
T _A	<i>annealing-temperature</i>
Tab.	Tabelle
TANS	<i>thorax, upper arm, neck, scalp</i> ; Lokalisierung eines Tumors
TBE	Tris-Borat-EDTA • Na₂-Puffer
TE	Tris-EDTA • Na₂-Puffer
Temp.	Temperatur
<i>TP73</i>	<i>tumor protein p73</i> -Gen
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
<i>TFF-1</i>	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
U	Uracil
unmethyl.	unmethyliert
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
var.	variable
verg.	vergällt
vs.	<i>versus</i> (im Vergleich zu)
Vgl.	Vergleich
Vol.	Volumen
WHO	World Health Organisation
Y	Standardisiertes IUPAC Symbol für Pyrimidine (Cytosin oder Thymin)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Das Leben auf der Erde begann vor ca. 3,5 bis 3,9 Milliarden Jahren. Komplexe mehrzellige Lebewesen traten aber erst vor etwa 600 Millionen Jahren auf. Seit dieser Zeit müssen sich einzelne differenzierte Zellen eines Lebewesens regenerieren können, damit der gesamte Organismus überleben kann. Seit dieser Zeit kann es in Organismen zu Fehlern der Zellreparatur kommen. Seit dieser Zeit können genetische Veränderungen zu einer fehlerhaften Regulation der Zellteilungen führen.

1.1 Allgemeine Tumorentstehung

In Deutschland war 2005 Krebs mit 26,6% und 224.477 Todesfällen die zweithäufigste Todesursache (WHO). Die Erkrankung Krebs bezeichnet eine bösartige Gewebsneubildung, sog. maligne Neoplasie. Alle malignen Neoplasien weisen hinsichtlich des Ursprungsgewebes eine erhöhte Proliferation auf. Weiterhin haben die entarteten Zellen die Fähigkeit verloren in den programmierten Zelltod, die sog. Apoptose, einzutreten, darüber hinaus können sie die Fähigkeit entwickeln sich aus dem Gewebeverband zu lösen und über den Blut- bzw. Lymphkreislauf zu metastasieren. Durch dieses unkontrollierte Wachstum infiltrieren die entarteten Zellen gesundes Gewebe und zerstören so die Gewebsstruktur. Dadurch verlieren die betroffenen Gewebe und Organe ihre Funktionalität, was letztendlich zum Tod des Organismus führt.

Als Auslöser für diese gestörte zelluläre Programmierung sind genetische Veränderungen verantwortlich. Darunter fallen Punktmutationen, Deletionen, Duplikationen, Insertionen und Translokationen sowie Chromosomenaberrationen und Virusinfektionen (zur Hausen *et al.*, 1975). Diese Ereignisse beeinflussen die DNA-Sequenz und verändern so die Funktion und Regulation der entstandenen Genprodukte oder führen zu einem vollständigen Funktionsverlust.

Dabei kommen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen eine besondere Bedeutung zu. Werden sog. Protoonkogene durch eine Mutation dahingehend verändert, dass sie ihre normalen Funktionen der Zellteilung, des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung nicht mehr korrekt ausführen und nicht mehr auf normale zelluläre Signale reagieren, werden sie als Onkogene bezeichnet. Onkogene führen so zu unkontrolliertem Tumorwachstum.

Die Genprodukte von Tumorsuppressorgenen hingegen kontrollieren die Zellteilung und den Eintritt in die Apoptose von Zellen. Verlieren Tumorsuppressorgene ihre Funktion, werden entartete Zellen

nicht mehr erkannt und können sich teilen und etwaige Mutationen auf die Tochterzellen übertragen. So können sich in künftigen Zellteilungen Mutationen akkumulieren.

Damit eine Mutation sich auf die Funktion eines Gens auswirken kann, müssen beide Allele des Gens durch eine Mutation betroffen sein. Dadurch wird die Funktion bzw. Regulation des Gens inaktiviert. Dies hat Alfred G. Knudson in seiner *two hit hypothesis* beschrieben (Knudson, 1971). Der Hypothese zur Folge reicht der Funktionsverlust nur eines Allels nicht aus, damit die Funktion eines Tumorsuppressorgens vollständig verloren geht. Die Tumorsuppressorgene nehmen eine Schlüsselposition bei der Entstehung von malignen Neoplasien ein. Kommt es zunächst zu einer Aktivierung eines Onkogens, entsteht nicht zwangsläufig Krebs, solange Tumorsuppressorgene aktiv sind und derart mutierte Zellen durch die Apoptose eliminieren. Kommt es allerdings zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, führt eine Aktivierung eines Onkogens zur Ausbildung von Tumoren.

1.1.1 Epigenetische Regulationsmechanismen

Eine mögliche Regulation der Tumorsuppressorgene ist in epigenetischen Mechanismen zu finden. Epigenetische Regulationsmechanismen beruhen im Allgemeinen auf vererbaren genetischen Veränderungen, die nicht auf einer Mutation der DNA basieren. Diese epigenetischen Veränderungen sind grundsätzlich reversibel, können bei einer Zellteilung jedoch auf die Tochterzelle übertragen werden (Laird, 2005).

Epigenetische Inaktivierungen können zum einen stattfinden, indem das Chromatin, in dem sich das betreffende Gen befindet von der lockeren und aktiven Chromatinstruktur, dem sog. Euchromatin, in eine dichte und inaktive Chromatinstruktur, dem sog. Heterochromatin, umstrukturiert wird. Zum anderen kann eine Inaktivierung durch Methylierungen am 5'-Kohlenstoff des Cytosins in 5'-CpG-3'-Dinukleotiden der CpG-Inseln in der Promotorregion stattfinden (Cheng *et al.*, 2003; Hendrich and Bird, 1998; Zhu and Otterson, 2003). Methylierungen nehmen den überwiegenden Anteil epigenetischer Regulation in Säugetieren ein (Baylin *et al.*, 2001). In Tumoren sind im Vergleich zu normalen Zellen Tumorsuppressorgene gehäuft durch Methylierungen epigenetisch inaktiviert

In der Zygote entstehen die Methylierungen bei der *de novo* Methylierung durch die DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b. Während der folgenden Zellteilungen wird das Methylierungsmuster durch die *maintenance* DNA-Methyltransferase DNMT1 aufrecht-erhalten, indem sie den hemimethylierten Strang der DNA als *template* benutzt, um eine Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin auf den 5'-Kohlenstoff eines Cytosins des neu replizierten DNA-Stranges zu transferieren (Bestor, 2000; Jeltsch, 2002).

DNA Methylierungen sind essential für die Entwicklung (Jaenisch and Bird, 2003; Okano *et al.*, 1999). So regulieren Methylierungen die X-Chromosomeninaktivierung, das *genomic imprinting*, und verhindern die Transkription von Retroviren und Transposons (Robertson and Wolffe, 2000).

1.2 Das diffuse neuroendokrine System

Das diffuse neuroendokrine System (DNES) umfasst die Gesamtheit aller neuroendokrinen Zellen, die aus der Neuralleiste bzw. dem neuralen Ektoderm entstammen. Dabei treten die Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems einzeln oder in kleinen Gruppen verstreut in den Epithelien verschiedener Organe auf, vor allem dem Magen-Darm-Kanal, aber auch der Lunge, im Harn- und Geschlechtsapparat und in der Haut. Die Zellen des DNES werden auch als APUD (*amine precursor uptake and decarboxylation*) Zellen bezeichnet. Sie können Amine und deren Vorstufen aufnehmen und decarboxylieren. Somit können sie Polypeptidhormone und biogene Amine synthetisieren (Pearse, 1968).

Die neuroendokrinen Zellen des DNES können entarten und so zwar eher seltene Tumore, aber aufgrund ihrer gewebefremden verstreuten Lage oft besonders bösartige Tumore bilden. Die meisten sog. Apudome kommen im Magen-Darm-Trakt vor (z.B. Insulinom, Glucagonom und Gastrinom). Darüber hinaus entstehen auch das maligne Melanom, das kleinzellige Lungenkarzinom und das Merkelzellkarzinom aus neuroendokrinen Zellen.

1.2.1 Tumore des diffusen neuroendokrinen Systems

1.2.1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist eine bösartige Neoplasie der Melanocyten. Die Melanocyten gehen aus den Melanoblasten hervor, die zum diffusen neuroendokrinen System gehören und direkt von der Neuralleiste abstammen. Die Melanocyten sind in der *Stratum basale* der Epidermis angesiedelt. Ihre Aufgabe ist die Produktion von Melanin über die Vorstufen Tyrosin und L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). Das Melanin wird in Form von Melanosomen über pinocytotische Prozesse an die umgebenden Keratinocyten abgeben, um der Haut einen Schutz gegen ultraviolette Strahlung zu verleihen. Die verzweigten Melanocyten bilden zusammen mit den umgebenden Keratinocyten eine epidermale Melanocyteneinheit (Abb. 1-1).

Da die Melanocyten Abkömmlinge neuroendokriner Zellen sind und daher einzeln verstreut im Epithel vorkommen, bilden sie auch keine Desmosomen aus, was bei entarteten Melanocyten dazu führt, dass sich die Zelle schnell aus dem umliegenden Gewebe lösen und metastasieren kann.

Die Häufigkeit von Hautkrebs steigt in den letzten Jahren stetig an (Parkin *et al.*, 2005). Nach Schätzungen treten pro Jahr mehr als 130.000 Fälle von malignem Melanom weltweit auf (WHO). Die höchsten Zuwachsraten treten mit 50-60 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Australien auf, gefolgt von den USA mit zehn bis 25 und Mitteleuropa mit zehn bis zwölf Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Skandinavien hat in Europa die höchste Neuerkrankungsrate mit ca. 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Garbe and Blum, 2001). Der Anstieg der Inzidenz des malignen Melanoms ist dabei größer als alle anderen Neoplasien (de Braud *et al.*, 2003). Zum Beispiel steigt die Häufigkeit in den USA um ca. 4% jährlich (Rager *et al.*, 2005). Insgesamt ist das maligne Melanom für etwa 90% der Mortalität aller Hautkrebsentitäten verantwortlich.

Das maligne Melanom wird durch das Aussehen, die Oberflächenbeschaffenheit, Farbe, Form und Größe in verschiedene Subtypen unterschieden. Zu den wichtigsten Subtypen, die 95% aller malignen Melanome ausmachen, zählen das oberflächlich spreitende Melanom (*superficial spreading melanoma*; SSM), das noduläre maligne Melanom (*nodular malignant melanoma*; NMM), das Lentigo-maligna-Melanom (*lentigo-maligna-melanoma*; LMM) und das akrolentiginöse Melanom (*acral-lentiginous melanoma*; ALM) (Perniciaro, 1997).

Die wichtigste Ursache für das maligne Melanom ist neben genetischen Faktoren die UV-Lichtexposition. Dabei hat eine frühkindliche Exposition erheblichen Einfluss auf das spätere Auftreten eines Melanoms (Autier and Dore, 1998). Weiterhin hat eine akut-intermittierende UV-Lichtexposition einen größeren Einfluss auf eine Melanomentstehung als eine chronisch-kumulative (Berking, 2005).

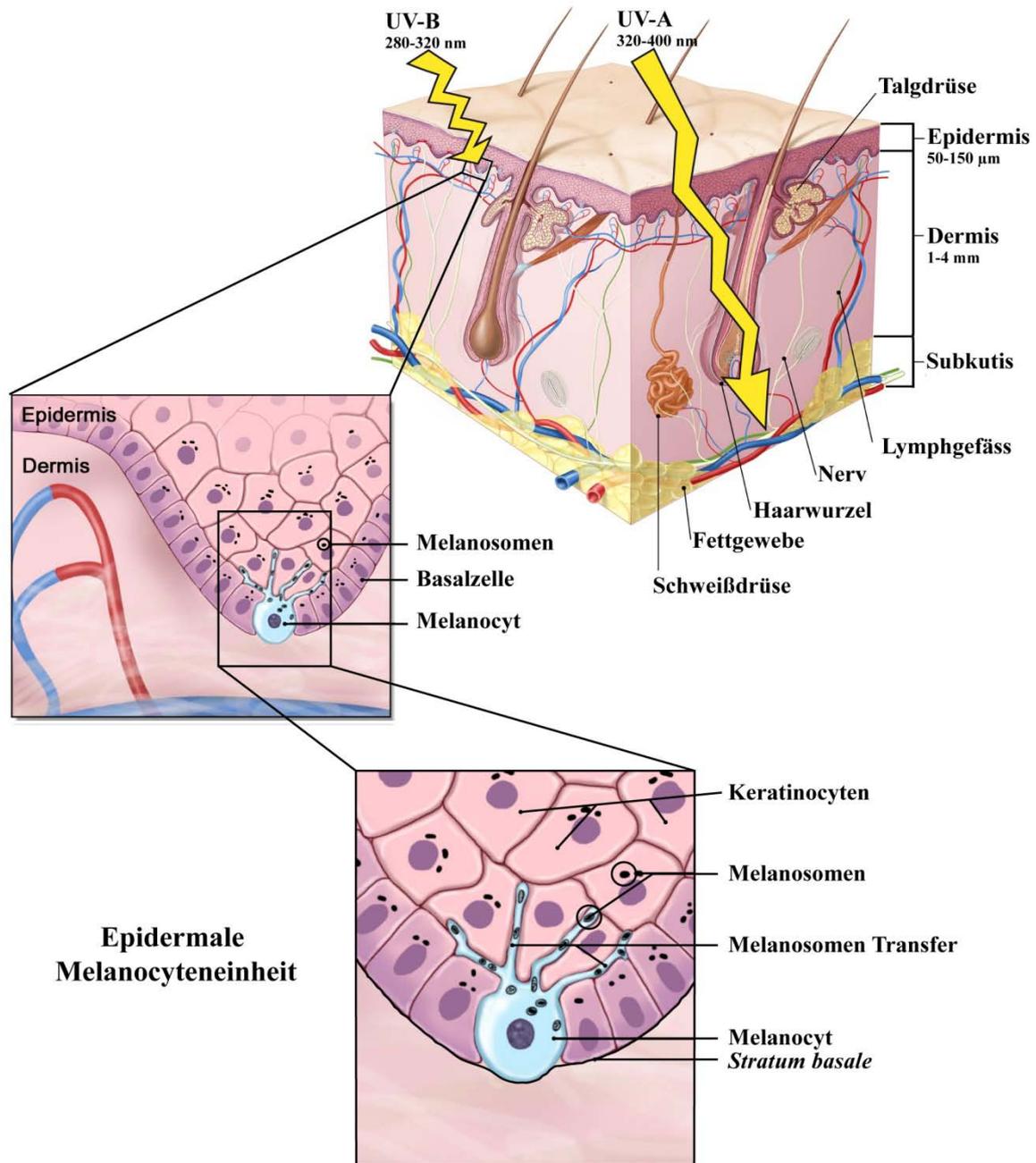


Abbildung 1-1: Lokalisierung von Melanocyten in menschlicher Haut. Der Querschnitt zeigt die Haut mit ihren morphologischen Merkmalen von der Epidermis über die Dermis bis zur Subkutis. Die gelben Pfeile zeigen die Eindringtiefe von UV-A (Epidermis bis zur *Stratum basale*) und UV-B Strahlung (bis zur Subkutis). Der zweite und dritte Vergrößerungsausschnitt zeigen die Lage der Melanocyten und den morphologischen Aufbau der epidermalen Melanocyteneinheit, bestehend aus einem Melanocyt und benachbarten Keratinocyten.

Das Bild ist modifiziert nach <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000579033.jpg>

1.2.1.2 Das kleinzellige Lungenkarzinom

Das Bronchialkarzinom allgemein ist in den Industrienationen mit einer Inzidenz von 60 pro 100.000 Einwohner die häufigste Ursache an einem Krebsleiden zu versterben (Jemal *et al.*, 2006; Jemal *et al.*, 2002; Jemal *et al.*, 2004). Es wird weltweit geschätzt, dass jährlich 1,2 Millionen Menschen mit dieser Krankheit diagnostiziert werden, was 12,3% der gesamten Krebserkrankungen entspricht. Die meisten Patienten bekommen einen Tumor zwischen dem 55. und 60. Lebensjahr. Lediglich 5% sind bei der Diagnose jünger als 40 Jahre alt (Herold G *et al.*, 2006). Insgesamt hat das Bronchialkarzinom eine sehr ungünstige Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur 13% (Mountain, 1997).

Die Bronchialkarzinome werden zum einen nach einer WHO-Klassifikation von 1999 in differenzierte und nicht differenzierte Karzinome unterteilt (Brambilla, 1999; Shimosato, 2002). Dabei wird das kleinzellige Lungenkarzinom zu den Undifferenzierten gezählt.

Histologisch werden die Bronchialkarzinome in kleinzellige (*small cell lung cancer*; SCLC) und nicht-kleinzellige (*non-small cell lung cancer*; NSCLC) Karzinome unterteilt (Beasley *et al.*, 2005). Das NSCLC tritt mit 80-85% wesentlich häufiger auf als das SCLC mit 15% bis 20%.

Das SCLC ist somit die zweithäufigste Lungenkrebsentität (Parker *et al.*, 1997). In den letzten 20 Jahren sinkt die Inzidenz des SCLCs (Parkin *et al.*, 2001). Das SCLC hat eine sehr schlechte Prognose und liegt bei 70% der Patienten bei der Diagnosefeststellung bereits metastasiert vor (Iannuzzi and Scoggin, 1986). Dabei sind bevorzugt die Leber, das Gehirn, die Nebennieren und die Knochen, vor allem die Wirbelsäule betroffen (Herold G *et al.*, 2006). Unbehandelt liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei weniger als 1% (Hyde *et al.*, 1965).

Das SCLC entwickelt sich bevorzugt zentral in der Lunge und hat seinen Ursprung in entarteten neuroendokrinen APUD-Zellen vom *Kultschitzky-Typ* (K-Zellen) (Shimosato, 2002). Aufgrund ihres neuroendokrinen Ursprungs können die K-Zellen Hormone produzieren. In nicht entarteten Zellen werden u.a. Bombesin und Serotonin produziert. Sind die Zellen entartet können sie jedoch aufgrund ihrer neuroendokrinen Herkunft Hormone produzieren, die normalerweise nicht in der Lunge produziert werden, und können so im Fall einer ACTH (Adrenokortikotropes Hormon) Produktion zum *Cushing-Syndrom* führen. Weiter können eine Hyperkalziämie oder das Syndrom der inappropriaten antidiuretischen Hormonsekretion (SIADH) auftreten. Die Bezeichnung kleinzellig rührt von der lichtmikroskopischen Morphologie der Zellen her. Diese sind etwa zwei- bis dreimal größer als Lymphozyten und sind spindelförmig, weswegen sie auch Haferzellen genannt werden (Lorenz, 1994).

Das kleinzellige Lungenkarzinom tritt vor allem bei starken Rauchern auf. Bereits 1952 wurde eine Korrelation zwischen dem Karzinogen des inhalativen Rauchens und einer Lungenkrebskrankung vermutet (Doll and Hill, 1952). Diese Vermutung wird heute als bewiesen angesehen. So werden nach den Studien von Doll, Hammond und McLaughlin ca. 90% der Lungenkarzinome durch Rauchen ausgelöst (Doll *et al.*, 1994; Hammond, 1966; McLaughlin *et al.*, 1995).

1.2.1.3 Das Merkelzellkarzinom

Das Merkelzellkarzinom (*Merkel cell carcinoma*; MCC) geht aus der namensgebenden Merkelzelle hervor. Die Merkelzelle wurde erstmals 1875 von Johann Friedrich Sigmund Merkel, einem deutschen Anatom, in Fröschen und Säugern entdeckt und beschrieben (Merkel, 1875). Die langsam adaptierende Merkelzelle dient in der Haut als Tastzelle für Druck- und Berührungsempfindungen (Merkel, 1875). Merkelzellen liegen wie die Melanocyten in der *Stratum basale* der Epidermis (Abb. 1-2) (Hashimoto, 1972; Winkelmann and Breathnach, 1973). Die genaue Herkunft der Merkelzelle ist nicht vollständig geklärt, jedoch wird angenommen, dass sie direkt der Neuralleiste entstammen (Breathnach, 1971).

Die eigentliche Merkelzelle und das ihr zugehörige Nervterminale bilden zusammen den sog. Merkelzellrezeptorkomplex. Die Merkelzelle selbst liegt in einer becherförmigen Ausbuchtung des Nervterminals und ist über Mikrovilli und Desmosomen mit den umliegenden Keratinocyten in der *Stratum basale* der Epidermis verbunden (Moll, 1994).

Durch Merkelzell-spezifische Cytokeratine (z.B. CK 8, 18, 19 und 20) der Intermediär-filamente der Merkelzellen, sowie durch die neuronspezifische Enolase (NSE) lassen sich durch immunhistochemische Verfahren Merkelzellen und Merkelzellkarzinome von den umgebenden Keratinocyten unterscheiden und detektieren (Moll *et al.*, 1984; Narisawa and Hashimoto, 1991).

In der basalen Exocytosezone zum Nervterminale sind ca. 80-120 nm große Vesikel, eine sog. neurosekretorische Granula, enthalten (Gould *et al.*, 1985; Hashimoto, 1972). Eine Exocytose dieser Vesikel wurde nur in einigen Fällen beobachtet, jedoch ähneln Merkelzellen damit in ihren Charakteristika einer neurosekretorischen Zelle (Hartschuh and Grube, 1979; Hartschuh *et al.*, 1983) und können als Mitglied der Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems betrachtet werden (Pearse, 1968; Pearse, 1980; Winkelmann, 1977).

Dementsprechend kann das Merkelzellkarzinom genauso wie das maligne Melanom und das kleinzellige Lungenkarzinom als neuroendokriner Tumor betrachtet werden (Lemos and Nghiem, 2007).

Das Merkelzellkarzinom ist eine aggressive, selten auftretende Neoplasie (Miller and Rabkin, 1999) mit leicht steigender Inzidenz (Becker *et al.*, 2008; Hodgson, 2005). 1999 erkrankten noch ca. zwei bis drei von 1.000.000 Menschen pro Jahr. Zur Zeit ist die Inzidenz auf vier Fälle/1.000.000/Jahr gestiegen. Das Merkelzellkarzinom tritt gehäuft bei älteren Menschen (ab 65 Jahren) auf (Goepfert *et al.*, 1984; Hitchcock *et al.*, 1988) und bildet in ca. 36% Fernmetastasen in Haut, Leber, Lunge und Knochen sowie dem zentralen Nervensystem (Hitchcock *et al.*, 1988; Medina-Franco *et al.*, 2001) mit letalen Folgen. Neben der Seneszenz scheint ein weiterer Risikofaktor eine hohe kumulative UV-Lichtbestrahlung zu sein, da ca. 60-70% der Karzinome in sonnenexponierten Bereichen auftreten (Eftekhari *et al.*, 1996; Hitchcock *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 1984). Weitere Möglichkeiten für die Ursachen des Merkelzellkarzinoms können z.B. durch UV-B Licht erzeugte Mutationen in

Tumorsuppressorgen oder durch epigenetische Prozesse inaktivierte Tumorsuppressorgene sein. Zum Beispiel wurden UV-B spezifische Mutationen der Tumorsuppressorgene *p53* und *p73* gefunden (Krasagakis and Tosca, 2003; Van Gele *et al.*, 2000).

Kürzlich wurde durch Feng *et al.* ein neuer Polyomavirus im Merkelzellkarzinom identifiziert und in 80% der untersuchten Tumore nachgewiesen (Feng *et al.*, 2008). Dieser Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) könnte bei der Pathogenese des Merkelzellkarzinoms entscheidend beteiligt sein. Eine deutlich gesteigerte Inzidenz von 120 Fällen pro 1.000.000 Menschen pro Jahr bei immunsupprimierten Patienten (Veness and Harris, 2007) unterstützt ebenfalls die Vermutung, dass der Merkelzellpolyomavirus mit dem Auftreten des Merkelzellkarzinoms in enger Verbindung steht (zur Hausen, 2008).

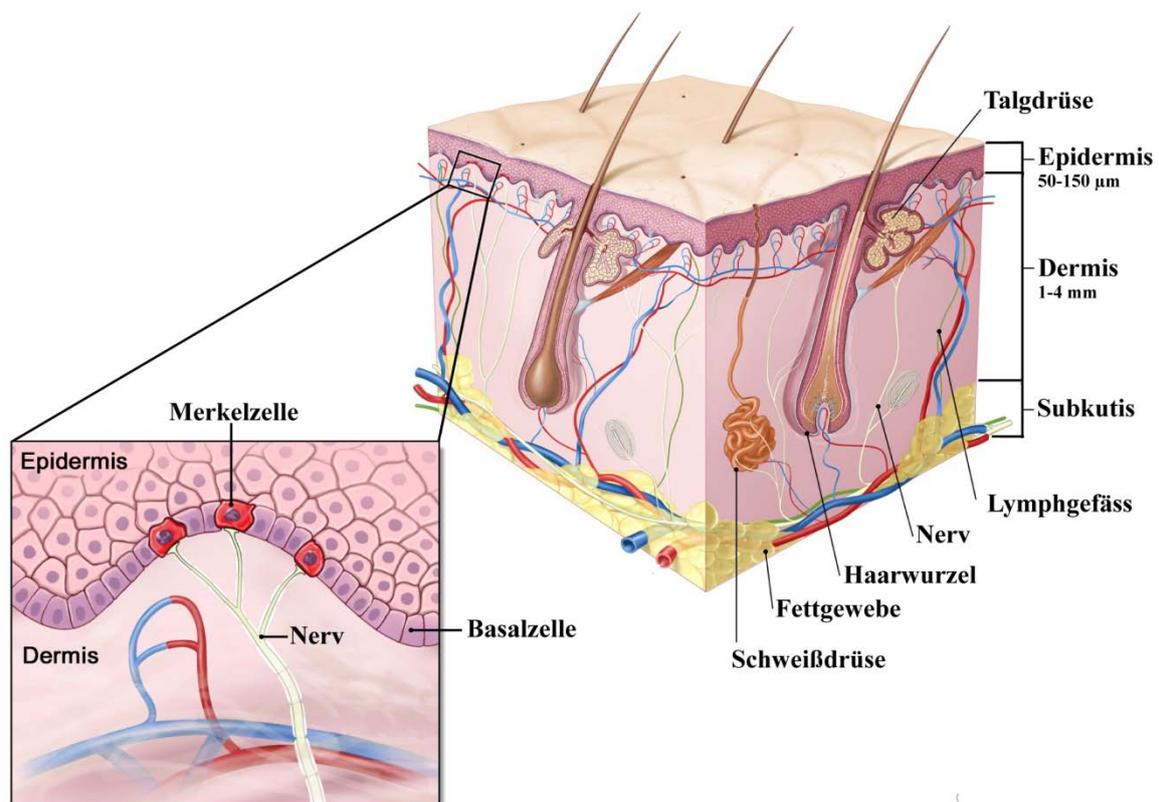


Abbildung 1-2: Lokalisierung von Merkelzellen in menschlicher Haut. Der Querschnitt zeigt die Haut mit ihren morphologischen Merkmalen von der Epidermis über die Dermis bis zur Subkutis. Der Vergrößerungsausschnitt zeigt die Lage der Merkelzellen in der Epidermis. Das Bild ist modifiziert nach <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000579043.jpg>

1.3 Polyomaviren

Die Polyomaviren sind Vertreter der Familie der Polyomaviridae (Hou *et al.*, 2005) und gehören zur Familie der DNA-Tumorviren (zur Hausen, 2008). Zu der Familie gehören die Virussubtypen, die humanen Polyomaviren BK, JC, KI, WU (Allander *et al.*, 2007; Gaynor *et al.*, 2007) und der neuentdeckte Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) (Feng *et al.*, 2008) sowie das vakuolisierende Virus (*Simian virus* (SV) 40). Polyomaviren sind unbehüllte DNA-Viren. Die Viruspartikel bestehen aus 72 pentametrisch angeordneten Untereinheiten der Virusproteine 1, 2 und 3 und bilden das ikosaedrische Capsid. Das Virusprotein 1 kommt am häufigsten vor und bewirkt die Adsorption an die Wirtszelle (hämagglutinierende Wirkung) und ist gleichzeitig das Hauptantigen für neutralisierende Antikörper. Das Capsid hat einen Durchmesser von 45 nm und beinhaltet die ca. 5 kb große zirkuläre DNA, welche sechs Gene codiert. Im Partikel liegt die DNA *supercoiled* vor und ist mit Wirtszell eigenen Histonen als Nukleosomenkomplex aus 22-28 Nukleosomen assoziiert (Hou *et al.*, 2005; Jakobovits *et al.*, 1980; Sogo *et al.*, 1986; Varshavsky *et al.*, 1979).

Die Expression der virusspezifischen Gene wird je nach Lage der Gene auf dem Genom in zwei unterschiedliche Regionen unterschieden. Der frühe Bereich der exprimierten Gene codiert für die T-Antigene, die eine Rolle bei der malignen Transformation von Zellen spielen, der späte Bereich codiert für die Strukturproteine VP1, 2 und 3.

1.3.1 Das *Simian virus* 40

Das *Simian virus* 40 wird als Modellsystem für die DNA-Replikation in Säugetierzellen verwendet. Für dieses Forschungsgebiet ist dieses Modellsystem das bestcharakterisierte (Stillman, 1989). Der natürliche Wirt ist die afrikanische grüne Meerkatze. Das 5243 bp große, ringförmig geschlossene Genom des SV40 codiert für sechs Genprodukte. Das SV40 Virus kann seine DNA in das Wirtsgenom integrieren und durch die Expression von dem T-Antigen die Transformation der Wirtszelle in eine entartete Zelle einleiten (Knippers, 1990; Martin, 1981; Stahl *et al.*, 1983; Stahl and Knippers, 1983). Daher kann eine Infektion des SV40 Virus in humanen Zellen zu Krebs führen (Peltecu *et al.*, 2009; zur Hausen *et al.*, 1975). Weiterhin kann eine Infektion des Virus mit einer Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen (*RASSF1A*) korrelieren (Hachana *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005; Toyooka *et al.*, 2001a)

1.3.2 Das Merkelzellpolyomavirus

Das kürzlich neu entdeckte Merkelzellpolyomavirus (Abb. 6-1; 5387 bp) wurde von Feng *et al.* in Merkelzellkarzinomen gefunden (Feng *et al.*, 2008) und gehört wie der SV40 Virus zur Familie der DNA-Tumorviren (zur Hausen, 2008). Feng *et al.* fand, dass 80% der untersuchten Karzinome mit diesem Virus infiziert waren. Im Gegensatz dazu konnte in Basal-Karzinomen nur in 12,5% der Fälle der Virus nachgewiesen werden (Becker *et al.*, 2009). Die Ergebnisse von Feng *et al.* konnten durch andere Untersuchungen bestätigt werden. Zum Beispiel lag bei Kasseem *et al.* 77% der untersuchten Karzinome eine Infektion vor (Kassem *et al.*, 2008) und eine ca. 85%ige Infektionsrate wurde von Becker *et al.* gefunden (Becker *et al.*, 2009).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist ein bedeutender Einfluss des Merkelzellpolyomavirus auf die Pathogenese des Merkelzellkarzinoms sehr wahrscheinlich.

Damit wäre das Merkelzellpolyomavirus ein weiteres Virus, das in der Lage ist beim Menschen maligne Neoplasien auszulösen. Ein anderes bekanntes Tumorstoff ist das Epstein-Barr-Virus, das das Burkitt-Lymphom und das nasopharyngeale Karzinom auslösen kann. Weiter ist das Hepatitis-C-Virus in der Lage Leberkrebs zu verursachen. Ebenfalls wird das Zervixkarzinom durch humane Papillomaviren hervorgerufen.

1.4 Die untersuchten Tumorsuppressorgene

1.4.1 *RASSF1A*

Das Tumorsuppressorgen *RASSF1A* (*RAS-association domain family 1A*-Gen) ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 3p21.3. lokalisiert. *RASSF1A* ist in der Lage den Zellzyklus zu inhibieren und wurde als Tumorsuppressorgen identifiziert, da es in über 90% von Tumoren des kleinzelligen Lungenkrebs durch eine Promotorhypermethylierung epigenetisch inaktiviert ist (Dammann *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde eine Hypermethylierung von *RASSF1A* in vielen malignen Neoplasien detektiert (Pfeifer and Dammann, 2005).

Kürzlich wurden neue Mechanismen entdeckt, die zu einer Inaktivierung von *RASSF1A* führen. Es wurde durch Man *et al.* gezeigt, dass das virale Protein LMP-1 des Epstein-Barr-Virus in der Lage ist über den NF- κ B Signalweg die Expression von *RASSF1A* zu inhibieren (Man *et al.*, 2007). Weiter wurde von Wang *et al.* eine *RASSF1A* spezifische Promotormethylierung beschrieben (Wang *et al.*, 2007a).

1.4.2 *CDKN2A*

Das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*-Gen) ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert (9p21). Es existieren mehrere *splice*-Varianten, die sich durch das erste Exon unterscheiden. Eine Variante des Gens besitzt einen alternativen offenen Leserahmen (*alternative open reading frame*: ARF) und codiert für das Protein p14^{ARF}. Das Hauptprodukt des Gens ist das Protein p16^{INK4a} (Stone *et al.*, 1995).

Dieses Protein ist in der Lage Kinasen (CDK4/6) zu inhibieren, die von Cyclinen der Gruppe D aktiviert werden können. Kinasen dieses Typs bewirken, dass Zellen von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus übergehen. Wird dieses Gen inaktiviert, wird somit der Inhibitor dieser Kinasen ausgeschaltet. Dadurch können die Zellen nicht mehr in der G1-Phase gehalten werden und können sich unkontrolliert teilen (Sherr, 1996).

Mutationen und Deletionen dieses Gens sind mit vielen verschiedenen Krebsentitäten assoziiert (Bartsch *et al.*, 1995; Caldas *et al.*, 1994; Liggett and Sidransky, 1998; Nobori *et al.*, 1994; Rocco and Sidransky, 2001). Weiterhin kann *CDKN2A* durch eine Promotormethylierung inaktiviert werden (Herman *et al.*, 1995). Darüber hinaus wird beschrieben, dass CTCF in der Lage ist den Promotor von *CDKN2A* epigenetisch zu regulieren (Rodriguez *et al.*, 2010; Witcher and Emerson, 2009). Ebenfalls wurde von einem Verlust der Proteinexpression im EBV assoziierten Magenkrebs berichtet (Koriyama *et al.*, 2004).

1.4.3 *PTEN*

Das Tumorsuppressorgen *PTEN* (*phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome TEN*) ist auf dem langen Arm des Chromosoms 10 lokalisiert (10q23.3). Bei dem Protein handelt es sich um eine Lipidphosphatase, dessen wichtigster Signalweg der PKB/AKT-Signaltransduktionsweg ist. Die tumorsupprimierende Aktivität entsteht durch die Fähigkeit Phosphatidylinosit-3,4,5-triphosphat (PIP3) zu PIP2 zu dephosphorylieren. Dadurch sinkt die Aktivität von Proteinkinase B. Eine aktive Proteinkinase B hemmt den Eintritt in die Apoptose über den PKB/AKT-Signalweg. Ist *PTEN* inaktiviert worden, steigt die PIP3 Konzentration an und die Proteinkinase B wird aktiviert und hemmt den Eintritt in die Apoptose (Di Cristofano and Pandolfi, 2000).

Eine Inaktivierung des Gens *PTEN* erfolgt häufig über Mutationen und Deletionen. Derartigen Inaktivierungen können bei Prostatatumoren, Melanomen, Glioblastomen, Nieren-, Brust- und Lungenkrebs detektiert werden (Cairns *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2000; Ittmann, 1996; Li *et al.*, 1997; Myers *et al.*, 1997). Darüber hinaus wird *PTEN* über eine Hypermethylierung des Promotors inaktiviert (Carnero, 2010).

1.4.4 *p73*

Das Tumorsuppressorgen *p73* (Tumorprotein 73) ist auf dem Chromosom 1 (1p36) lokalisiert und ist mit dem Tumorsuppressorgen 53 verwandt. *p73* ist als Transaktivator in der Lage die Zielgene (*p21*, *Puma*, *Noxa*, *Bax* und *MDM2*) von *p53* zu aktivieren (Jost *et al.*, 1997; Kaghad *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998). Daher kann *p73* unabhängig von *p53* den Zellzyklusarrest und die Apoptose auslösen (Agami *et al.*, 1999; Stiewe, 2007). *p73* wird durch DNA Schädigungen aktiviert (Zaika *et al.*, 2001). Inaktivierende Mutationen sind nur mit weniger als einem Prozent in Tumoren zu finden (Hagiwara *et al.*, 1999; Melino *et al.*, 2002; Sunahara *et al.*, 1999). Dies deutet einen epigenetischen Regulationsmechanismus an. *p73* ist beispielsweise im non Hodgekin's Lymphom und im Meningeom und methyliert (Lomas *et al.*, 2004; Martinez-Delgado *et al.*, 2002). Abschließend kann gesagt werden, dass die Funktion und Regulation in der Tumorgenese sehr komplex ist.

1.5 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht zum einen darin den Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73* in den neuroendokrinen Tumoren (malignes Melanom, Merkelzellkarzinom und kleinzelliges Lungenkarzinom) zu charakterisieren.

Zum anderen besteht das Ziel darin zu analysieren, welche Mechanismen für eine auftretende Methylierung den jeweiligen Tumorentitäten zu Grunde liegen. Es wurde einerseits untersucht, ob und wie eine Exposition von UV-B Licht den Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene beeinflusst. Eine übermäßige Sonnenexposition ist im Allgemeinen die Ursache für das Auftreten eines malignen Melanoms. Daher könnte die Analyse der Noxe UV-B Licht zu weiteren vertiefenden Erkenntnissen der Pathogenese des malignen Melanoms führen.

Außerdem werden die Auswirkungen des Entzündungsmediators Interleukin-6 auf den Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen untersucht. Entzündungen spielen in der Pathogenese von malignen Neoplasien eine bedeutende Rolle. So wird das kleinzellige Lungenkarzinom durch eine von Tabakkonsum hervorgerufene chronische Entzündung ausgelöst.

Darüber hinaus werden die Auswirkungen von epigenetischen Regulatoren, wie eine Variante der Methyltransferase3b (*ADNMT3b4*) sowie das transformierende virale *latent membrane proteine 1* (LMP-1) des Epstein-Barr-Virus, auf den Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen untersucht. Des Weiteren werden die drei neuroendokrinen Tumorentitäten auf die virale Präsenz von zwei bekannten Polyomaviren (MCPyV und SV40) und mit den Ergebnissen der Methylierungsanalysen verglichen.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Sonnenlicht, des Cytokin IL-6, von epigenetischen Regulatoren und von viralen Präsenzen auf den Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials

Um in neuroendokrinen Tumoren epigenetische Veränderungen zu charakterisieren, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Peter Helmbold eine Vielzahl von Tumoren zur Untersuchung bereitgestellt. Die Tumore waren teilweise in mehrere Abschnitte zerteilt und in Paraffin eingebettet. Von diesen eingebetteten Tumorproben wurden in den jeweiligen Tumorbanken mit einem Mikrotom je 20 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese 20 Schnitte stellten die Grundlage für die epigenetischen Untersuchungen dar.

Zusätzlich wurden in Paraffin eingebettetes Nävuszellnävus-Gewebe in Form von 20 Mikrotomschnitten je Probe und Blutproben in Form von EDTA-Blut als Vergleichsmaterial verwendet.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 619 Proben von 230 malignen Melanomen (MM), 108 Proben von 98 Merkelzellkarzinomen (MCC), 18 Proben von 18 kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC), 18 Nävuszellnävus-Gewebe- und 26 Blutproben sowie eine Adenokarzinomzelllinie (A549), eine Melanomzelllinie (Buff1280), eine Zelllinie einer Metastase eines malignen Melanoms (IGR-I), eine Zervixkarzinomzelllinie (HeLa-S3), eine humane Fibroblastenzelllinie (HF53), eine normale humane epidermale Melanocytenzelllinie (NHEM) und eine Keratinocytenzelllinie (HaCat) einbezogen.

2.1.1.1 Malignes Melanom Paraffingewebe

Die malignen Melanome (*malignant melanoma*; MM) stammen von der Tumorbank der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Insgesamt wurden 619 Proben von 230 malignen Melanomen von 230 Patienten (105 Männer und 125 Frauen) retrospektiv untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Resektion $60,6 \pm 14,5$ Jahre. Bei den Tumoren handelt es sich um 149 oberflächlich spreitende

Melanome (*superficial spreading melanoma*; SSM), 38 noduläre maligne Melanome (*nodular malignant melanoma*; NMM), 14 Lentigo-maligna-Melanome (*lentigo-maligna-melanoma*; LMM) und 13 akrolentiginöse Melanome (*acral-lentiginous melanoma*; ALM) sowie 16 Melanome ohne spezifische Diagnose.

Weiterhin wurden die Tumore in den histologischen Eigenschaften Tumordurchmesser, Tumordicke, Clark-Level¹ (Clark *et al.*, 1969), Tumortyp, Tumorlokalisierung nach TANS (*thorax, upper arm, neck, scalp*)² (Garbe *et al.*, 1995) und akral³, Ulzerationsstatus⁴, Nävuszellnävus⁵-Assoziation, Infiltration⁶, basophiler Degeneration⁷ sowie Mitoseindex⁸ charakterisiert. Darüber hinaus wurde in den malignen Melanomen eine Mutationsanalyse für die Gene *BRAF* und *NRAS* und eine immunhistologische Expressionsanalyse von PTEN durchgeführt (Lahtz *et al.*, 2010) (Tab. 6-1, 6-2, 6-3; Abb. 6-5).

2.1.1.2 Merkelzellkarzinom Paraffingewebe

Die Merkelzellkarzinome (*Merkel cell carcinoma*; MCC) stammen von den Tumorbanken der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, der Dermatopathologie Friedrichshafen und dem Institut der Pathologie Halle (Saale).

Insgesamt wurden 108 Proben von 98 Tumoren von 91 Patienten (39 Männer und 52 Frauen) retrospektiv untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Resektion $76,5 \pm 10,7$ Jahre. Bei den Tumoren handelte es sich um 56 primäre MCCs, 15 lokale Haut MCC Rezidive und 27 MCC Hauttumore mit unsicherer Diagnose, ob es sich um einen primären oder rezidiven Tumor handelt (Tab. 6-4).

Die Diagnose eines MCCs war zuvor durch das klinische Personal der jeweiligen Tumorbank histologisch durch das Benutzen von einem Set neuroendokriner Marker einschließlich Cytokeratin 20 (CK20) und thyroidalen Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1) gestellt worden. Die Tumorzellhäufigkeit in jeder Probe wurde dokumentiert und beträgt $70 \pm 26\%$.

¹ **Clark-Level:** Eindringtiefe (Invasionslevel) des malignen Melanoms (I: Alle Tumorzellen befinden sich oberhalb der Basalmembran; II: Überschreitung der Basalmembran (*Stratum basale*), Invasion in die Papillenschicht (*Stratum papillare*) der Dermis; III: Invasion bis an die Grenze zur Netzschicht (*Stratum reticulare*) der Dermis; IV: Invasion der Netzschicht; V: Invasion in die Subkutis)

² **TANS** (*thorax, upper arm, neck, scalp*): Lokalisierung des Tumors an Oberkörper, Oberarm, Hals und Kopf

³ **akral:** Lokalisierung des Tumors an den Körperenden (Akren) v.a. an den Enden der Gliedmaßen (i.e.S. Finger- und Zehenglieder) sowie Nase, Kinn, Ohrmuscheln und Wangenknochen.

⁴ **Ulzeration:** Haut- bzw. Schleimhautdefekt, der über das *Stratum basale* der Epidermis hinausgeht und meist mit einer starken Entzündungsreaktion verbunden ist.

⁵ **Nävuszellnävus:** Gutartige Hautgeschwulst (Hamartom) mit Anreicherung von Nävuszellen an der Epidermis-Kutis-Grenze (Junktionsnävus) oder in der Kutis (dermaler Nävus) oder in Epidermis u. Kutis (intermediärer Nävus). Als Junktionsnävus, seltener als dermaler Nävus, mit Gefahr maligner Entartung zum Melanom.

⁶ **Infiltration:** Infiltration durch neutrophile Granulozyten bei Entzündungen

⁷ **basophile Degeneration:** Degeneration der kollagenen Fasern und Einlagerung elastoiden Materials in die Dermis, insbesondere infolge langzeitiger Sonnenexposition (Psyhrembel, 2007). Kollagenfasern erscheinen in der HE-Färbung bläulich-glasig homogenisiert.

⁸ **Mitoseindex:** In dieser Arbeit definiert als Durchschnitt der Anzahl der Mitosen von zehn mikroskopischen Gesichtsfeldern (HPF: *high power field*) bei größter Auflösung (40x).

2.1.1.3 Kleinzelliges Lungenkarzinom Paraffingewebe

Die kleinzelligen Lungenkarzinome (*small cell lung cancer*; SCLC) stammen von der Gewebebank des Nationalen Centrums für Tumorerkrankungen (NCT) in Heidelberg. Insgesamt wurden 18 Tumorproben von 18 Patienten (elf Männer und sieben Frauen) retrospektiv analysiert. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Resektion 64,9 Jahre (Median). Bei den Tumoren handelt es sich um 14 primäre SCLCs und vier regionale Lymphknotenmetastasen (Tab. 6-5). Die Ausschlusskriterien für diese Arbeit waren entzündliche Hautfunktionsstörungen, bekannte allgemeine entzündliche oder autoimmune Krankheiten, bekannte oder schwere allgemeine Krankheiten und jegliche maligne Krebserkrankungen gegenwärtig oder in der Vergangenheit.

Die Diagnose eines SCLCs war wiederum zuvor durch das klinische Personal der jeweiligen Tumorbank histologisch gemäß den Kriterien der *World Health Organisation* (WHO) gestellt worden. Die Tumorzellhäufigkeit in jeder Probe wurde dokumentiert und beträgt $55 \pm 21\%$.

2.1.1.4 Benignes Nävuszellnävus Paraffingewebe

Um die Ergebnisse der Analysen der MMs, der MCCs und der SCLCs interpretieren zu können, wurden 18 routinemäßig operativ entfernte und histologisch kontrollierte benigne Nävuszellnävi ($n = 17$) und eine benigne Cyste als Vergleichskontroll-Gewebe verwendet. Bei der Gewinnung des Materials wurde chirurgisch das überschüssige Gewebe des Ausgleichsdreiecks (sog. Burow Dreiecke⁹, in dieser Arbeit werden diese Ausgleichsdreiecke als Nävuszellnävus-Gewebe (NZN) bezeichnet) entfernt und als Vergleichskontroll-Gewebe verwendet. Um zu gewährleisten, dass das gewonnene Vergleichskontroll-Gewebe auch zu Kontrollzwecken verwendet werden kann, wurde ein minimaler Abstand von 5 mm zu der Läsion eingehalten. Zusätzlich wurde das Vergleichskontroll-Gewebe histologisch auf detektierbare Kontaminationen der exzidierten Läsion sowie auf entzündliche Infiltrate untersucht (Tab. 6-6).

2.1.1.5 Blutproben

Weiterhin wurden von zufälligen Spendern eines ambulanten prophylaktischen Hautkrebsvorsorgeprogramms 26 Blutproben erhalten. Diese dienten ebenfalls als Vergleichsmaterial zu den Analysen der verschiedenen Tumorentitäten. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Blutentnahme 61,3 Jahre (Median).

⁹ Burow Dreiecke: Bezeichnet das Ausgleichsdreieck einer kutanen Exzision

Die Ausschlusskriterien für diese Arbeit waren entzündliche Hautfunktionsstörungen, bekannte allgemeine entzündliche oder autoimmune Krankheiten, bekannte oder schwere allgemeine Krankheiten und jegliche malignen Krebserkrankungen gegenwärtig oder in der Vergangenheit (Tab. 6-7).

2.1.1.6 Humane Zelllinien

Tabelle 2-1: Verwendete humane Zelllinien, das zugehörige Medium und die Bezugsquelle

Zelllinie	Medium (10% FCS, 1%PS)	Zelltyp	Bezugsquelle
A549	DMEM	Adenokarzinom (Lunge)	ACC107 (DSMZ)
Buff1280	DMEM	Melanomzelllinie	Prof. Dr. B. Seliger Universitätsklinikum Halle (Saale)
IGR-I	DMEM	Metastase von malignem Melanom	ACC236 (DSMZ)
HaCat	DMEM	<i>human adult low calcium temperature keratinocytes</i>	PD Dr. M. Fischer Dermatologie Halle (Saale)
HeLa-S3	DMEM	Zervixkarzinom	ACC161 (DSMZ)
HF53	DMEM	humane Fibroblasten	<i>City of Hope MC</i>
NHEM	MBM-4 [®] + MGM-4 [®]	<i>normal human epidermal melanocytes</i>	CC-2504 / 5F0059 (Cambrex)*

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; *Cambrex Bio Science Inc., Walkersville ,MD, USA

2.1.2. Chemokompetente *Escherichia coli* – Stämme (*E. coli*)

Tabelle 2-2: Verwendete chemokompetente *E. coli* – Stämme, das zugehörige Medium, Genotyp und die Bezugsquelle

Stamm	Genotyp	Medium	Bezugsquelle
<i>TAM 1</i>	mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZDM15 DlacX74 recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	LB	Active Motif, Rixensart, Belgien
<i>DH5α</i>	supE44 lacU169 (80lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	LB	ATCC 53868

2.1.3 Vektoren

pFLAG-CMV TM -2 Expressionsvektor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Abb. 6-2)
pcDNA6/V5-His C Expressionsvektor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Abb. 6-3)
pTD1-1 Expressionsvektor mit SV40 <i>large T antigene</i> , Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Vektor als Kontrolle für das SV40 <i>large T antigene</i> verwendet	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich (Abb. 6-4)

2.1.4 Oligonukleotide

Tabelle 2-3: Verwendete Oligonukleotide

Anwendung	<i>upper Primer</i> (5'→3')	<i>lower Primer</i> (5'→3')
Oligonukleotide für <i>methylation specific</i> PCR (MSP)		
<i>RASSF1A</i>	methyl.	GTG TTA ACG CGT TGC GTA TC
	unmethyl.	TTT GGT TGG AGT GTG TTA ATG TG
<i>CDKN2A</i>	methyl.	TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC
	unmethyl.	TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT
<i>PTEN</i>	methyl.	CGC GCG GAG TTT GGT TTC G
	unmethyl.	GTT GGG GTG TGT GGA GTT TGG TT
<i>FHIT</i>	methyl.	TTG GGG CGC GGG TTT GGG TTT TTA CGC
	unmethyl.	TGG GGT GTG GGT TTG GGT TTT TAT G
Oligonukleotide für <i>combined bisulfite-restriction-analysis</i> (COBRA)		
<i>CDKN2A</i>	AAG AGG AGG GGT TGG TTG GTT ATT	CTA CAA ACC CTC TAC CCA CCT AAA TC
<i>PTEN</i>	GTT TAT TYG TTG GGT TGT AGT TTT TTA T	CTC CRA TAC CCC CAA AAA AAT C
<i>PTPRG</i>	TTT ATY GTT GTA AAT GTT AGG GTA GTG AAG T	ACC TCT ACT AAA ACA ATT TAA AAA CTA AAA AC
<i>TP73</i>	GGT TGT AGG TAG GAG GTT TAG GGT	CTC TCC CCT CAC CTC CCA ACT TC
Oligonukleotide für <i>reverse transkriptase</i> PCR (RT-PCR)		
Hexamere	NNN NNN	
Poly dT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT	

Anwendung	upper Primer (5'→3')	lower Primer (5'→3')
Oligonukleotide für <i>semi</i> -quantitative RT-PCR (sqRT-PCR)		
<i>β-Aktin</i>	CCT TCC TTC CTG GGC ATG GAG TC	CGG AGT ACT TGC GCT CAG GAG GA
<i>GAPDH</i>	TGG AGA AGG CTG GGG CTC AT	GAC CTT GGC CAG GGG TGC TA
<i>RASSF1A</i>	GGC TGG GAA CCC GCG GTG	TCC TGC AAG GAG GGT GGC TTC T
<i>CDKN2A</i>	GCT GCC CAA CGC ACC GAA TAG T	CTC CCG GGC AGC GTC GTG
<i>PTEN</i>	AGT GGC GGA ACT TGC AAT CCT C	TTC TGA GGT TTC CTC TGG TCC TGG
<i>DNMT1</i>	CCA CCG CCC CTG GCC AA GC	CAG GGG TGA CGG GAG GGC AGA AC
<i>DNMT3a</i>	ATG TGG TGG CCA TGG GCG TTA GTG	CAC AGT GGA TGC CAA CGG CCT GT
<i>DNMT3b</i>	CTC GAG CTG CAG GAC TGC TTG GAA	TCC TTT CGA GCT CAG TGC ACC ACA
endogenes <i>IL-6</i>	ATG GCT GAA AAA GAT GGA TGC TTC C	TGG GTC AGG GGT GGT TAT TGC AT
<i>LMP-1</i>	GCA GGA GGG TGA TCA TCA GT	AAT GTC GTA ATA ACC CCG CCC CGT TGA CGC (N-CMV-30)
<i>ΔDNMT3b4</i>	TTC TCT GGT TGC GTG TTG TT	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C (T7)
Oligonukleotide für Virusanalysen PCR		
<i>GAPDH</i> genomisch	TGA TGC CCC CAT GTT CGT CAT	GAC CTT GGC CAG GGG TGC TA
MCPyV	ACT TGG GAA AGT TTT TGA CTG GTG GCA A	GGG CCT CGT CAA CCT AGA TGG GAA AG
SV40	CAG TTG CAT CCC AGA AGC CTC CAA	TCT TGA AAG GAG TGC CTG GGG GAA

methyl.: Oligonukleotide für methylierte DNA; unmethyl.: Oligonukleotide für unmethylierte DNA.

2.1.5 Enzyme

DNase I (1 U/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteinase K (20 μg/μl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, Schwalbach
	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Promega GmbH, Madison, WI, USA
RNase A (10 μg/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNasin (RNase A Inhibitor) (40 U/μl)	Promega GmbH, Madison, WI, USA
Sss I Methyltransferase (20 U/μl)	New England BioLabs, Schwalbach
T4 DNA Ligase (3 U/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot,
	Promega GmbH, Madison, WI, USA
<i>Taq</i> DNA-Polymerase Invitaeq (5 U/μl)	Invitaeq GmbH, Berlin
TrypLE™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom Ltd., Cambridge, UK

2.1.6 Vorgefertigte Systeme (Kits)

NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel GmbH, Düren
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure	Macherey-Nagel GmbH, Düren
QIAquick Gel-Extraction-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAamp DNA Mini-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Wizard DNA Clean-Up System	Promega GmbH, Madison, WI, USA

2.1.7 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin (Natrium-Salz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacto™ Agar	Difco Laboratories Inc, Detroit, Mi, USA
Bacto™ Trypton	Difco Laboratories Inc, Detroit, Mi, USA
Bacto™ yeast extract	Difco Laboratories Inc, Detroit, Mi, USA
Betain	Merck KGaA, Darmstadt
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform (Trichlormethan)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Cholinchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylformamid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
dNTPs	Invitex GmbH, Berlin
EDTA	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Ethanol 96%	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 96% verg.	Stockmeier Chemie GmbH & Co. KG, Dillenburg
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
<i>Fetal calf serum</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Formamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Geneticin (G418, 50 mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
D (+)-Glucose-Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

Glycogen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hekfektin	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
HEPES	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Hydrochinon	Merck KGaA, Darmstadt
Interleukin-6	Strathmann GmbH + Co. KG, Hamburg
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Längenstandards	
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium-Bisulfit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Nonidet P40	Fluka Biochemica, Ulm
NZ-Amin <i>yeast extract</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
OPTI-MEM® I	GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Orange G	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Phenol	Merck KGaA, Darmstadt
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
PS-Lsg. (10 U/µl Pen. / 10 µg/µl Strep.)	GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
SDS	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
TRIzol (Guanidin-Iso-Thiocyanat)	GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Wasser	
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
DEPC-behandelt	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.8 Gebrauchslösungen

Ampicillin (<i>Stock</i>)	<i>Stock</i> -Konzentration	50 mg/ml
	<i>ad</i> dH ₂ O, steril filtrieren	
	Arbeitskonzentration	60 µg/ml
Betain (7 M)	Betain	41 g
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 50 ml	
DNA Ladepuffer	Saccharose	22,5 g
	TBE-Puffer (10x)	6 ml
	Orange G	0,5 g
	<i>ad</i> steriles dH ₂ O auf ein Endvolumen von 50 ml	
dNTPs	Ausgangskonzentration je	50 mM
	dATP	50 µl
	dCTP	50 µl
	dGTP	50 µl
	dTTP	50 µl
	<i>ad</i> 800 µl steriles ddH ₂ O	
	Arbeitskonzentration	2,5 mM
EDTA • Na ₂ (pH 8; 0,5 M)	Di-Natrium-Ethylen- diamintetraacetat • H ₂ O	9,3 g
	<i>ad</i> 35 ml dH ₂ O, <i>ad</i> 5 ml 3 M NaOH	
	<i>ad</i> NaOH sukzessive bis sich EDTA löst auf pH 8 einstellen	
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 50 ml, autoklavieren	
Glycogen (20 mg/ml)	Glycogen	20 mg
	<i>ad</i> ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 1ml	
Hydrochinon (0,1 M)	Hydrochinon	0,11 g
	<i>ad</i> ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 10ml	
Kanamycin (<i>Stock</i>)	<i>Stock</i> -Konzentration	10 mg/ml
	<i>ad</i> ddH ₂ O, steril filtrieren	
	Arbeitskonzentration	50 µg/ml
Längenstandards		
100 bp Leiter	Ausgangskonzentration	500 ng/µl
	Endkonzentration	100 ng/µl
	Marker	80 µl
	Ladepuffer	66,4 µl
	TBE (10x)	20 µl
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 400 µl	
1 kb Leiter	Ausgangskonzentration	500 ng/µl
	Endkonzentration	100 ng/µl
	Marker	100 µl
	Ladepuffer	25 µl
	TBE (10x)	20 µl
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 400 µl	

NaOAc. (pH 5,2; 3 M)	Natriumacetat pH auf 5 bis 5,3 mit Essigsäure einstellen <i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 50 ml, autoklavieren	12,3 g
Na-Bisulfit (pH 5,5; 3,6 M)	Natrium-Bisulfit <i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 8 ml <i>ad</i> NaOH (3M) auf ein Endvolumen von 10 ml	3,8 g
NaOH (3 M)	Natriumhydroxid <i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 10 ml	1,2 g
NH ₄ OAc. (7,5 M)	Ammoniumacetat <i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 50 ml, autoklavieren	28,9 g
NP40 (20%)	Nonidet P40 <i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 50 ml	10 ml
PBS (10x)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ • H ₂ O K ₂ HPO ₄ <i>ad</i> steriles ddH ₂ O, autoklavieren	1 M 20 mM 60 mM 8 mM
Phenol/Chloroform	Phenol Chloroform	50 ml 50 ml
Proteinase K Puffer	Tris/HCl pH 7,6 EDTA • Na ₂ NP40 SDS <i>ad</i> steriles ddH ₂ O	50 mM 25 mM 0,5% 0,5%
SDS (20%)	Sodiumdodecylsulfat <i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 1 l, filtrieren	200 g
TBE-Puffer (10x)	Tris/HCl Borsäure EDTA • Na ₂ <i>ad</i> steriles dH ₂ O	1 M 0,8 M 10 mM
TE-Puffer	Tris/HCl pH 7,6 EDTA • Na ₂ <i>ad</i> steriles dH ₂ O, autoklavieren	10 mM 1 mM
Tris/HCl (pH var.; 1 M)	Tris/HCl pH mit HCl einstellen <i>ad</i> steriles dH ₂ O auf ein Endvolumen von 1 l	121,1 g
Trypsin/EDTA-Lsg. (pH 7,2)	Trypsin EDTA • Na ₂ pH auf 7,2 mit NaOH einstellen, autoklavieren <i>ad</i> steriles PBS	0,05% 0,02%

2.1.8.1 Kulturmedien für chemokompetente *E. coli* – Stämme und humane Zellen

LB-Lennox-Medium:	Bacto™ Trypton	10 g
	Bacto™ yeast extract	5 g
	NaCl	5 g
	D (+)-Glucose-Monohydrat	1 g
Für Kulturplatten zusätzlich	Bacto™ Agar	15 g
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 1 l, autoklavieren	
NZY ⁺ Medium:	NZ-Amin (Casein hydrolysat)	10 g
	Bacto™ yeast extract	5 g
	NaCl	5 g
	D (+)-Glucose-Monohydrat	3,6 g
	MgCl ₂ • 6 H ₂ O	2,5 g
	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	3 g
	<i>ad</i> 800 ml dH ₂ O	
	auf pH 7,5 mit 3 M NaOH einstellen	
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 1 l, autoklavieren	
SOB-Medium:	Bacto™ Trypton	20 g
	Bacto™ yeast extract	5 g
	NaCl	0,5 g
	<i>ad</i> steriles dH ₂ O auf ein Endvolumen von 1, autoklavieren	
	<i>ad</i> 10 ml steril filtriertes MgCl ₂ (1 M) und 10 ml steril filtriertes MgSO ₄ (1 M)	
SOC-Medium:	1 ml steril filtrierte Glucose-Lsg. (2 M)	
	<i>ad</i> SOB-Medium auf ein Endvolumen von 100 ml	
DMEM:	DMEM	133,8 g (1 Pckg.)
(10 l)	NaHCO ₃	37 g
	HEPES	59,6 g
	auf pH 7,25 mit HCL einstellen	
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 9 l, autoklavieren	
	<i>ad</i> 50 ml FCS zu 450 ml sterilem DMEM	

2.1.9 Gebrauchswaren

Gewebekulturschale	Sarstedt, AG & Co, Nümbrecht
	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Handschuhe (rotiprotect Nitril)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging; Menasha, WI, USA
Petrischalen	Sarstedt, AG & Co, Nümbrecht

Pipettenspitzen	Ratiolab GmbH, Dreieich Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Plastikwaren	Elkay Laboratory Products, Hampshire, UK Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Greiner bio-one GmbH; Frickenhausen Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe Sarstedt AG & Co; Nümbrecht Sartorius AG, Göttingen Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Skalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	Sartorius AG, Göttingen

2.1.10 Sterilisation/Autoklavierung von Lösungen und Gebrauchswaren

Um eine Kontamination durch Mikroorganismen bei zwingend sterilen Arbeitsschritten zu verhindern, wurden die jeweilige Gebrauchsmaterialien (Spitzen, Reaktionsgefäße) und die Gebrauchslösungen 20 min. bei feuchter Hitze bei 121°C und 10⁵ Pascal autoklaviert. Lösungen, die durch dieses Verfahren Schaden nehmen würden, wurden mit einem Sterilfilter steril filtriert. Die Porengröße des Filters beträgt 0,22 µm.

2.1.11 Geräte

Autoklav: Technoclav 120	Technomara AG, Wallisellen, Schweiz
Blockheater QBD2	Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Shepreth Cambridgeshire, UK
Elektrophoresekammern	PEQlab Biotschnologie GmbH, Erlangen Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Geldokumentation/Transilluminator	Decon Science Tec GmbH, Hohengandern
Kühlschrank: – 80°C Modell DF8517	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Göttingen

Netzgeräte für Elektrophorese:

Power PAC 200/300 Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA

Inkubatoren:

E. coli:

Labor-Brutschrank Typ B6 Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold

Schüttelinkubator TH30 Edmund Bühler GmbH, Hechingen

Humane Zellen:

HERAcell 150 Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold

Mikroliterpipetten

Gilson, Villiers le Bel, Frankreich

Mikrowelle

Cinex Electronic GmbH; Aschenberg

Magnetrührer VMS-C7

VWR International GmbH, Darmstadt

Mikroskope:

Durchlichtmikroskop Carl Zeiss AG, Oberkochen

Inverses Mikroskop Motic Deutschland GmbH, Wetzlar

pH-Meter:

pH 211 Microprocessor Hanna Instruments, Kehl am Rhein

Schüttler/Schwenker:

Schüttler Rotamax 120 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
Schwabach

Schwenker Roto-Shake Genie Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y., USA

Thermomixer compact Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Thermoshaker TS1 Biometra biomedizinische Analytik GmbH,
Göttingen

Spektrometer:

Gene Quant Pro Biochrom Ltd., Cambridge, UK

PCR-Thermo-Cycler:

Mastercycler Gradient Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Mastercycler Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Pipetting aid

Gilson, Villiers le Bel, Frankreich

Pumpen:

Modell AC 500 Heinrich Haep HLC Bio Tech, Bovenden

ME 2S Membran Vakuum Pumpe Vacuubrand GMBH & Co. KG, Wertheim

Wasserbäder:

WB10 P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden

AL-5 Lauda Dr. R. Wobser GMBH & Co. KG,
Lauda-Königshofen

Waagen:

Acculab Präzisionswaage VIC-123 Sartorius AG, Göttingen

Acculab Präzisionswaage VIC-5101 Sartorius AG, Göttingen

UV-Lampe, Blak-Ray, Non-Semiconductor,

Inspection Lamp,

Model B 100 AP

LTF-Labortechnik GmbH & Co. KG,

Wasserburg

Ultraviolet Crosslinker CL-1000

Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK

UV-B Leuchtmittel:

Modell T-8.M (312 nm) 8 Watt

LTF-Labortechnik GmbH & Co. KG,

Wasserburg

UV-Messgerät: UVX Radiometer

Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK

Vortexer: Test Tube Shaker

VWR International GmbH, Darmstadt

Zentrifugen:

Centrifuge 5418

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Fresco 17 Centrifuge

Heraeus[®], Hanau

Multifuge 1S/1S-R

Heraeus[®], Hanau

Pico 17 Centrifuge

Heraeus[®], Hanau

Zellbank:

MSC-Advantage

Biological Safety Cabinet

Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold

2.1.12 Verwendete Software

Es wurde folgende Software verwendet:

Adobe Illustrator CS4

Adobe Systems GmbH, München

Adobe Photoshop CS4

Adobe Systems GmbH, München

DeVision G 1.3 8 Bit Version

Decon Science Tec GmbH, Hohengandern

Endnote X2

Adept Scientific GmbH, Frankfurt (Oder)

SPSS 17

SPSS GmbH Software, an IBM Company,
München

2.2 Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die im Folgenden beschriebenen Methoden nach Sambrook, Fritsch und Maniatis (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien wurden mit dem jeweils empfohlenen Medium (Tab. 2-1) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.1.1 Supplementierung von humanen Zellen mit Interleukin-6

Für einen Teil der Experimente wurden verschiedene humane Zelllinien mit Interleukin-6 (IL-6) supplementiert. Hierfür wurde den Zellen bei jedem Mediumswechsel eine Interleukin-6 Lösung direkt ins Medium hinzugefügt. Die Endkonzentration im Medium betrug 10 ng/ml. Die Supplementierung erfolgte solange, wie es die Experimente erforderten.

2.2.1.2 Behandlung von humanen Zellen mit UV-B Licht

Für weitere Experimente wurde die humane Tumorzelllinie HaCat mit UV-B Licht bestrahlt. Hierfür wurde von einer Zellkulturplatte HaCat das überstehende Medium entfernt, durch 5 ml PBS-Puffer ersetzt und mit einer Bestrahlungsdosis von 100 J/m² bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte über den Ultraviolet Crosslinker CL-1000 mit dem UV-B Leuchtmittel Modell T-8.M (312 nm) 8 Watt (2.1.11). Die erforderliche Dauer der Bestrahlung, um eine Bestrahlungsdosis von 100 J/m² zu erzeugen, wurde über die Bestrahlungsstärke eines UV-B Leuchtmittels berechnet. Mit Hilfe eines UV Messgerätes wurde die Bestrahlungsstärke von einem UV-B Leuchtmittel nach dreiminütiger Aufheizzeit mit einem Wert von 9,4 J/m² • s⁻¹ bestimmt.

$$100 \text{ J/m}^2 / 9,4 \text{ J/m}^2 \cdot \text{s}^{-1} = \underline{10,6 \text{ s}}$$

Daraus resultiert, dass eine Bestrahlungsdauer von ≈11 s im vorliegenden Versuchsaufbau einer Bestrahlungsdosis von 100 J/m² entspricht. Bei jeder Bestrahlung wurde die Aufheizzeit von drei Minuten exakt eingehalten. Nachdem die Zellen bestrahlt worden waren, wurden diese dem Experiment entsprechend (37°C, 5% CO₂) inkubiert, zu bestimmten Zeitpunkten geerntet und DNA und RNA für Methylierungs- und Expressionsanalysen (2.2.7.5) isoliert.

2.2.2 Präparation von DNA und RNA

2.2.2.1 Isolation genomischer DNA aus Zelllinien

Vor der DNA-Isolation werden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst. Die Zell-Medium-Suspension wird in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt und bei 1.200 g abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen wie folgt weiterverarbeitet oder bis zur DNA-Isolation bei -80°C gelagert.

- Zu den mit PBS gewaschenen Zellen von der Kulturplatte werden 400 μl Proteinase-K-Puffer und 15 μl Proteinase-K zugegeben (Konz. 20 mg/ml) und bei 56°C 3 h bzw. bis das Gewebe lysiert ist, inkubiert.
- Zugabe von 500 μl Phenol. Nach zwei- bis dreiminütigem Mischen wird 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert.
- Zugabe von 500 μl Chloroform/Phenol-Mix (50:50) zur oberen wässrigen Phase. Nach zwei- bis dreiminütigem Mischen wird 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert.
- Zugabe von 500 μl Chloroform zur oberen wässrigen Phase. Nach zwei- bis dreiminütigem Mischen wird 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert.
- DNA-Fällung: Obere wässrige Phase (ca. 350 μl) wird mit 1/10 Vol. NaOAc. (3 M) und einem Vol. 2-Propanol gemischt und 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert.
- Das Pellet wird mit 150 μl 70%igem EtOH gewaschen und 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert.
- Anschließend wird das Pellet getrocknet und in 100 μl TE-Puffer resuspendiert.
- RNase A-Behandlung: Jede Probe wird mit 2 μl RNase A (Konz. 10 mg/ml) versetzt und bei 37°C 10 min inkubiert.
- Nach einer Konzentrationsbestimmung wird die isolierte DNA bei -20°C gelagert.

2.2.2.1.1 Isolation genomischer DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe

Vor der DNA Isolation werden mit Hilfe eines Mikrotoms von den Paraffinblöcken mit dem zu untersuchenden Gewebe ca. 20 je 5 μm dünne Schnitte erstellt und in einem 2 ml Reaktionsgefäß bis zur DNA Isolation bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Isolation genomischer DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe erfolgt ein Entparaffinierungsschritt. Die DNA-Isolation wird nach einem modifizierten Protokoll des QIAamp DNA Mini Kits von QIAGEN durchgeführt.

- Zugabe von 1,2 ml Xylol. Nach ein- bis dreiminütigem Vortexen wird 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Prozedur einmal wiederholt.

- Zugabe von 1,2 ml 100%igem EtOH. Nach ein- bis dreiminütigem Vortexen wird 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Prozedur einmal wiederholt
- Anschließend wird das Pellet bei 37°C getrocknet, bis bei Druck kein EtOH mehr austritt.
- Nach Suspendieren des Pellets in 360 µl ATL Puffer durch Vortexen folgt eine Zugabe von 20-40 µl Proteinase K (Konz. 20 mg/ml; weitere Zugabe bei Bedarf) sowie eine Inkubation bei 56°C, bis das Gewebe lysiert ist.
- Zugabe von 400 µl AL Puffer. Nach 15 sekündigem Mischen durch Puls-vortexen wird 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend zehn Sekunden bei 13.000 rpm abzentrifugiert.
- Zugabe von 400 µl Ethanol. Nach 15 sekündigem Mischen durch Puls-vortexen wird zehn Sekunden bei 13.000 rpm abzentrifugiert.
- Der Überstand wird sukzessive in 400 µl Volumenschritten auf die Säule gegeben und bei 8.000 rpm 1 min. zentrifugiert.
- Es folgt das Waschen der Silica-Membran mit 500 µl AW1 Puffer und nach einer Zentrifugation bei 8.000 rpm mit 500 µl AW2 Puffer. Abschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 3 min.
- Nach der Zugabe von 50 µl AE Elutionspuffer und 15 min. Inkubation bei 56°C, werden die Säulen 24 h bei 4°C inkubiert und abschließend durch eine Zentrifugation bei 8.000 rpm für 1 min eluiert.
- Nach einer Konzentrationsbestimmung wird die isolierte DNA bei -20°C gelagert.

2.2.2.1.2 Isolation genomischer DNA aus Blut

Bei der DNA-Isolation aus EDTA-Blut wurde der durch Zentrifugation erhaltene *buffy coat*¹⁰ verwendet. Dieses Sediment enthält die Leukozyten. Zur Isolation wurde das QIAamp DNA Mini-Kit von QIAGEN nach Protokoll verwendet.

2.2.2.2 Isolation von RNA aus Zelllinien

Bei der RNA-Isolation sind ebenfalls vorbereitende Arbeitsschritte erforderlich. Von den Kulturschalen wird das Medium entfernt. Die Zellen werden nun mit einer Trypsin/EDTA-Lsg. bzw.

¹⁰ *buffy coat*: ist die Grenzschicht zwischen roten Blutkörperchen und dem Blutplasma, die entsteht, wenn man Blut mit einem Gerinnungshemmer versetzt und sedimentieren lässt (oder zentrifugiert). Der *buffy coat* besteht hauptsächlich aus weißen Blutkörperchen und Blutplättchen, er macht nur etwa ein Prozent der Blutprobe aus.

TrypLE™ von der Kulturschale abgelöst, in ein Falcon-Gefäß überführt und abzentrifugiert. Bis zur RNA-Isolation werden die Zellen in 500 µl TRIzol (Guanidin-Iso-Thiocyanat) bei -80°C aufbewahrt.

- Die Zellen werden aufgetaut, mit 100 µl Chloroform versetzt und 15 s per Hand geschüttelt.
- Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wird mit 11.000 rpm 15 min bei 4°C zentrifugiert.
- Die obere Phase wird abgenommen und mit 250 µl 2-Propanol per Hand 15 s geschüttelt. Anschließend werden die Proben 10 min auf Eis inkubiert.
- Es erfolgt eine erneute Zentrifugation (wie oben).
- Der Überstand wird vorsichtig vom Pellet abgenommen und verworfen. Das Pellet wird mit 150 µl 70%igem EtOH_{DEPC} gewaschen.
- Es folgt eine Zentrifugation bei 11.000 rpm für 5 min bei 4°C .
- Der Überstand wird entfernt und das Pellet getrocknet. Abschließend wird das Pellet in 20 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Nach einer Konzentrationsbestimmung wird die RNA mit H₂O_{DEPC} auf 1 µg/µl verdünnt.
- DNase-Behandlung: 1 µg RNA wird mit 0,5 µl DNase I (1 U/µl), 0,5 µl RNasin (40 U/µl) und 1 µl DNase I Puffer in einem 10 µl Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 65°C inaktiviert.
- Die isolierte und DNase I behandelte RNA wird bei -80°C gelagert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Es standen zwei Methoden zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA zur Verfügung, die je nach Anforderung der Genauigkeit angewendet wurden. Zum einen handelte es sich um eine Bestimmung mit einem Spektrometer und zum anderen um einen empirischen Vergleich von einem mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Marker mit der ebenfalls angefärbten Ziel DNA bzw. RNA auf einem Agarosegel.

2.2.3.1 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung

Bei dieser Methode wird das Absorptionsverhalten der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 250 nm bis 270 nm ausgenutzt. Das Maximum der Absorption liegt bei 260 nm. Proteine haben daher keinen Einfluss auf die Messung, da ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt. Dabei entspricht eine OD von 1 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis der Absorptionen von 260/280 kann als Maß der Reinheit der Nukleinsäure angesehen werden und sollte zwischen 1,5 und 2,2 (abhängig vom

pH-Wert und Salzgehalt) liegen. Die Eigenschaft der Absorption von Nukleinsäuren ist auf das delokalisierte π -Elektronensystem der Basen zurückzuführen.

Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz:

$c_{NA} = \frac{E_{260} \cdot f}{d \cdot \epsilon}$	c_{NA}	Konzentration der Nukleinsäure (ng/ μ l)
	E_{260}	Extinktion bei 260 nm
	d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
	ϵ	Extinktionskoeffizient (1/50 μ l/ng \cdot cm ⁻¹ für DNA und 1/40 μ l/ng \cdot cm ⁻¹ für RNA)
	f	Verdünnungsfaktor

Am Spektrometer wird zuerst eine Referenz gegen Wasser vorgenommen. Anschließend werden die Proben in einem Bereich von 240 nm bis 340 nm gemessen. Die Proben umfassen ein Volumen von 100 μ l. Für die Messung von DNA wird eine 1:100, für RNA eine 1:50 Verdünnung zur Messung verwendet.

Bei dieser Art der Bestimmung wird die Gesamtheit der Nukleinsäuren gemessen und es kommt so zu geringen Fehlern bei der Konzentrationsbestimmung. Zusätzlich wird das Verhältnis der Absorptionen von 260/280 angezeigt. So ist es möglich, die Reinheit der Nukleinsäure abzuschätzen.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung durch empirischen Vergleich

Hierbei wird von Ethidiumbromid die Eigenschaft ausgenutzt, dass es zwischen die Basenpaare der Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht rot/orange fluoresziert. Die Nukleinsäuren können so im Agarosegel unter UV-Licht als Banden dargestellt werden. Durch einen Vergleich der Intensität dieser Bande mit der Bande eines Markers bekannter Nukleinsäure-Konzentration lässt sich die Konzentration aufgetragener Nukleinsäure unter Berücksichtigung des aufgetragenen Volumens abschätzen. Ein Vorteil dieser visuellen Methode liegt in der Kontrolle der molekularen Qualität der Nukleinsäuren. DNA sollte hochmolekular sein. Bei RNA sollten die 18S und 28S Untereinheiten der ribosomalen RNA deutliche und scharfe Banden bilden.

2.2.4 Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern Nukleinsäuren aufgrund der negativen Ladung ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates zur Anode und werden dabei durch die Agarose nach Größe und Konformation aufgetrennt. Diese Größenauftrennung verläuft bis 50 kb logarithmisch. Mit steigender Basenanzahl nimmt die Beweglichkeit der Nukleinsäuren ab, so dass sie langsamer im Agarosegel migriert. Je nach Größe der Nukleinsäuren werden 1- oder 2%ige Gele verwendet. Für hochmolekulare DNA-Fragmente wie genomische DNA oder Vektoren, aber auch RNA werden 1%ige Gele verwendet, ansonsten 2%ige. Die Agarose Gele werden mit 0,5x TBE-Puffer und der entsprechenden Menge Agarose (1 g Agarose in 100 ml TBE für ein 1%iges Gel) durch Aufkochen hergestellt. Dem flüssigen Gel wird Ethidiumbromid (8 µl einer 1%igen Lsg.) hinzugefügt und in eine vorbereitete Kammerform gegossen, die mit Kämmen der gewünschten Größe bestückt ist. Beim Erstarren bildet die Agaroseschmelze aus Zuckerpolymeren eine homogene Gelmatrix aus. Vor dem Beladen des Agarosegels werden die jeweiligen Proben mit 1/8 Vol. Ladepuffer vermischt. Dies dient einerseits zum Abstoppen der Reaktionen und andererseits zum Beschweren der Lösung, so dass sie sich leichter und sichtbar in die Geltasche pipettieren lässt. Zusätzlich wird bei jedem Gel ein Marker aufgetragen, um die Produktgröße ablesen zu können. Bei 1%igen Gelen wird ein 1 kb Marker und bei 2%igen Gelen ein 100 bp Marker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 0,5x TBE Puffer bei einer Spannung von 170 Volt. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nukleinsäuren ist eine Auswertung im Transilluminator möglich. Mittels eines dort installierten Video- und Bildbearbeitungssystems (DeVision G 1.3 8 Bit Version) lassen sich die aufgetrennten Banden dokumentieren.

2.2.5 *In vitro* DNA-Methylierung

Für die *in vitro* Methylierung von DNA wird die Sss I Methyltransferase verwendet. Diese methyliert Cytosin-Basen an der C5-Position des Pyrimidinringes, wenn sich das Cytosin innerhalb der doppelsträngigen Dinukleotidkennungssequenz 5'-CpG-3' befindet. Die *in vitro* methylierte DNA wurde als methylierte Kontrolle für DNA Methylierungsanalysen verwendet.

- 1,5 µg DNA (x µl) werden mit 2 µl Puffer 2, 1 µl SAM (160 µM) (Donator der Methylgruppe), 1 µl SssI (20 U/µl) und (20 – x) µl H₂O versetzt.
- Es erfolgt eine Inkubation bei 37°C über Nacht, wobei nach zwei bis drei Stunden 1 µl SAM zusätzlich zugegeben wird.
- Nach der Inkubation wird der Ansatz einer Bisulfit-Behandlung (2.2.6) unterzogen, wobei im ersten Schritt 3 µl NaOH statt 2 µl verwendet werden.

2.2.6 Bisulfit-Konvertierung der DNA

Um das Methylierungsmuster einer bestimmten DNA-Sequenz untersuchen zu können, wird die DNA einer Bisulfit-Konvertierung unterzogen. Dabei werden unmethylierte Cytosine zu Uracil deaminiert (Mukai *et al.*, 1970; Shapiro *et al.*, 1973). Methylierte Cytosine bleiben erhalten. Hierdurch entstehen zwei inkompatible DNA Stränge. Dementsprechend kann der erhaltene Sequenzunterschied ausgenutzt werden, um den Methylierungsstatus zu untersuchen. Dabei kann die mit Bisulfit konvertierte DNA mit spezifischen Oligonukleotiden oder 5'-CpG-3' Restriktionsendonukleasen auf Unterschiede im Methylierungsmuster untersucht werden (Clark *et al.*, 1994).

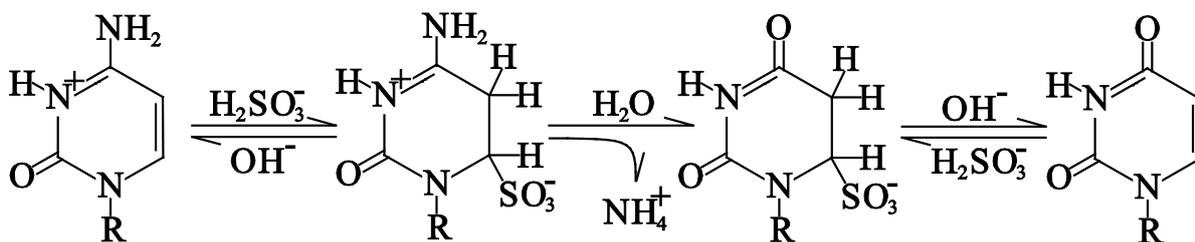


Abbildung 2-1: Chemischer Ablauf der Bisulfit-Reaktion. Der erste Schritt zeigt die Sulphonierung, Schritt 2 die hydrolytische Desaminierung und Schritt 3 die alkalische Desulphonierung (Shapiro *et al.*, 1973).

- Zu 1-2 μg DNA, gelöst in einem Volumen von 18 μl , werden 2 μl einer 3 M NaOH (Endkonz. 0,3 M) hinzugefügt und 15 min. bei 37°C inkubiert.
- Anschließend werden je Probe 208 μl Na-Bisulfit-Lösung (3,6 M) (pH = 5,5) und 12 μl Hydrochinon-Lösung (0,1 M) hinzugegeben und 5 h (bei DNA aus Paraffin-Gewebe) bis 16 h bei 55°C inkubiert.
- Die DNA wird mit Hilfe des Wizard DNA Clean-Up System von Promega aufgereinigt und in 50 μl ddH₂O eluiert.
- Nach der Zugabe von 5 μl NaOH (3 M) und anschließender Inkubation von 15 min bei 37°C erfolgt die Fällung mit 55 μl (1 Vol.) NH₄OAc (7,5 M), 275 μl (2,5 Vol.) 100%iges EtOH und 1 μl Glycogen (20 μg) für 5-10 min bei -20 °C.
- Nach dem Fällern schließt sich eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min bei 13.000 rpm an.
- Das Pellet wird mit 200 μl 75%igem EtOH gewaschen und nach erneuter Zentrifugation für 2-5 min bei 13.000 rpm getrocknet, in 50-100 μl TE-Puffer aufgenommen und 15 min im Schüttler gelöst.
- Die Bisulfit konvertierte DNA (BS-DNA) wird bei -20°C gelagert.

2.2.7 *Polymerase-chain-reaction (PCR)*

2.2.7.1 Allgemein

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase-chain-reaction*, PCR) ist eine enzymatisch bedingte Reaktion, die *in vitro* durchgeführt wird. Sie führt zur Amplifizierung von definierten DNA-Fragmenten. Hierzu werden zwei chemisch synthetisierte sequenzspezifische Oligonukleotide, sog. Primer, verwendet. Anhand dieser beiden Primer kann die DNA-Polymerase ein spezifisches DNA-Fragment synthetisieren. Die zur Zielsequenz komplementären Primer umschließen das zu synthetisierende Fragment.

Die PCR ist durch mehrere periodisch sich wiederholende Zyklen gekennzeichnet. Ein Zyklus ist dabei in drei Stadien gegliedert. Begonnen wird jeder Zyklus durch eine Denaturierung der *template*-DNA. Hierbei wird die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Anschließend wird die Temperatur eingestellt, bei der die Primer optimal an ihre spezifische Basensequenz komplementär binden (sog. *annealing*-Temperatur, T_A). Ein Zyklus endet damit, dass die DNA-Polymerase am 3'-Ende eines jeden Primers das DNA-Fragment synthetisiert (Saiki *et al.*, 1985). Danach wird wieder ein neuer Zyklus begonnen, wobei jetzt jedes Produkt ebenfalls als DNA-Matrize dient. So steigt die DNA-Fragment Menge exponentiell an. Die DNA-Polymerase ist thermostabil und denaturiert daher nicht im ersten Schritt eines jeden Zyklus. Diese thermostabile DNA-Polymerase wurde aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und wird daher auch *Taq* DNA-Polymerase genannt (Chien *et al.*, 1976). Für jedes Primerpaar müssen die Reaktionsbedingungen neu optimiert werden. Vor allem die *annealing*-Temperatur richtet sich nach der Sequenz der Primer, aber auch die Mg^{2+} -Ionenkonzentration und die Formamid- oder Betain- (beide Substanzen erhöhen die Primerspezifität) Konzentrationen können variiert werden. Alle PCRs wurden unter der Verwendung von der *Taq* DNA-Polymerase von Invitek und dem dazugehörigen Puffersystem durchgeführt. Diese DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, jedoch keine Korrekturlese-Funktion und die Einbaufehlerrate liegt bei $2,7 \cdot 10^{-5}$ Nukleotiden. Die Fragmentlänge sollte 5 kb nicht überschreiten.

2.2.7.2 *Methylation specific PCR (MSP)*

Diese Methode dient dazu, den Methylierungsstatus von Promotoren verschiedener Gene zu untersuchen und beruht auf einer primerspezifischen Bildung eines PCR-Produktes. Dabei wird von der zu untersuchenden Bisulfit konvertierten DNA (BS-DNA) je eine PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, das nur methylierte DNA bzw. unmethylierte DNA amplifiziert. Dazu werden zwei unterschiedliche Primerpaare für die gleiche zu untersuchende Region konzipiert. Dabei ist es wichtig,

dass die Primer je drei bis vier 5'-CpG-3' Dinukleotide überspannen und zu dem gleichen DNA Strang komplementär sind.

Das methylierte DNA-amplifizierende Primerpaar (methyl. Primerpaar) ist so erstellt worden, dass es spezifisch an BS-DNA bindet, in der nach einer BS-Konvertierung die CpGs erhalten geblieben sind und alle einzeln vorliegenden Cytosine in Uracil konvertiert wurden. In der Primersequenz liegen die Uracile dementsprechend als Thymine vor. Es wird daher nur DNA amplifiziert, die nach der BS-Konvertierung noch CpGs aufweist. Somit liegen die untersuchten CpGs methyliert vor. Das andere Primerpaar (unmethyl. Primerpaar) bindet spezifisch DNA, bei der alle Cytosine konvertiert sind. Hier liegen die untersuchten CpGs unmethyliert vor.

Die PCR-Produkte für methylierte und unmethylierte DNA werden nebeneinander auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Das Auftreten einer Bande bei einem Primerpaar entspricht dem Methylierungsstatus der untersuchten CpGs, für das das Primerpaar konzipiert wurde.

2.2.7.3 *Combined bisulfite-restriction-analysis (COBRA)*

Diese Methode bildet eine Kombination aus einer PCR und einer anschließenden Restriktion des PCR-Produktes, um den Methylierungsstatus von Promotoren verschiedener Gene zu untersuchen. Für die Erstellung des Primerpaares wird die DNA-Sequenz berücksichtigt, die nach einer Bisulfit-Konvertierung vorliegen würde. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Primer zu dem gleichen DNA Strang komplementär sind, da die DNA Stränge nach einer BS Behandlung nicht mehr zueinander komplementär sind. Die Primer sollten keine CpGs enthalten. Bei methylierter DNA sind im PCR Produkt CpGs erhalten geblieben. Bei unmethylierter DNA wird das Cytosin durch die Bisulfit-Behandlung wie alle anderen einzeln vorkommenden Cytosine in Uracil umgewandelt. Dies hat zur Folge, dass im PCR-Produkt anstatt Cytosin Thymin enthalten ist. Nach dieser PCR wird das Produkt mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten, das das Dinukleotid CpG in der Erkennungssequenz aufweist (2.2.8.1; Tab. 2-5). Daher werden alle PCR-Produkte geschnitten, die von methylierter DNA stammen. Unmethyliertes PCR-Produkt enthält kein Cytosin und daher keine Erkennungssequenz mehr. Es wird nicht geschnitten.

Zur Kontrolle des Verlaufs der PCR werden 5 µl des PCR-Produktes auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Erst wenn sich die PCR nach der elektrophoretischen Auftrennung als erfolgreich herausstellt, werden die Produkte mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut (2.2.8.1; Tab. 2-5).

2.2.7.4 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Methode, um Veränderungen der mRNA-Expression verschiedener Gene *semi*-quantitativ nachweisen zu können. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA Polymerase und katalysiert die Umschreibung von retroviraler RNA in DNA. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um *in vitro* RNA-Einzelstränge in den komplementären DNA-Einzelstrang (cDNA) umzuschreiben. An die Synthese der cDNA von der gesamten mRNA schließt sich eine *semi*-quantitative PCR (sqRT-PCR) an. Mit Hilfe der dieser PCR kann mit genspezifischen Primern (Tab. 2-3) die Expressionsrate im Verhältnis zu einem internen Kontrollgen (*house keeping gene*; z.B. *GAPDH*) *semi*-quantitativ bestimmt werden. Im Folgenden sind das PCR-Ansatz-Protokoll und das PCR-Programm für die RT-PCR dargestellt.

PCR-Ansatz-Protokoll für die reverse Transkriptase PCR (RT-PCR):

26 µl Ansatz:	5 µl	M-MLV-Puffer (5x)
	8 µl	dNTPs (2,5 mM)
	1 µl	Poly dT Primer (10 pmol/µl)
	1 µl	Hexamer Primer (10 pmol/µl)
	10 µl	1 µg DNase behandelte RNA. (gesamter DNase Ansatz)
	0,5 µl	reverse Transkriptase (100 U)
	0,5 µl	RNasin (RNase A-Inhibitor) (20 U)

PCR-Programm für RT-PCR:

1. T = 62°C 10 min.
2. *hold* 62°C Inkubation der Proben auf Eis.
PCR-Thermo-Cycler auf 42°C kühlen.
Zugabe der reversen Transkriptase und RNasin.
3. *hold* 42°C Inkubation der Proben im PCR-Thermo-Cycler.
4. T = 42°C 1 h
5. T = 90°C 5 min.
6. *end*

2.2.7.5 Parameter für PCR basierende Methylierungs- und Expressionsanalysen

Im Folgenden ist das PCR-Ansatz-Protokoll und das PCR-Programm für alle verwendeten *methylation specific* PCRs (MSPs), *combined bisulfite-restriction-analysis* (COBRAs) und *semi*-quantitativen PCRs (sqRT-PCRs) dargestellt. Hierbei sind die Magnesiumchlorid-, die Formamidkonzentration, die Menge von BS-DNA- bzw. von cDNA sowie die *annealing*-Temperatur und die Zyklenanzahl durch die Variablen X, Y, Z sowie T_A und C gekennzeichnet und die genauen Parameter für die jeweilige PCR in der sich anschließenden Tabelle (Tab. 2-4) aufgeführt.

PCR-Ansatz-Protokoll für alle MSPs, COBRAs und sqRT-PCRs:

25 μ l Ansatz:	2,5 μ l	NH ₄ -Puffer (10x)
	2 μ l	dNTPs (2,5 mM)
	X μ l	MgCl ₂ (50 mM)
	1 μ l	<i>upper</i> Primer (10 pmol/ μ l)
	1 μ l	<i>lower</i> Primer (10 pmol/ μ l)
	Y μ l	Formamid
	Z μ l	BS-DNA (Bisulfit-behandelt) bzw. cDNA, DNA
<i>Hotstart:</i>	18 μ l – (X + Y + Z)	H ₂ O
	0,5 μ l	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μ l)

PCR-Programm für alle MSPs, COBRAs und sqRT-PCRs:

1. T = 95°C 2 min.
 2. *hold* 95°C Zugabe der *Taq* DNA-Polymerase
 3. T = 95°C 30 s
 4. T_A °C 30 s^a
 5. T = 72°C 30 s^b
 6. T = 72°C 4 min.
- } xC Zyklen
- end*

a,b: Bei der MSP von *FHIT* je 45 s; b:Bei der sqRT-PCR von *RASSF1A* und der MSP von *PTEN* 45 s

Tabelle 2-4: Parameter für die PCR basierende Methylierungs- und Expressionsanalysen und PCR-Produktlängen

Anwendung	MgCl ₂ – Konzentration in µl (X) (in mM)	Formamid in µl (Y) (in %)	BS-DNA, cDNA in µl (Z) (in ng)	Zyklen (C)	Annealing- Temperatur (T _A) in °C	Länge des PCR- Produktes in bp	
PCR-Parameter für <i>methylation specific</i> PCRs							
<i>RASSF1A</i>	methyl.	0,75 (1,5)	0,5 (2)	3-4,5 (150-225)	38	60	93
	unmethyl.	0,75 (1,5)	0,5 (2)	3-4,5 (150-225)	38	60	105
<i>CDKN2A</i>	methyl.	0,75 (1,5)	1 (4)	3-4,5 (150-225)	38	65	150
	unmethyl.	0,75 (1,5)	1 (4)	3-4,5 (150-225)	38	60	151
<i>PTEN</i>	methyl.	0,75 (1,5)	0 (0)	3-4,5 (150-225)	40	60	117
	unmethyl.	0,75 (1,5)	0 (0)	3-4,5 (150-225)	40	60	135
<i>FHIT</i>	methyl.	1,5 (3)	0 (0)	3-4,5 (150-225)	38	63	120
	unmethyl.	1,5 (3)	0 (0)	3-4,5 (150-225)	38	63	85
PCR-Parameter für <i>combined bisulfite-restriction-analysis</i>							
<i>CDKN2A</i>	0,75 (1,5)	0 (0)	3 (150)	35	60	268	
<i>PTEN</i>	0,75 (1,5)	0 (0)	3 (150)	40	60	245	
<i>PTPRG</i>	1,5 (3)	0 (0)	5 (250)	45	55	291	
<i>TP73</i>	1,5 (3)	0 (0)	5 (250)	38	60	118	
PCR-Parameter für RT- und sqRT-PCRs							
<i>β-Aktin</i>	0,75 (1,5)	0 (0)	2 (80 ng)	20	60	226	
<i>GAPDH</i>	0,75 (1,5)	0 (0)	2 (80 ng)	25	60	176	
<i>RASSF1A</i>	0,75 (1,5)	1 (4)	1 (40 ng)	34	60	239	
<i>CDKN2A</i>	0,75 (1,5)	0 (0)	2 (80 ng)	34	60	157	
<i>PTEN</i>	0,75 (1,5)	0 (0)	2 (80 ng)	25	60	246	
<i>DNMT1</i>	1,5 (3)	0 (0)	2 (80 ng)	28	65	133	
<i>DNMT3a</i>	1,5 (3)	0 (0)	1 (40 ng)	32	60	158	
<i>DNMT3b</i>	1,5 (3)	0 (0)	1 (40 ng)	36	53	163	
endogenes <i>IL-6</i>	1,5 (3)	0 (0)	2 (80 ng)	28	56	225	
<i>LMP-1</i>	1,5 (3)	0 (0)	2 (80 ng)	35	60	411	

Anwendung	MgCl ₂ - Konzentration in mM (X)	Formamid in µl (Y) (in %)	BS-DNA, cDNA in µl (Z) (in ng)	Zyklen (C)	Annealing- Temperatur (T _A) in °C	Länge des PCR- Produktes in bp
PCR-Parameter für sqRT-PCRs						
<i>DNMT3b</i>	1,5 (3)	0 (0)	2 (80 ng)	34	60	357
PCR-Parameter für Virusanalysen						
genomisches <i>GAPDH</i>	1,5 (3)	(0)	1 (100-250)	34	59	204
MCPyV	1,5 (3)	(0)	1 (100-250)	40	63	195
SV40	1,5 (3)	(0)	1 (100-250)	34	63	191

methyl.: Oligonukleotide für methylierte DNA; unmethyl.: Oligonukleotide für unmethylierte DNA

2.2.8 Restriktion

Die Restriktion ist eine allgemeine Methode, um DNA in kürzere Fragmente mit definierten Enden zu spalten. Die für diese Methode benötigten Restriktionsendonukleasen vom Typ 2 sind für ihre enzymatische Reaktion auf eine jeweils für eine bestimmte Nuklease spezifische Erkennungssequenz angewiesen. Restriktionsendonukleasen dieses Typs schneiden die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer Erkennungssequenz. Diese Sequenz kann unterschiedlich lang sein und besteht meist aus vier, sechs oder acht Basenpaaren. Je länger sie ist, desto seltener kommt diese Sequenz im Genom vor und umso länger sind daher die entstehenden DNA-Fragmente. Diese Erkennungssequenzen sind in der Regel palindromische Sequenzen. Durch eine Restriktion können 5'-Überhänge (sog. *sticky ends*) oder glatte DNA-Enden (sog. *blunt ends*) entstehen. Dies ist von der verwendeten Restriktionsendonuklease abhängig.

2.2.8.1 Restriktion für *combined bisulfite-restriction-analysis*

An die PCRs unter 2.2.7.3 schließen sich Restriktionen mit Restriktionsendonukleasen an, die in ihrer Erkennungssequenz mindestens ein CpG enthalten. Es wurde *Taq^αI* (5'-TCGA-3') und *BstU I* (5'-CGCG-3') verwendet.

Der Restriktionsverdau wird auf ein 2%iges Agarosegel neben einem sog. *mock*-Verdau aufgetragen, der die gleiche Menge PCR-Produkt enthält, jedoch keine Nuklease. Dieser Vergleich von gespaltenem zu ungespaltenem PCR-Produkt ist nötig, um nach einer elektrophoretischen Auftrennung den Methylierungsstatus analysieren zu können.

Tabelle 2-5: Bei der *combined bisulfite-restriction-analysis* verwendete Restriktionsendonukleasen und Restriktionsproduktgrößen.

Produkt	Restriktionsendonuklease	Restriktionsendproduktgrößen in bp
<i>CDKN2A</i>	<i>Taq^qI</i> (5'-TCGA-3')	220, 48
<i>PTEN</i>	<i>Taq^qI</i> (5'-TCGA-3')	169, 12, 13, 12, 39
<i>PTPRG</i>	<i>Taq^qI</i> (5'-TCGA-3')	31, 120, 29, 111
<i>TP73</i>	<i>BstU I</i> (5'-CGCG-3')	44, 74

2.2.8.2 Restriktion für Klonierungen

Für die Klonierung von Vektor-Konstrukten ist es von Vorteil, den Vektor und das zu untersuchende Insert mit Restriktionsendonukleasen zu behandeln, die definierte 5'-Über-hänge (*sticky ends*) erzeugen. Dadurch werden eine folgende Ligation und eine orientierte Klonierung erleichtert. Für den Vektor und das Insert werden die gleichen oder kompatible Restriktionsendonukleasen verwendet.

Da für Ligationen (2.2.10.1) eine höhere Menge an DNA verwendet wird, ist es erforderlich, das Volumen des unten aufgeführten Ligations-Ansatzes zu erhöhen. In der Regel werden 10 µg DNA verwendet.

2.2.8.3 Kontrollrestriktion für Vektor-Konstrukte

Mit der Restriktion kann darüber hinaus die Anwesenheit und die Orientierung des Inserts im Vektor überprüft werden. Dies kann aus den entstehenden Fragmenten geschlossen werden, die sich nach der Restriktion auf einem 1%iges Agarosegel auftrennen. Um aus den Fragmentgrößen eine Aussage treffen zu können, werden Restriktionsendonukleasen benötigt, die einmal im Insert und mindestens einmal im Vektor schneiden. Gibt es nur zwei Schnittstellen, sollten die beiden Fragmente nicht die gleiche Größe besitzen, um eine bessere Unterscheidbarkeit zu gewährleisten. Es kann sich bei den Enzymen um ein und dasselbe oder um zwei unterschiedliche handeln. Es ist von Vorteil, Enzyme zu verwenden, die bei unterschiedlicher Orientierung des Inserts auch unterschiedliche Fragmentgrößen ergeben.

Restriktions-Ansatz-Protokoll für COBRAs, präparative definierte Restriktionen für Ligationen und Kontrollrestriktionen von klonierten Vektor-Konstrukten:

Alle Enzyme werden mit 10 Units (Endkonzentration) und ihrem dazugehörigen Puffersystem eingesetzt. Das Restriktions-Ansatzvolumen lässt sich proportional beliebig erhöhen und kann so auch für präparative Restriktionen verwendet werden (2.2.8.2).

Die PCR-Produkt-Menge richtet sich nach ihrer Konzentration. Meist wird bei einem 10 µl Ansatz 5 µl PCR-Produkt eingesetzt. Für präparative Restriktionen werden 10 µg Vektor in einem 100 µl Volumen eingesetzt. Weiterhin wird für eine Kontrollrestriktion von klonierten Vektor-Konstrukten 5 µl einer Mini Plasmid Präparation (2.2.10.3) eingesetzt.

10 µl Ansatz:	1	µl	Restriktionsendonuklease (var.)
	1	µl	Puffer (10x)
	X	µl	PCR-Produkt, Vektor, Insert oder Konstrukt
	8 – X	µl	H ₂ O

- Dieser Ansatz wird 1,5 bis 2 h bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms im PCR-Thermo-Cycler bzw. Wasserbad inkubiert.
- Nach Ablauf der Inkubation wird der Restriktionsansatz je nach zu erwartenden Restriktionsprodukten komplett auf einem 1- oder 2%igem Agarosegel aufgetragen. Im Fall der Restriktion für COBRA wird zusätzlich der mitgeführte *mock*-Verdau neben jeder Probe aufgetragen und anschließend der Methylierungsstatus analysiert. Bei einer Kontrollrestriktion von Vektor-Konstrukten wird die Größe der Restriktionsprodukte analysiert und bei einer präparativen Restriktion folgt eine Gelextraktion (2.2.9).

2.2.9 Gelextraktion

Die Gelextraktion ist eine Methode, um ein spezifisches DNA-Fragment aus einem PCR-Gemisch oder Restriktionsansatz zu isolieren. Hierzu wird das gesamte PCR-Gemisch oder Restriktionsansatz auf ein 1- oder 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der gewünschte Abschnitt wird unter UV-Licht aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel-Extraction-Kit von QIAGEN aufgereinigt. Hier wird das Gelstückchen in einem aus chaotropen Salzen bestehenden Puffer gelöst und die DNA anschließend auf einer Silica-Membran gebunden, gewaschen und in 30 bis 50 µl sterilem H₂O eluiert. Die Menge richtet sich nach der Menge der DNA.

2.2.10 Vektor-Konstrukt Klonierung

Eine Klonierung ist eine generelle Methode, um DNA-Fragmente in einen definierten Vektor zu bringen. Innerhalb dieser Vektoren kann das eingefügte DNA-Fragment näher untersucht werden. Innerhalb dieser Arbeit wurde mit solchen Vektor-Konstrukten Expressionsanalysen von verschiedenen Genen durchgeführt.

Die Klonierung setzt sich aus der Ligation des „leeren“ Vektors und des zu untersuchenden DNA-Fragments zusammen. Anschließend wird das Ligationsprodukt in chemokompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert, in diesen vermehrt und selektiert. Abschließend wird das Vektor-Konstrukt wieder isoliert und mit Hilfe eines Kontrollrestriktionsverdau (2.2.8.3) verifiziert. Abschließend kann mit dem verifizierten Vektor-Konstrukt experimentiert werden.

2.2.10.1 Ligation

Die Ligation ist eine ATP abhängige Reaktion und katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3'-Hydroxygruppe am Ende des einen DNA-Fragments und einem 5'-Phosphat-Rest am Ende eines anderen DNA-Fragments.

Die Ligation des zu untersuchenden DNA-Fragments und des linearisierten und „leeren“ Vektors kann über einen einfachen 5'-A-Überhang (bei PCR-Produkten) oder durch zuvor definiert gespaltene Restriktionsschnittstellen (2.2.8.2) erfolgen. Nach einer erfolgreichen Ligation erhält man ein rekombinantes Konstrukt, bestehend aus dem Vektor und dem zu untersuchenden Insert. Im Folgenden ist das Ligations-Ansatz-Protokoll dargestellt.

Ligations-Ansatz-Protokoll:

10 µl Ansatz	3x ng	DNA-Fragment*
	1 µl	Ligase Puffer (10x)
	1 µl	T4 Ligase
	1x ng	linearisierter Vektor
ad steriles dH ₂ O auf ein Endvolumen von 10 µl.		

Der Ligations-Ansatz wird über Nacht bei 4°C bzw. 4h bei RT inkubiert.

*: Das DNA-Fragment wird im 3fachen Überschuss zum linearisierten Vektor eingesetzt werden.

2.2.10.2 Transformation von chemokompetenten *E. coli*

Die Transformation ist eine Methode, um fremde, rekombinante DNA in kompetente *E. coli* einzuschleusen und zu vervielfältigen. Nach einer erfolgreichen Ligation (2.2.10.1) ist es notwendig, das Vektor-Konstrukt in *E. coli* zu transformieren, um es zu vervielfältigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der chemokompetente *E. coli* – Stamm *TAM 1* von Active Motif (Tab. 2-2) verwendet. Bei dieser Methode erfolgt das Einschleusen der rekombinanten DNA über einen Hitzeschock. Durch den Hitzeschock bilden sich Poren in der Membran und ermöglichen so die Aufnahme des zuvor hinzugefügten Vektor-Konstruktes. Nach einer Inkubationszeit bei 37°C wird das Transformationsgemisch auf selektiven LB-Kulturplatten ausplattiert. Abschließend werden positiv selektierte *E. coli*-Klone auf das Vorhandensein des korrekten Vektor-Konstrukts hin überprüft (2.2.8.3) und das vervielfältigte isolierte Vektor-Konstrukt für Experimente verwendet. Im Folgenden ist das Transformations-Ansatz-Protokoll dargestellt.

Transformations-Ansatz-Protokoll für *TAM 1 Extra Competent E. coli*:

- Pro Transformations-Ansatz werden 25 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut.
- 2,5 bis 5 µl Ligations-Ansatz werden hinzugefügt und manuell vermischt. Die Zellen werden für 30 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend folgt der Hitzeschock bei 42°C für 30 s.
- Nach einer Inkubation von 2 min auf Eis werden 250 µl SOC- oder NZY-Medium hinzugefügt. Der Ansatz wird für 1 h bei 37°C unter Schütteln bei 225 bis 250 rpm im Brutschrank inkubiert.
- Jeder Transformationsansatz wird auf eine LB-Kulturplatte mit einem entsprechenden Antibiotikum mit einem sterilen Glasspatel bis zur Trockene ausplattiert. Die Kulturplatten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10.3 Vektor-Konstrukt-Isolation aus *E. coli*

Für weitere Arbeiten ist es erforderlich, das durch Ligation und Transformation konstruierte und vervielfältigte Vektor-Konstrukt aus *E. coli* zu isolieren. Zur Isolation werden auf dem Selektionsmedium der LB-Platten gewachsene *E. coli*-Kolonien verwendet. Die isolierten Konstrukte müssen anschließend durch eine Kontrollrestriktion (2.2.8.3) auf das Vorhandensein des Inserts überprüft werden.

Hierfür wird je eine *E. coli* Kolonie mittels einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen, mitsamt der Spitze in 3 ml LB-Medium mit Resistenz entsprechendem Antibiotika-Zusatz überführt und über Nacht bei 37°C bei 225 bis 250 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgt die Isolierung des Vektor-Konstrukts mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Quick Pure Kits von Macherey-Nagel nach Protokoll.

2.2.11 Transfektion von humanen Zelllinien

Um die Auswirkungen des *latent membrane proteine 1* (LMP-1) des humanen Herpes Virus 4 (HHV 4; vgl. Epstein-Barr Virus) und der DNA Methyltransferase Variante delta 3b4 (Δ DNMT3b4) in humanen Zellen untersuchen zu können, wurden diese mit einem Vektor-Konstrukt transfiziert, das die entsprechende cDNA enthält. Als Kontrolle wurde der gleiche Vektor ohne die jeweilige cDNA transfiziert. Diese Transfektion erfolgte mit dem Reagenz Hekfektin von Bio-Rad Laboratories Inc. Es wurde die Zelllinie IGR-I verwendet. Diese Zelllinie hat ihren Ursprung in einer Metastase eines malignen Melanoms (Tab. 2-1). Es wurden zwei Arten der Transfektion angewendet, zum einen eine transiente und zum anderen eine stabile Transfektion.

Bei einer transienten Transfektion wird die kurzfristige Reaktion der Zellen auf das artifiziell exprimierte Protein hin untersucht. Dabei wird das Vektor-Konstrukt nicht in das Wirtsgenom integriert. Da es nicht integriert ist, geht es durch darauffolgende Zellteilungen verloren, so dass die Reaktion auf die Zelle nur über einen kurzen Zeitraum untersucht werden kann.

Bei der stabilen Transfektion wird ein Selektionsdruck durch eine auf dem Vektor-Konstrukt befindliche Antibiotikaresistenz ausgeübt. Dies führt dazu, dass sich nur Zellen teilen können, die das Vektor-Konstrukt in ihr Wirtsgenom integriert haben und nicht über Zellteilungen verlieren können. Die Integration ist zufällig und hat in einem inaktiven Teil des Genoms keine Auswirkungen. Daher muss eine Expressionsanalyse des eingebrachten Gens vorgenommen werden.

Das Protokoll für die beiden Transfektions-Arten unterscheidet sich nur durch die anschließende Selektion durch Antibiotika, um stabile Klone zu erzeugen. Im Folgenden ist das Transfektions-Ansatz-Protokoll dargestellt.

Transfektions-Ansatz-Protokoll für 6 cm Zellkulturschalen bei 60%iger Konfluenz:

Ansatz A	1-5 µg	DNA (Vektor-Konstrukt)
	125 µl	OPTI-MEM I®
Ansatz B	25 µl	Hekfektin
	125 µl	OPTI-MEM I®

- Ansatz A und B werden gemischt. Anschließend werden die beiden Lösungen vereinigt, gründlich gevortext und nach einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf das Medium der Zellen aufgetropft.
- Nach 24 h wird das Medium gewechselt. Im Fall der transienten Transfektion wird zwei bis drei Tage inkubiert, bevor die Zellen geerntet werden. Im Fall der stabilen Transfektion wird dem Medium der Resistenz entsprechendes Antibiotikum zugefügt. Dies wird fortgesetzt, bis sich auf der Zellkulturplatte Zellklone bilden. Diese werden mit sterilem Filterpapier isoliert und weiter kultiviert. Nach einer Kontroll-Expressionsanalyse können weiterführende Experimente durchgeführt werden.

Tabelle 2-6: Vektor-Konstrukte für transiente und stabile Transfektionen in humane Zellen.

Gen	transientes Konstrukt	stabiles Konstrukt
<i>LMP-1</i>	pFLAG-CMV TM -2	-
<i>ADNMT3b4</i>	pcDNA6/V5-His C	pcDNA6/V5-His C

2.2.12 Statistische Verfahren

Innerhalb dieser Arbeit wurden der exakte Test nach *Fisher*, Kaplan-Meier Überlebensanalysen und uni- sowie multivariate Cox Regressionsanalysen verwendet. Hierfür wurde das Statistikprogramm SPSS17 von SPSS GmbH Software verwendet.

2x2 Kontingenztafeln und Fisher-Test:

Bei den Daten dieser Arbeit, die bei den Methylierungs- und bei den Virusanalysen gewonnen wurden, handelt es sich um kategoriale nominalskalierte Datensätze. Dies bedeutet, dass die Daten unterschiedliche Kategorien beschreiben, z.B. „methyliert/unmethyliert“ bzw. „virale Präsenz/keine virale Präsenz“. Jede Kategorie wird dabei durch unterschiedliche Zustände beschrieben, z.B. „ja“ bzw. „nein“. Für diese Art der Datenstruktur bietet sich an, eine Kreuztabelle mit einer entsprechenden Signifikanzprüfung zu erstellen. Die Nullhypothese lautet, dass kein Zusammenhang besteht.

Zur Prüfung der Irrtumswahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird, wurde der exakte Test nach *Fisher* gewählt, da eine 2x2 Kontingenztafel und in einigen Fällen eine erwartete Häufigkeit < 5 vorlag.

Die verwendeten Signifikanzniveaus wurden standardmäßig gewählt und lauten:

$p \leq 0,05$ (signifikant, Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5%),

$p \leq 0,01$ (hoch signifikant, Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1%) und

$p \leq 0,001$ (höchst signifikant, Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1‰)

Der sog. *p-Wert* gibt dabei die Irrtumswahrscheinlichkeit an, d.h. mit wie viel prozentiger Wahrscheinlichkeit ein Irrtum begangen wird, wenn angenommen wird, dass ein Zusammenhang besteht. Ist diese Wahrscheinlichkeit kleiner als das Signifikanzniveau $p \leq 0,05$, ist ein Zusammenhang signifikant.

Kaplan-Meier Überlebensanalysen:

Die Überlebensanalyse nach Kaplan und Meier ist eine spezielle Form der Ereignisanalyse. Mit Hilfe dieser Form der statistischen Analyse kann die verstrichene Zeit, bis ein bestimmtes Ereignis eintritt, verglichen und die Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt, geschätzt werden.

Mit der Kaplan-Meier Methode lassen sich auch nicht identische Beobachtungszeiträume miteinander vergleichen, somit eignet sie sich für Überlebenszeitanalysen von Patienten. Bei dieser Methode definieren die auftretenden Ereignisse die Beobachtungsintervalle. Als Ereignis wurden der Tod des Patienten bzw. das Auftreten eines Rezidivs nach erfolgter Resektion des malignen Melanoms gewählt.

Damit kann z.B. der Einfluss geschätzt werden, ob ein bestimmtes genetisches oder klinisch-pathologisches Merkmal einer Tumorentität zu einer erhöhten oder erniedrigten Mortalität führt, und so z.B. als prognostischer Marker verwendet werden kann (Kaplan and Meier, 1958). Um zwei oder mehrere solcher Überlebensfunktionen statistisch vergleichen bzw. berechnen zu können, ob zwischen diesen Überlebenskurven ein signifikanter Unterschied besteht, wird der *Log Rank/Mantel-Cox* Test verwendet (Cox, 1972; Mantel, 1966).

Ist die Überlebenszeit nicht exakt bestimmbar, beispielsweise weil der der Tod des Patienten durch andere Umstände (z.B. Verkehrsunfall) eingetreten ist oder die Beobachtungszeit endet, bevor alle Patienten verstorben sind, können nur Mindestüberlebenszeiten angegeben werden. Diese Fälle werden zensierte Überlebenszeit genannt und werden durch Kreuze (+) in den Kaplan-Meier Kurven gekennzeichnet. Es wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Zensierung unabhängig von der Wahrscheinlichkeit des Zielereignisses ist.

Cox Regressionsanalysen:

Die Cox Regression ist eine andere Form der Überlebenszeitanalyse. Durch die univariate Cox Regression lassen sich die Ergebnisse der Kaplan-Meier Überlebenszeitanalysen zum einen bestätigen und zum anderen lässt sich durch die multivariate Cox Regression dieser signifikanten Merkmale überprüfen, ob das jeweilige Merkmal einen unabhängigen Faktor für das Überleben oder das Auftreten eines Rezidivs darstellt. Mit Hilfe dieser Analyse kann man durch das erhaltene Quotenverhältnis, sog. *odds ratio*, eine Aussage darüber treffen, wie stark sich die Mortalität bzw. das Auftreten eines Rezidivs bei dem jeweiligen Merkmal erhöht oder erniedrigt.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die epigenetischen Veränderungen von Tumorsuppressorgenen in neuroendokrinen Tumoren und die Auswirkungen verschiedener endo- und exogener Faktoren auf den Methylierungsstatus untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden je nach ihrer Thematik und Fragestellung unterteilt. Zunächst befasst sich diese Arbeit mit Methylierungsanalysen der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen in Tumoren, deren Vorläuferzellen dem neuroendokrinen System entstammen, den sog. neuroendokrinen Tumoren (NET) (Pearse, 1968; Pearse, 1980; Shimosato, 2002). Hierfür wurden maligne Melanome (MM), Merkelzellkarzinome (MCC) und kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC) auf ihren Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN* analysiert. Die Merkelzellkarzinome wurden zusätzlich in den Tumorsuppressorgenen *PTPRG* und *TP73* analysiert. Darüber hinaus wurden Zusammenhänge mit bereits analysierten histologischen Charakteristika Tumordurchmesser, Tumordicke, Clark-Level (Clark *et al.*, 1969), Tumortyp, Tumorlokalisierung nach TANS (*thorax, upper arm, neck, scalp*) (Garbe *et al.*, 1995) und die akrale Lokalisierung, Ulzerationsstatus, Nävuszellnävus-Assoziation, Infiltration, basophiler Degeneration sowie Mitoseindex der malignen Melanome untersucht. Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit dem Nachweis der viralen Präsenz von zwei Vertretern aus der Familie der Polyomaviridae, dem Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) und dem *Simian virus 40* (SV40) in den zuvor untersuchten neuroendokrinen Tumoren. Darüber hinaus wurde überprüft, ob zwischen einer solchen Infektion und einer Methylierung von Tumorsuppressorgenen ein Zusammenhang besteht.

Der letzte Teil dieser Arbeit beinhaltet die Ergebnisse der DNA methylierenden Eigenschaften von verschiedenen endogenen und exogenen Einflüssen auf humane Zellen. Dabei wurden die Einflüsse von der DNA Methyltransferase delta 3b4 (Δ DNMT3b4), dem *latent membrane protein 1* (LMP-1), dem Cytokin Interleukin-6 (IL-6) und von UV-B Licht untersucht.

3.1 Promoter-Methylierungsstatus-Analysen von Tumorsuppressorgenen in neuroendokrinen Tumoren

Ein maligner Tumor geht von einer entarteten Zelle aus. Normale Zellen entarten, indem durch somatische Mutationen oder durch epigenetische Prozesse Tumorsuppressorgene inaktiviert werden (Knudson, 1971; Laird, 2005).

Ein Gen wird unter anderem durch eine Hypermethylierung einer CpG reichen Promotorregion epigenetisch inaktiviert. Dabei wird der 5'-Kohlenstoff des Cytosins in dem 5'-CpG-3' Dinukleotids methyliert. Diese DNA Methylierungen können durch verschiedene Methoden untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Methylierungsassays *methylation specific PCR* (MSP) (2.2.7.2) und *combined bisulfite-restriction-analysis* (COBRA) (2.2.7.3) durchgeführt.

Während dieser Arbeit wurden sowohl primäre maligne Melanome, primäre und rezidive Merkelzellkarzinome sowie primäre kleinzellige Lungenkarzinome auf den Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen untersucht. Diese drei Tumorentitäten gehen aus Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems (DNES) hervor. Zellen, die dem diffusen neuroendokrinen System angehören, haben die Fähigkeit Hormone zu bilden (Pearse, 1968). Die Tumore entstammen verschiedenen Tumorbanken und waren alle in Paraffin konserviert. Für die jeweiligen Analysen war es notwendig das Paraffin komplett von einem Teil des konservierten Gewebes zu entfernen. Hierzu wurden von jeder Tumorprobe mit einem Mikrotom etwa 20 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese 20 Schnitte bildeten das Ausgangsmaterial für die Entparaffinierung und DNA Isolation (2.2.2.1.1) der jeweiligen Probe.

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war die Untersuchung von epigenetischen Inaktivierungen in den drei neuroendokrinen Tumorentitäten. Insgesamt wurden 619 Proben von 230 malignen Melanomen (MM), 108 Proben von 98 Merkelzellkarzinomen (MCC) und 18 Proben von 18 kleinzelligen Lungenkarzinomen untersucht. Diese wurden mit dem Methylierungsstatus von Vergleichskontroll-Gewebeproben statistisch verglichen. Als Vergleichskontroll-Gewebe dienen 18 Nävuszellnävus-Gewebe- und 26 Blutproben. Hierbei wurde der Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene *RAS-association domain family 1A-Gen (RASSF1A)*, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A-Gen (CDKN2A)*, *phosphatase and tensin homolog-Gen (PTEN)*, *fragile histidine triad-Gen (FHIT)*, *protein tyrosine phosphatase, receptor type, G-Gen (PTPRG)* und *tumor protein p73-Gen (TP73)* untersucht. Im Folgenden sind zunächst die Methylierungsanalysen der Vergleichskontroll-Gewebe aufgeführt, gefolgt von den Ergebnissen der Tumorentitäten.

3.1.1 Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen in Kontrollgewebe

Für die Methylierungsanalysen in den Nävuszellnävus-Gewebeproben standen insgesamt 18 und in den Blutproben insgesamt 26 Proben zur Verfügung.

Für die Analyse wurde für *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN* und *FHIT* das Prinzip der MSP und für *PTPRG* und *TP73* das Prinzip der COBRA angewendet. Es wurde eine PCR (2.2.7.5) und im Fall von *PTPRG* und *TP73* anschließend eine Restriktion mit *Taq^I* bzw. *BstU I* durchgeführt (2.2.8.1) und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.1.1 Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen in Nävuszellnävus-Gewebe

Für die Untersuchung des Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene (*RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73*) in Nävuszellnävus-Gewebeproben (NZN) wurden für *RASSF1A* 17, für *CDKN2A* 16, für *PTEN* neun, für *FHIT* 17, für *PTPRG* zehn und für *TP73* zehn Nävuszellnävus-Gewebeproben analysiert. Es wurden alle Proben auf den Methylierungsstatus im jeweiligen Gen analysiert (Tab.6-6). Konnte eine Methylierung detektiert werden, wurde diese Gewebeprobe im Folgenden für dieses Gen als methyliert betrachtet. Exemplarisch werden die Ergebnisse der MSPs von sechs Proben für *RASSF1A* und von vier Proben für *PTEN* in Abbildung 3-1 dargestellt.

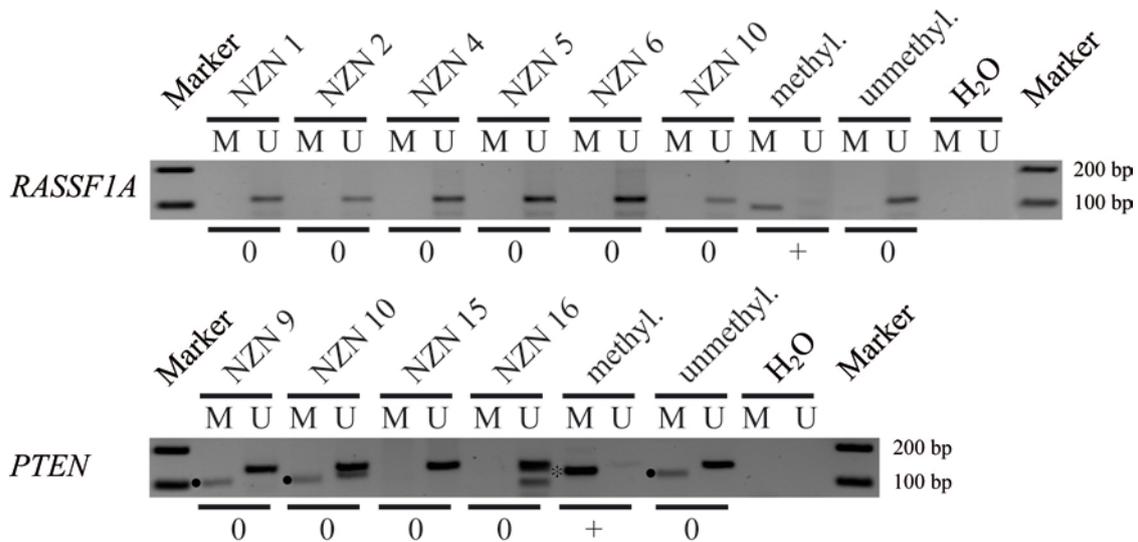


Abbildung 3-1: Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* in NÄvuszellnävus-Gewebeproben. Aus NÄvuszellnävus-Gewebeproben (NZN) isolierte DNA wurde nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A* 105 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet; *: zeigt das methylierte MSP Produkt bei *PTEN*; •: zeigt ein Nebenprodukt bei *PTEN*.

Die *methylation specific* PCR der NÄvuszellnävus-Gewebeproben von *RASSF1A* zeigen deutliche Produkte in den mit U gekennzeichneten Spuren (Abb. 3-1). In den mit M gekennzeichneten Spuren wurden keine Produkte detektiert. Die methylierte Kontrolle (methyl.) zeigt in der linken Spur (M) ein methyliertes Produkt und die unmethylierte Kontrolle (unmethyl.) zeigt in der rechten Spur (U) ein unmethyliertes Produkt.

Bei dem Tumorsuppressorgen *PTEN* zeigen die mit M gekennzeichneten Spuren, dass nur unmethylierte Produkte detektiert wurden. Jedoch sind bei Probe NZN 9, NZN 10 und bei der unmethylierten Kontrolle (unmethyl.) Nebenprodukte in der linken Spur (M) zu erkennen. Darüber hinaus zeigt die Gewebeprobe NZN 16 in der rechten Spur (U) ein Nebenprodukt unterhalb des unmethylierten Produktes. Bei dem Tumorsuppressorgen *PTEN* werden diese Nebenprodukte durch einen Punkt (•) gekennzeichnet, methylierte Produkte durch einen Stern (*). In der Abbildung 3-1 zeigen nur die methylierten Kontrollen (methyl.) von *RASSF1A* und *PTEN* ein methyliertes Produkt.

Insgesamt wurde bei den Tumorsuppressorgen *RASSF1A*, *PTPRG* und *TP73* in keiner Gewebeprobe ein methyliertes Produkt detektiert. Bei *CDKN2A* und *FHIT* weisen jeweils ca. 20% und bei *PTEN* 11% der Gewebeproben ein methyliertes Produkt auf. Die gesamten Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

3.1.1.2 Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen in Blutproben

Für die Untersuchung des Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene (*RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73*) in den Blutproben wurden für *RASSF1A* 21, für *CDKN2A* 23, für *PTEN* 23, für *FHIT* 22, für *PTPRG* 23 und für *TP73* 23 Blutproben aus einer Gesamtheit von 26 Gewebeproben analysiert. Exemplarisch werden die Ergebnisse der MSPs von fünf Proben für *RASSF1A* und *PTEN* in Abbildung 3-2 dargestellt.

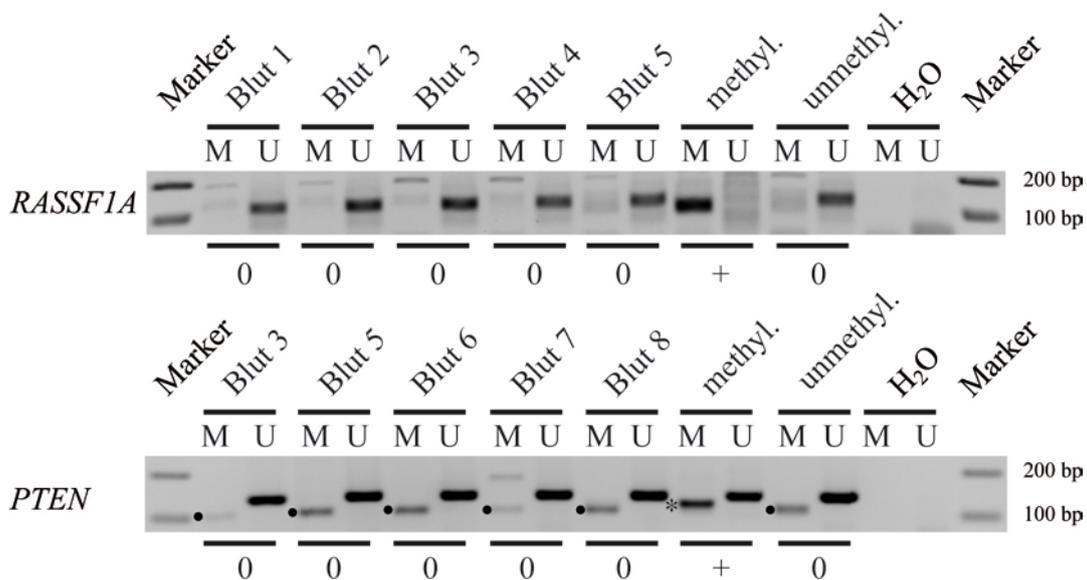


Abbildung 3-2: Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* in Blutproben. Aus Blutproben isolierte DNA wurde nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A* 105 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet; *: zeigt das methylierte MSP Produkt bei *PTEN*; •: zeigt ein Nebenprodukt bei *PTEN*.

In den gezeigten Blutproben wurde in der *methylation specific* PCR von *RASSF1A* unmethylierte Produkte in allen gezeigten Blutproben (Blut: 1, 2, 3 und 5) detektiert (Abb. 3-2). In den mit M gekennzeichneten Spuren wurden außer in der methylierten Kontrolle (methyl.) keine Produkte nachgewiesen.

Bei allen gezeigten Blutproben (Blut: 3, 5, 6, 7 und 8) wurden für das Tumorsuppressorgen *PTEN* ein unmethyliertes Produkt (Spur U) und kein methyliertes Produkt (Spur M) detektiert. Es zeigten sich Nebenprodukte in diesen Blutproben (Blut: 3, 5, 6, 7 und 8) und der unmethylierten Kontrolle (methyl.) in der jeweils linken Spur (M). Diese Nebenprodukte wurden durch einen Punkt (•) gekennzeichnet. In der methylierten Kontrolle ist zusätzlich zu dem methylierten Produkt ein unmethyliertes Produkt zu erkennen. Dieses ist auf eine unvollständige *in vitro* Methylierung zurückzuführen. Somit weisen die gezeigten Blutproben keine methylierten Produkte auf.

Insgesamt wurde bei den Tumorsuppressorgenen *RASSF1A*, *PTEN*, *PTPRG* und *TP73* in keiner Blutprobe ein methyliertes Produkt detektiert. Bei den Tumorsuppressorgenen *CDKN2A* und *FHIT* waren 17% bzw. 18% der untersuchten Blutproben methyliert. Die gesamten Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

3.1.1.3 Zusammenfassung der Methylierungsdaten der Nävuszellnävus-Gewebeproben und der Blutproben

Um das Ausmaß einer epigenetischen Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens in neuro-endokrinen Tumoren einschätzen zu können, ist es erforderlich auch normale und nicht entartete Gewebe in den gleichen Merkmalen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde zum einen Gewebe von sog. Burow-Dreiecken einer Nävuszellnävus-Exzision (in dieser Arbeit als Nävuszellnävus-Gewebe bezeichnet) (Abb. 3-1) und zum anderen wurden einfache Blutproben (Abb. 3-2) verwendet. Diese nicht entarteten Gewebe wurden in den Tumorsuppressorgenen *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73* auf ihren Methylierungsstatus untersucht (Tab. 3-1, 6-6, 6-7).

Tabelle 3-1: Zusammenfassung der Methylierungsdaten der untersuchten Tumorsuppressorgene im Nävuszellnävus- und Blut-Vergleichskontroll-Gewebe

Tumorsuppressorgene	Methylierungsstatus im NZN-Vergleichskontroll-Gewebe in %	Methylierungsstatus im Blut-Vergleichskontroll-Gewebe in %
<i>RASSF1A</i>	0 (0/17)	0 (0/21)
<i>CDKN2A</i>	19 (3/16)	17 (4/23)
<i>PTEN</i>	11 (1/9)	0 (0/23)
<i>FHIT</i>	18 (3/17)	18 (4/22)
<i>PTPRG</i>	0 (0/10)	0 (0/23)
<i>TP73</i>	0 (0/10)	0 (0/23)

Der Inhalt der Klammern zeigt das Verhältnis der Anzahl von methylierten Tumoren zu der Gesamtanzahl der untersuchten Tumore. (Dabei entspricht die erste Zahl der Menge der methylierten Tumore und die zweite Zahl der Gesamtmenge der untersuchten Tumore)

So sind die Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *PTPRG* und *TP73* in allen untersuchten Proben des NZN-Gewebes und der Blutproben nicht methyliert (Tab. 3-1). *CDKN2A*, *PTEN* und *FHIT* weisen geringe Methylierungsgrade auf. *CDKN2A* ist sowohl in etwa 20% der NZN-Gewebeproben als auch in ca. 20% der Blutproben methyliert (Tab. 3-1). Je 18% der untersuchten Proben beider Gewebe

weisen eine Methylierung in der Promotorregion von *FHIT* auf. Im NZN-Gewebe zeigen ca. 10% der untersuchten Proben eine Methylierung im Tumorsuppressorgen *PTEN*, alle untersuchten Blutproben weisen keine Methylierung auf. Diese Daten bilden das Ausgangsmaterial für vergleichende statistische Analysen (2.2.12) mit den im Folgenden dargestellten Ergebnissen der Methylierungsanalysen der neuroendokrinen Tumore.

3.1.2 Hypermethylierung von *PTEN* im malignen Melanom

Für die Methylierungsanalysen im malignen Melanom (MM) standen insgesamt 619 Proben von 230 Tumoren zur Verfügung. Dabei lagen pro Tumor im Durchschnitt 2,7 Proben vor. Es wurden alle Proben eines Tumors auf den Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* analysiert. Konnte in einer Probe eines Tumors eine Methylierung detektiert werden, wurde dieser Tumor im Folgenden für dieses Gen als methyliert betrachtet.

Für die Untersuchung des Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene (*RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN*) im malignen Melanom wurden für *RASSF1A* 217, für *CDKN2A* 213 und für *PTEN* 200 maligne Melanome analysiert. Für die Analyse wurde die Methylierungsanalyse MSP angewendet. Es wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt. Exemplarisch werden die Ergebnisse der MSPs von vier Proben (a-d) eines Tumors (MM 45) für *RASSF1A*, drei Proben des Tumors MM 154 für *CDKN2A* und drei Proben des Tumors MM 161 und zwei Proben des Tumors MM 135 in Abbildung 3-3 dargestellt.

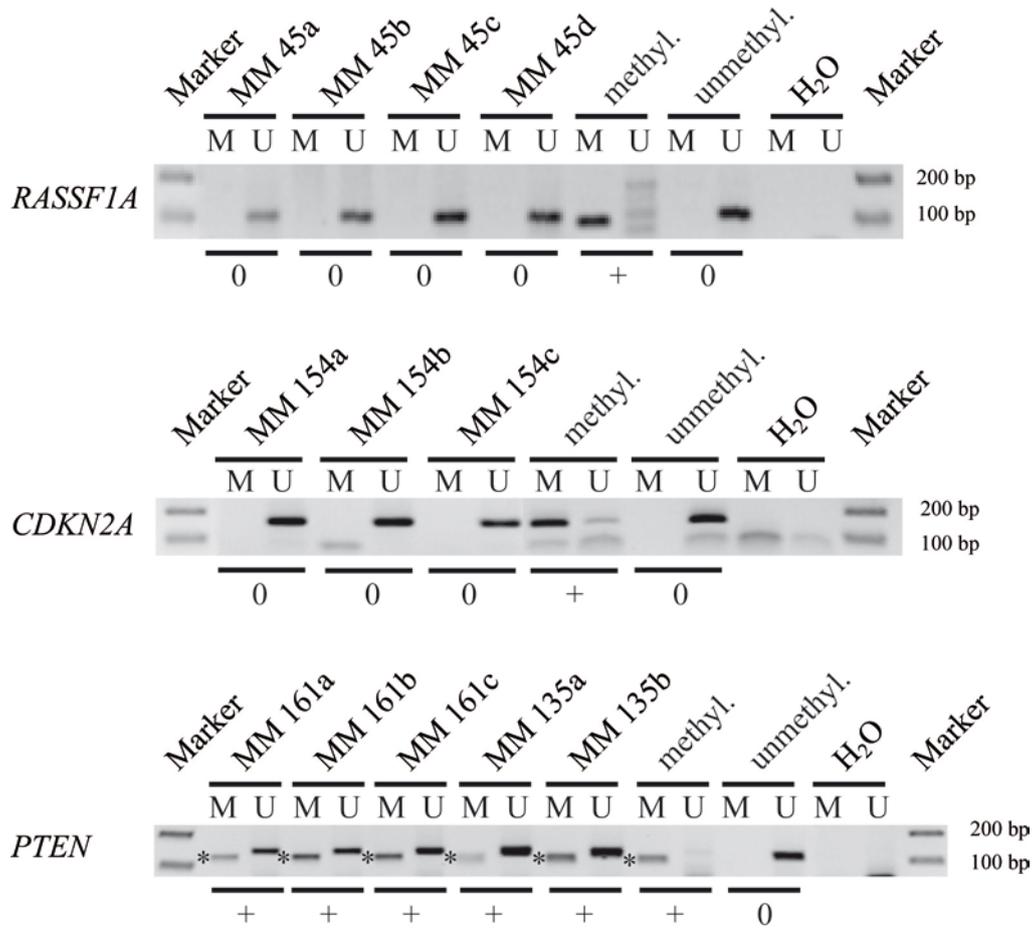


Abbildung 3-3: Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* im malignen Melanom. Aus malignen Melanomen (MM) isolierte DNA wurde nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *CDKN2A*: 150 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A* 105 bp; *CDKN2A*: 151 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet; *: zeigt das methylierte MSP Produkt bei *PTEN*.

Die abgebildete MSPs der untersuchten Proben (a-d) des malignen Melanoms (MM 45) von *RASSF1A* zeigen nur unmethylierte Produkte bei 105 bp in den rechten Spuren (U). Ebenfalls keine methylierten Produkte zeigt die Abbildung 3-3 für das Tumorsuppressorgen *CDKN2A*. Im Gegensatz dazu wurden in allen gezeigten Proben (a-c; a und b) der Tumore MM 161 und MM 135 für das Tumorsuppressorgen *PTEN* methylierte Produkte detektiert. Dabei wurden die methylierten Produkte durch Sterne (*) markiert, um sie von Nebenprodukten unterscheiden zu können. Nebenprodukte sind nicht entstanden. Die methylierten Kontrollen (methyl.) zeigen in der linken Spur (M) je ein methyliertes Produkt und die unmethylierten Kontrollen (unmethyl.) zeigen in der rechten Spur (U) je ein unmethyliertes Produkt. Bei der methylierten Kontrolle von *CDKN2A* ist in der methylierten Spur (M) ein unmethyliertes Produkt zuerkennen, welches durch eine unvollständige *in vitro* Methylierung entstanden ist.

Insgesamt liegt der untersuchte Bereich der Promotorregion von *RASSF1A* in 12% der untersuchten Proben methyliert vor. 22% der Proben weisen eine Methylierung in *CDKN2A* auf und insgesamt 60% der Proben sind in *PTEN* methyliert. Die einzelnen Prozentwerte sind mit den Daten der anderen neuroendokrinen Tumoren in der Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Die Methylierungsdaten der malignen Melanome wurden mit den Ergebnissen der Vergleichskontroll-Gewebe statistisch gegenübergestellt und die Signifikanz berechnet (Tab. 3-2).

3.1.3 Hypermethylierung von *RASSF1A* im Merkelzellkarzinom

Für die Methylierungsanalysen im Merkelzellkarzinom (MCC) standen insgesamt 108 Proben von 98 Tumoren zur Verfügung. Dabei lagen für einige Tumore mehrere Proben vor. Es wurden alle Proben eines Tumors auf den Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73* analysiert. Konnte in einer Probe eines Tumors eine Methylierung detektiert werden, wurde dieser Tumor im Folgenden für dieses Gen als methyliert betrachtet.

Für die Untersuchung des Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgenen (*RASSF1A*, *CDKN2A*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73*) im Merkelzellkarzinom wurden für *RASSF1A* 83, für *CDKN2A* 41, für *PTEN* 37, für *FHIT* 20, für *PTPRG* 26, und für *TP73* 30 Merkelzellkarzinome analysiert. Für die Analyse wurde für *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN* und *FHIT* das Prinzip der MSP und für *PTPRG* und *TP73* das Prinzip der COBRA angewendet. Exemplarisch werden die Ergebnisse der MSPs von sieben MCCs für *RASSF1A* und von fünf MCCs für *PTEN* in Abbildung 3-4 dargestellt.

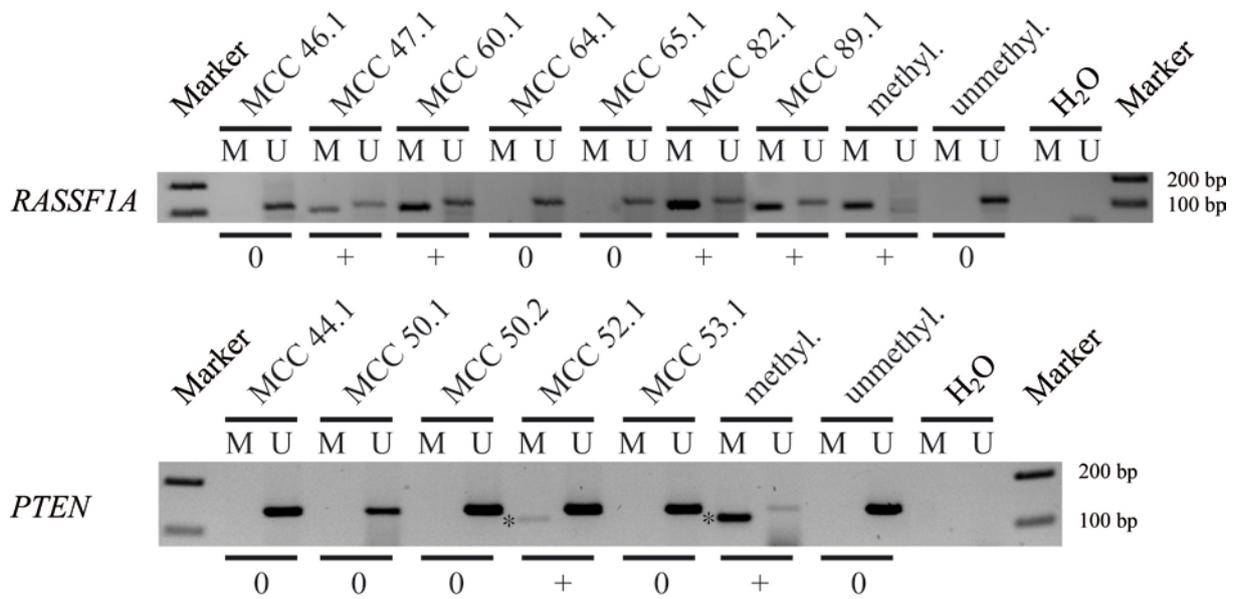


Abbildung 3-4: Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* im Merkelzellkarzinom. Aus Merkelzellkarzinom (MCC) isolierte DNA wurde nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A* 105 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet; *: zeigt das methylierte MSP Produkt bei *PTEN*.

Die dargestellten Merkelzellkarzinome zeigen für *RASSF1A* in den Tumoren MCC 47.1, MCC 60.1, MCC 82.1 und MCC 89.1 methylierte Produkte (93 bp) (Abb. 3-4). Die Merkelzellkarzinome MCC 46.1, MCC 64.1 und MCC 65.1 zeigen ausschließlich unmethylierte Produkte (105 bp) (Abb. 3-4).

Auch für *PTEN* konnten methylierte Produkte detektiert werden. So zeigt beispielsweise der Tumor 52.1 eine schwache Bande (117 bp) in der mit M gekennzeichneten Spur. Die methylierte Bande ist durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Die Merkelzellkarzinome MCC 44.1, MCC 50.1, MCC 50.2 und MCC 53.1 zeigen unmethylierte Produkte. Die methylierten Kontrolle (methyl.) zeigen methylierte und die unmethylierten Kontrollen (unmethyl.) unmethylierte Produkte. Bei der methylierten Kontrolle von *PTEN* ist in der unmethylierten Spur ein Produkt zu erkennen, was wiederum auf eine unvollständige *in vitro* Methylierung zurückzuführen ist.

Insgesamt liegt der untersuchte Bereich der Promotorregion von *RASSF1A* in 51% der untersuchten Proben methyliert vor. 22% der Proben weisen eine Methylierung in *CDKN2A* auf und ca. 5% der Proben sind in *PTEN* und *PTPRG* methyliert. Die Promotorregion von *FHIT* und *TP73* weist in keiner Probe eine Methylierung auf. Die einzelnen Prozentwerte sind mit den Daten der anderen neuroendokrinen Tumoren in der Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Die Methylierungsdaten der Merkelzellkarzinome wurden mit den Ergebnissen der Vergleichskontroll-Gewebe statistisch verglichen und die Signifikanz berechnet (Tab. 3-2).

3.1.4 Hypermethylierung von *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* im kleinzelligen Lungenkarzinom

Für die Methylierungsanalysen im kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) standen insgesamt 18 Proben von 18 Tumoren zur Verfügung. Es wurden alle Proben auf den Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* analysiert (Tab. 6-5). Konnte dabei eine Methylierung detektiert werden, wurde dieser Tumor im Folgenden für dieses Gen als methyliert betrachtet.

Für die Analyse wurde das Prinzip der MSP angewendet. Exemplarisch werden die Ergebnisse der MSPs von acht SCLCs für *RASSF1A*, acht SCLCs für *CDKN2A* und für vier SCLCs für *PTEN* in Abbildung 3-5 dargestellt.

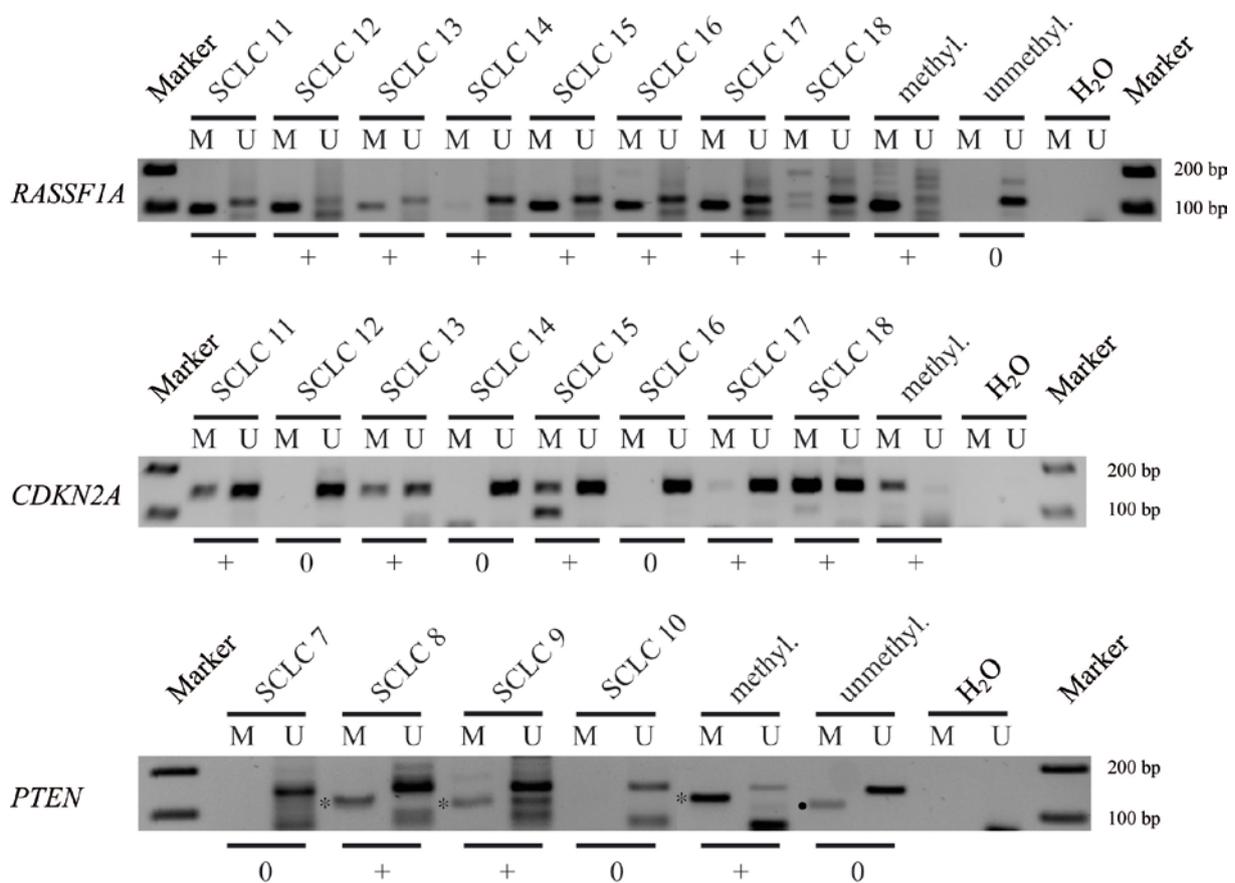


Abbildung 3-5: Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* im kleinzelligen Lungenkarzinom. Aus kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) isolierte DNA wurde nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *CDKN2A*: 150 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A*: 105 bp; *CDKN2A*: 151 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet; *: zeigt das methylierte MSP Produkt bei *PTEN*; •: zeigt ein Nebenprodukt bei *PTEN*.

Für das Tumorsuppressorgen *RASSF1A* konnte in jedem dargestellten Tumor (SCLC: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 und 18) ein methyliertes Produkt (93 bp) detektiert werden.

Für *CDKN2A* konnte in den Tumoren SCLC 11, SCLC 13, SCLC 15, SCLC 17 und SCLC 18 eine Methylierung im untersuchten Bereich nachgewiesen werden. Der Tumor 17 weist ein schwaches Produkt auf und wurde in dieser Arbeit als methyliert eingestuft.

Bei dem Tumorsuppressorgen *PTEN* zeigen die mit M gekennzeichneten Spuren, dass in den Tumoren SCLC 8 und SCLC 9 methylierte Produkte detektiert wurden. Bei den Tumoren SCLC7 und SCLC 10 wurden unmethylierte Produkte nachgewiesen (Abb. 3-5). Die methylierten Produkte sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet, um sie von Nebenprodukten unterscheiden zu können. Die unmethylierte Kontrolle (unmethy.) weist in der linken Spur (M) ein Nebenprodukt auf, das durch einen Punkt (•) markiert ist.

Insgesamt weisen 94% der untersuchten Proben eine Hypermethylierung der Promotorregion von *RASSF1A* auf. Das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* ist in 56% und *PTEN* in 35% der untersuchten Proben methyliert. Die einzelnen Prozentwerte sind mit den Daten der anderen neuroendokrinen Tumoren in der Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Die Methylierungsdaten der kleinzelligen Lungenkarzinome wurden mit den Ergebnissen der Vergleichskontroll-Gewebe statistisch verglichen und die Signifikanz berechnet (Tab. 3-2).

3.1.5 Zusammenfassung der Methylierungsdaten

In der Tabelle 3-2 werden die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der untersuchten Tumorsuppressorgene (*RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73*) in allen neuroendokrinen Tumoren (malignes Melanom, Merkelzellkarzinom und kleinzelliges Lungenkarzinom) und in den untersuchten Vergleichskontroll-Geweben (NZN-Gewebe und Blut) sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse von Zusammenhängen zwischen einem methylierten Tumorsuppressorgen und der Tumorentität tabellarisch dargestellt.

Dabei ist der prozentuale Anteil der methylierten Tumore angegeben. Zum besseren Verständnis der Daten wurde zusätzlich das Verhältnis der Anzahl von methylierten Tumoren zu der Gesamtanzahl der untersuchten Tumore dargestellt.

Weiter sind die *p*-Werte des exakten zweiseitigen Tests nach *Fisher* angegeben (Tab. 3-2). Der erste Wert entspricht dem *p*-Wert, wenn NZN-Gewebe als Vergleichskontroll-Gewebe verwendet und mit den Tumoren verglichen wird, der zweite wenn Blutproben als Vergleichskontroll-Gewebe verwendet werden. Der *p*-Wert in eckigen Klammern ist das Ergebnis des Signifikanztests, wenn NZN-Gewebe und Blutproben zusammengefasst als ein Vergleichskontroll-Gewebe behandelt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse tabellarisch (Tab. 3-2) aufgeführt und anschließend erläutert.

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der Methylierungsdaten der untersuchten Tumorsuppressorgene und der Irrtumswahrscheinlichkeiten (p -Werte) des Zusammenhangs zwischen den Methylierungsdaten in den jeweiligen neuroendokrinen Tumoren

Tumor-suppressorgene	Methylierungsstatus							
	malignes Melanom (MM)	Signifikanz [†] MM vs. NZN/Blut [NZN + Blut]	Merkelzellkarzinom (MCC)	Signifikanz [†] MCC vs. NZN/Blut [NZN + Blut]	kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC)	Signifikanz [†] SCLC vs. NZN/Blut [NZN + Blut]	Nävuszellnävus (NZN)	Blut
<i>RASSF1A</i>	12% (25/217)	0,228 / 0,141 [0,033*]	51% (42/83)	<0,001*** / <0,001*** [<0,001***]	94% (17/18)	<0,001*** / <0,001*** [<0,001***]	0% (0/17)	0% (0/21)
<i>CDKN2A</i>	22% (46/213)	1,000 / 0,792 [0,676]	22% (9/41)	1,000 / 0,755 [0,782]	56% (10/18)	0,039* / 0,019* [0,006**]	19% (3/16)	17% (4/23)
<i>PTEN</i>	60% (120/200)	0,005** / < 0,001*** [< 0,001***]	5% (2/37)	0,488 / 0,519 [1,000]	35% (6/17)	0,357 / 0,003** [0,005**]	11% (1/9)	0% (0/23)
<i>FHIT</i>	na	na	0% (0/20)	0,088 / 0,109 [0,083]	na	na	18% (3/17)	18% (4/22)
<i>PTPRG</i>	na	na	4% (1/26)	1,000 / 1,000 [0,441]	na	na	0% (0/10)	0% (0/23)
<i>TP73</i>	na	na	0% (0/30)	kSm	na	na	0% (0/10)	0% (0/23)

Der Inhalt der Klammern () zeigt das Verhältnis der Anzahl von methylierten Tumoren zu der Gesamtanzahl der untersuchten Tumore. Die jeweils zweite Spalte (grau hinterlegt) zeigt die p -Werte der jeweiligen neuroendokrinen Tumore (NET) im Vergleich zu dem NZN-Gewebe / Blutproben. Der p -Wert in Klammern [] bezieht beide Vergleichskontroll-Gewebe ein. †: exakter Test nach Fisher (zweiseitig); *: $p \leq 0,05$ signifikant; **: $p \leq 0,01$ hoch signifikant; ***: $p \leq 0,001$ höchst signifikant; na: nicht analysiert; kSm: kein Signifikanztest möglich, da mindestens eine Variable als Konstante vorlag.

Im kleinzelligen Lungenkarzinom wird eine hohe höchst signifikante Hypermethylierung von *RASSF1A* mit 94% [$p < 0,001$] und im Merkelzellkarzinom mit 51% [$p < 0,001$] im Vergleich zum zusammengefassten Vergleichskontroll-Gewebe deutlich. Im malignen Melanom wurde ein Methylierungsgrad von 12% [$p = 0,033$] nachgewiesen. Im Gegensatz hierzu wurde in beiden Vergleichskontroll-Geweben keine Methylierung detektiert.

Weiterhin findet sich im Vergleich zu dem Untersuchten NZN-Gewebe und den Blutproben eine hoch signifikante Hypermethylierung der Promotorregion von *CDKN2A* im kleinzelligen Lungenkarzinom mit 56% [$p = 0,006$]. Die Methylierungsgrade von *CDKN2A* weisen mit je 22% im malignen Melanom und Merkelzellkarzinom und mit 19% im NZN-Gewebe sowie 17% in den Blutproben ähnlich hohe Werte auf. Daher wurde im Vergleich zum zusammengefassten NZN-Gewebe und den Blutproben weder zwischen einer Methylierung von *CDKN2A* und dem malignen Melanom noch zwischen einer Methylierung von *CDKN2A* und dem Merkelzellkarzinom ein signifikanter Zusammenhang festgestellt.

PTEN weist im malignen Melanom mit einer detektierten Hypermethylierung von 60% seinen höchsten Wert in den untersuchten Tumoren auf. Im Vergleich zum Vergleichskontroll-Gewebe ist diese Hypermethylierung mit $p < 0,001$ höchst signifikant, gefolgt von einer 35%igen [$p = 0,005$] hoch signifikanten Hypermethylierung im kleinzelligen Lungenkarzinom. Das Merkelzellkarzinom zeigt einen Methylierungsgrad von 5% und liegt mit diesem Wert unter dem des NZN-Gewebes mit 11% und ist damit nicht signifikant. Die untersuchten Blutproben weisen keine Methylierungen in *PTEN* auf.

Die Tumorsuppressorgene *FHIT*, *PTPRG* und *TP73* wurden nur im Merkelzellkarzinom einer Methylierungsanalyse unterzogen. *FHIT* und *TP73* weisen keine Methylierungen auf. Die untersuchten Vergleichskontroll-Gewebe (NZN und Blut) zeigen für *FHIT* mit jeweils 18% einen höheren Wert als die entarteten Gewebeproben des Merkelzellkarzinoms. Dementsprechend kann zwischen einer Methylierung von *FHIT* im Merkelzellkarzinom im Vergleich zum NZN-Gewebe und Blut mit $p = 0,08$ kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Für *TP73* wurde weder in den Merkelzellkarzinomen noch in den Vergleichskontroll-Geweben eine Methylierung detektiert. *PTPRG* weist zu 4% eine Methylierung in der Promotorregion auf und ist im Vergleich zum Vergleichskontroll-Gewebe (0%) nicht signifikant methyliert [$p = 0,441$].

3.2 Statistische Auswertung der klinisch-pathologischen Charakteristika und Mutationsanalysen im malignen Melanom

Dieser Teil der Arbeit stellt die Ergebnisse der in Material und Methoden erwähnten klinisch-pathologischen Charakteristika und Mutationsanalysen von *BRAF* und *NRAS* (Tab. 6-2) dar.

Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Dermatologen evaluiert bzw. wurden im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit gewonnen (Lahtz *et al.*, 2010).

Diese Daten bilden die Grundlage statistischer Analysen, um die Ergebnisse der Methylierungsanalysen (2.2.7.2) in einem umfassenderen Rahmen einordnen zu können. Hierfür wurden bivariate Korrelationsanalysen nach *Spearman*, Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier sowie uni- und multivariate Cox Regressionsanalysen der Daten miteinander sowie übergreifend durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der statistischen Analysen dieser Daten präsentiert.

3.2.1 Korrelationsanalysen der Mutationsdaten von *BRAF* / *NRAS* und den Methylierungsbefunden mit den klinisch-pathologischen Daten im malignen Melanom

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Korrelationsanalysen der klinisch-pathologischen Daten dargestellt. Dabei werden die klinisch-pathologischen und die Mutationsdaten sowohl untereinander als auch übergreifend mit den Methylierungsdaten auf Zusammenhänge untersucht.

Die wichtigsten Befunde waren hier eine positive Korrelation zwischen einer Hypermethylierung des Tumorsuppressorgens *PTEN* und dem Grad der basophilen Degeneration ($p = 0,011$) und der TANS (*thorax, upper arm, neck, scalp*) Lokalisierung ($p = 0,043$) des Tumors.

Weiter wurde eine starke Korrelation zwischen der Tumordicke und Ulzeration ($p < 0,001$) und dem Mitoseindex ($p < 0,001$) gefunden. Des Weiteren wurde eine starke Korrelation zwischen Ulzeration und Mitoseindex ($p < 0,001$) sowie zwischen Ulzeration und Tumortyp (positive Korrelation mit nodulärem malignen Melanom (NMM) $p < 0,001$; negative Korrelation mit oberflächlich spreitendem Melanom (SSM) $p = 0,004$) festgestellt. Zudem wurde eine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Tumordicke ($p < 0,001$) und dem Tumortyp (positive Korrelation mit dem Lentigo-maligna-Melanom (LMM) $p = 0,006$ und mit dem akrolentiginösem Melanom (ALM) $p = 0,003$; negative Korrelation mit dem oberflächlich spreitendem Melanom (SSM) $p < 0,001$) ermittelt. Darüber hinaus existiert eine negative Korrelation zwischen dem Alter und einer NZN-Assoziation der

Melanome ($p = 0,001$) und dem Grad der Infiltration ($p = 0,004$). Es wurde eine erhöhte TANS Lokalisierung bei Männern gefunden ($p < 0,001$) und mit dem oberflächlich spreitenden Melanom (SSM) ($p < 0,001$). Hingegen existiert eine negative Korrelation von TANS mit der Tumordicke ($p < 0,03$) und Alter ($p < 0,015$).

Weiterhin wurden 221 maligne Melanome mit Hilfe der SSCP Analyse (*single stand conformation polymorphism analysis*) auf die Mutationen GT>AA und T>A im Codon 600 von *BRAF* und auf die Mutation A>T im Codon 61 von *NRAS* analysiert und anschließend sequenziert (Lahtz *et al.*, 2010). Die Häufigkeiten der gefundenen Mutationen sind in Tab. 6-2 dargestellt. Insgesamt wurde in 67% der untersuchten Melanome eine *BRAF* Mutation detektiert. Dabei wurde die Mutation GT>AA mit 22% seltener gefunden als T>A 52%. Es zeigen nur 7% der Tumore beide Mutationen, somit schließen sich diese beiden Mutationen gegenseitig aus ($p = 0,001$). Weiterhin wurde in 2% der Tumore eine *NRAS* Mutation festgestellt. Diese zeigt eine negative Korrelation mit der *BRAF* T>A Mutation ($p = 0,037$). Ulzerierte Melanome haben im Vergleich zu den nicht ulzerierten Melanomen einen signifikanten höheren Anteil an *BRAF* Mutationen ($p = 0,006$). Weiterhin wurde zwischen der basophilen Degeneration und einer Mutation in *BRAF* eine negative Korrelation festgestellt. Sie schließen sich gegenseitig aus ($p = 0,004$).

3.2.2 Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier im malignen Melanom

In dieser Arbeit wurden Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob verschiedene genetische und klinisch-pathologische Charakteristika der 230 untersuchten malignen Melanome Auswirkungen auf die Überlebenszeit der Patienten haben. Es wurden unter anderem Überlebenszeitanalysen in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von *PTEN*, der basophilen Degeneration, der akralen Lokalisierung und dem Geschlecht, Alter, Tumordurchmesser, Mitoseindex, Tumordicke, Ulzeration und Tumortyp durchgeführt. Im Folgenden sind ausgewählte Kaplan-Meier-Kurven dargestellt (Abb. 3-6). Die übrigen signifikanten Überlebenszeitanalysen befinden sich tabellarisch im Anhang. (Tab. 6-8)

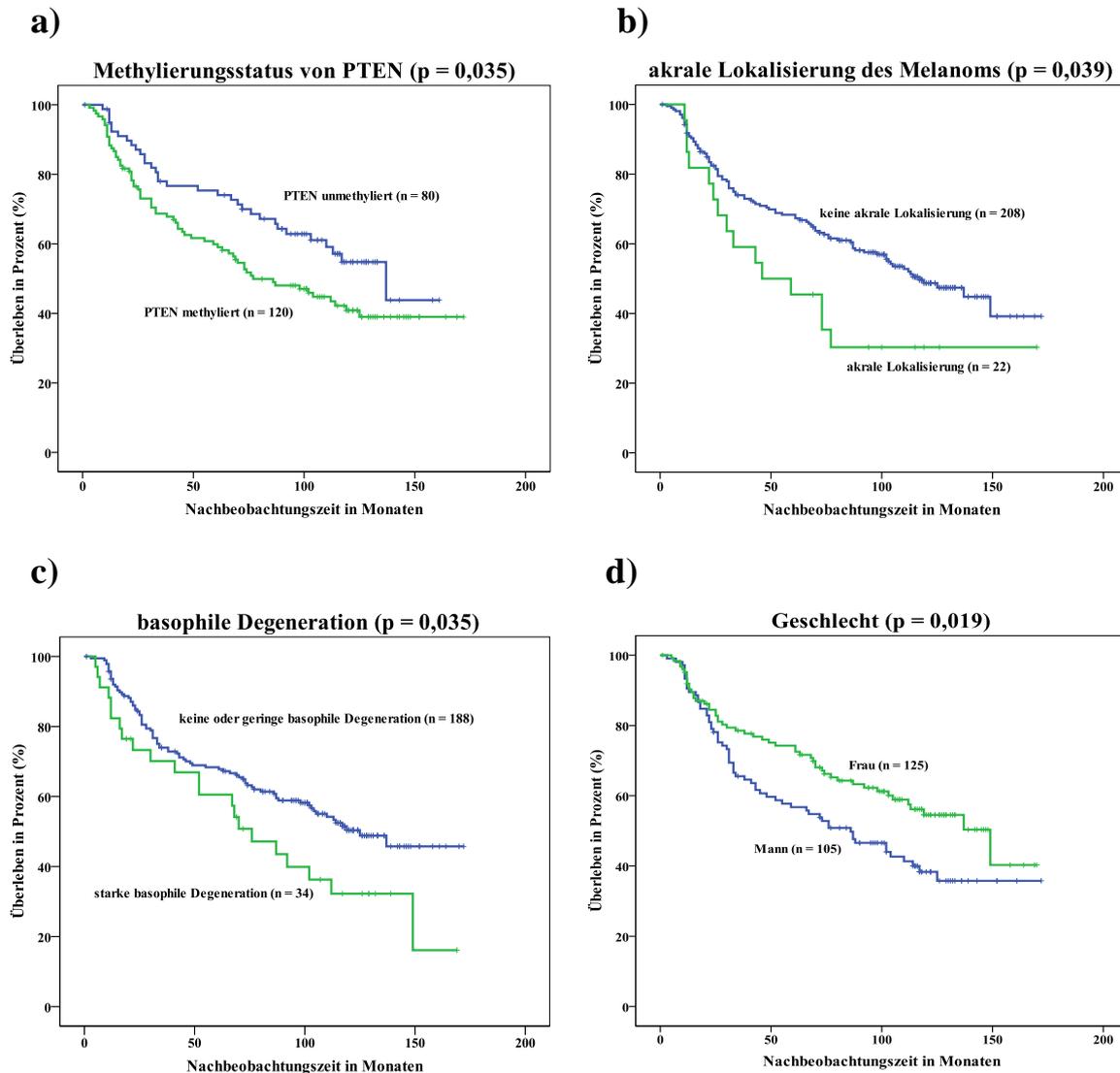


Abbildung 3-6: Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier von Patienten mit einem malignen Melanom. **a)** zeigt die Kaplan-Meier Kurve für den Methylierungsstatus von *PTEN* (*PTEN* unmethyliert (blau), *PTEN* methyliert (grün), $p = 0,035$); **b)** zeigt die Kaplan-Meier Kurve für die akrale Lokalisierung des Tumors (keine akrale Lokalisierung (blau), akrale Lokalisierung (grün), $p = 0,039$). **c)** zeigt die Kaplan-Meier Kurve für die basophile Degeneration (keine oder geringe basophile Degeneration (blau), starke basophile Degeneration (grün), $p = 0,035$). **d)** zeigt die Kaplan-Meier Kurve für das Geschlecht Frau (grün), Mann (blau), $p = 0,019$). Der p -Wert des *Log Rank/Mantel-Cox* Tests ist in jeder Kaplan-Meier Kurve angegeben; n: Anzahl der Tumore in jeder Gruppe; + (innerhalb der Kaplan-Meier Kurve): zensierter Fall.

In den Kurven in Abbildung 3-6 wird dargestellt, wie sich verschiedene histologische und genetische Eigenschaften auf das Überleben der Patienten auswirken. So ist deutlich zu erkennen, dass eine Methylierung der untersuchten Promotorregion des Tumorsuppressorgens *PTEN* mit einer erhöhten Sterblichkeit korreliert ($p = 0,035$; Abb. 3-6 a). Beispielsweise leben nach ca. 125 Monaten noch ca. 55% der Patienten, die an einem Tumor mit einer unmethylierten *PTEN* Promotorregion (blaue Kurve) erkrankt waren, wohingegen nur 40% der Patienten mit einem in *PTEN* methylierten Tumor (grüne Kurve) den gleichen Beobachtungszeitraum überlebt haben. Auch die Lokalisierung des Tumors zeigt einen Einfluss auf die Überlebensrate der Patienten. Tritt das maligne Melanom an den Akren auf (grüne Kurve), ist das prozentuale Überleben im Gegensatz zu einer nicht akralen Lokalisierung (blaue

Kurve) signifikant erniedrigt ($p = 0,039$; Abb. 3-6 b). Ähnlich verhält es sich mit dem Merkmal der basophilen Degeneration. Hier ist eine erhöhte Sterblichkeitsrate bei starker basophiler Degeneration (grüne Kurve) zu erkennen ($p = 0,035$; Abb. 3-6 c). Das Geschlecht hatte ebenfalls Auswirkungen auf das Überleben bei einer Hautkrebskrankung. Männer (blaue Kurve) haben eine signifikant erhöhte Sterblichkeit als Frauen (grüne Kurve; $p = 0,019$; Abb. 3-6 d).

Des Weiteren wurden die Merkmale Alter, Tumordurchmesser, Mitoseindex, Tumordicke, Ulzeration, Tumortyp: SSM und NMM und Infiltration bei den Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier als signifikant bewertet. Bei den Kaplan-Meier Analysen für das Rezidiv-freie-Überleben wurde bei den Merkmalen Tumordurchmesser, Mitoseindex, Tumordicke, Ulzeration, Tumortyp SMM und NMM und Infiltration ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang festgestellt (Tab.6-8).

3.2.3 Cox Regressionsanalysen

Die Cox Regression ist eine andere Form der Überlebenszeitanalyse. Im Folgenden sind die signifikanten Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox Regression tabellarisch dargestellt (Tab. 3-3).

Tabelle 3-3: Univariate Cox Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens und des Rezidiv-freien-Überlebens (nur signifikante Daten gezeigt)

Überleben	odds ratio	95% KI	Probenumfang	p-Wert [†]
<i>PTEN</i> Methylierung	1,56	1,03 – 2,36	199	0,037*
basophile Degeneration	1,64	1,03 – 2,63	221	0,038*
akrale Lokalisierung	1,76	1,02 – 3,03	229	0,042*
Geschlecht (Mann)	1,55	1,07 – 2,24	229	0,020*
Alter	2,24	1,53 – 3,28	229	< 0,001***
Tumordurchmesser	2,88	1,94 – 4,27	217	< 0,001***
Mitoseindex	1,95	1,31 – 2,91	208	0,001***
Tumordicke	3,19	2,14 – 4,75	225	< 0,001***
Ulzeration	2,01	1,38 – 2,94	226	< 0,001***
Tumortyp SSM	0,48	0,33 – 0,70	229	< 0,001***
Tumortyp NMM	2,17	1,42 – 3,33	209	< 0,001***
Infiltration	0,52	0,32 – 0,85	227	0,009**

Rezidiv-freies-Überleben	odds ratio	95% KI	Probenumfang	p-Wert[†]
Geschlecht (Mann)	1,54	1,00 – 2,36	230	0,048*
Tumordurchmesser	2,24	1,42 – 3,52	218	0,001***
Mitoseindex	1,93	1,23 – 3,02	209	0,004**
Tumordicke	5,62	3,33 – 9,50	226	< 0,001***
Ulzeration	3,33	2,07 – 5,34	227	< 0,001***
Tumortyp SSM	0,47	0,30 – 0,71	230	< 0,001***
Tumortyp NMM	2,91	1,83 – 4,62	230	< 0,001***
Infiltration	0,36	0,18 – 0,69	228	0,002**

KI: Konfidenzintervall (95%); [†]: Log Rank/Likelihood Ratio Test; *: $p \leq 0,05$ signifikant; **: $p \leq 0,01$ hoch signifikant; ***: $p \leq 0,001$ höchst signifikant.

Die signifikanten Ergebnisse der Kaplan-Meier Überlebenszeitanalysen wurden mit Hilfe der univariaten Cox Regression für die klinisch-pathologischen Merkmale der basophilen Degeneration, der akralen Tumor Lokalisierung, des Geschlechts, des Alters, des Tumordurchmessers, des Mitoseindex, Tumordicke, Ulzeration, dem Tumortyp SSM und dem Tumortyp NMM sowie der Infiltration bestätigt (Tab. 3-3). Darüber hinaus wurde der höchst interessante signifikante Zusammenhang einer Hypermethylierung des Tumorsuppressorgens *PTEN* mit der Überlebenswahrscheinlichkeit verifiziert.

Ebenso wurden die Kaplan-Meier Analysen für das Rezidiv-freie-Überleben mit Hilfe dieser Methode für die klinisch-pathologischen Merkmale des Geschlechts, des Alters, des Tumordurchmessers, des Mitoseindex, Tumordicke, Ulzeration, dem Tumortyp SSM und dem Tumortyp NMM sowie der Infiltration bestätigt (Tab. 3-3). Es konnte kein signifikanter Zusammenhang einer Hypermethylierung von *PTEN* auf das Rezidiv-freie-Überleben festgestellt werden.

Im Folgenden werden diese Merkmale mit Hilfe der multivariaten Cox Regression überprüft, ob es sich um ein unabhängiges Merkmal handelt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der unten aufgeführten Tabelle (Tab. 3-4) dargestellt.

Tabelle 3-4: Multivariate Cox Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens und Rezidiv freien Zeit (nur signifikante Daten gezeigt)

Überleben	<i>odds ratio</i>	95% KI	Probenumfang	<i>p-Wert</i> [†]
<i>PTEN</i> Methylierung	1,75	1,12 – 2,73	176	0,014*
Alter	1,54	1,00 – 2,39		0,052
Tumordurchmesser	2,54	1,56 – 4,13		< 0,001***
Mitoseindex	1,68	1,08 – 2,60		0,020*
Tumordicke	2,01	1,22 – 3,29		0,006**
Rezidiv-freies-Überleben	<i>odds ratio</i>	95% KI	Probenumfang	<i>p-Wert</i> [†]
Tumordicke	4,29	2,43 – 7,58	223	< 0,001***
Ulzeration	1,84	1,09 – 3,09		0,023*

KI: Konfidenzintervall (95%); [†]: *Log Rank/Likelihood Ratio* Test; *: $p \leq 0,05$ signifikant; **: $p \leq 0,01$ hoch signifikant; ***: $p \leq 0,001$ höchst signifikant.

Die in Tabelle 3-4 aufgeführten Merkmale beeinflussen die Überlebenszeit bzw. das Auftreten eines Rezidivs unabhängig voneinander. Zusätzlich kann eine Aussage getroffen werden, wie stark das Auftreten des jeweiligen Merkmals das Überleben oder Auftreten eines Rezidivs beeinflusst. So ist die Wahrscheinlichkeit zu sterben bei Patienten, die an einem Tumor mit einem methylierten *PTEN* Promotor erkrankten, im Vergleich zu Patienten mit einem unmethylierten Tumor um 75% erhöht ($p = 0,014$). Ist ein Patient zum Zeitpunkt der Resektion älter als 61,9 Jahre, ist die Sterblichkeit um 54% erhöht ($p = 0,052$). Ein Tumordurchmesser von mehr als 17 mm erhöht die Wahrscheinlichkeit um 154% ($p < 0,001$). Auch ein Mitoseindex von mehr als 0,4/HPF führt zu einer um 68% gesteigerten Sterblichkeit ($p = 0,02$). Eine um 101% erhöhte Wahrscheinlichkeit früher zu sterben, haben Patienten mit einer Tumordicke von mehr als 1,89 mm im Vergleich zu Patienten mit dünneren Tumoren ($p = 0,006$).

Die Tumordicke und die Ulzeration beeinflussen zudem das Auftreten eines Rezidivs nach erfolgreicher Resektion des Tumors. War der entfernte Tumor dicker als >1,89 mm, ist die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs um 329% im Vergleich zu Patienten mit dünneren Tumoren erhöht ($p < 0,001$). War der Tumor ulzeriert, ist die Gefahr eines Rezidivs um 84% erhöht ($p = 0,023$).

Diese Merkmale sind somit als Prognose Faktoren geeignet, besonders interessant ist die Hypermethylierung von *PTEN* als unabhängiger Prognose Faktor.

3.3 Analysen auf eine virale Präsenz von Polyomaviren in neuroendokrinen Tumoren

Feng *et al.* hat gezeigt, dass das Polyomavirus MCPyV in über 90% aller Merkelzellkarzinome detektiert werden kann (Feng *et al.*, 2008). Von SV40 ist bekannt, dass es in der Lage ist den Promotor von *RASSF1A* in humanen mesothelialen Zellen *in vitro* zu methylieren (Toyooka *et al.*, 2001a). Jedoch ist nicht sicher nachgewiesen, dass SV40 direkt an der Krebsentstehung beteiligt ist (Shah, 2007).

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war die Untersuchung der viralen Präsenz der Polyomaviren SV40 und MCPyV in den drei neuroendokrinen Tumorentitäten des malignen Melanoms, des Merkelzellkarzinoms und des kleinzelligen Lungenkarzinoms, um zu untersuchen, ob die in 3.1.5 detektierten Hypermethylierungen im Zusammenhang mit einer viralen Präsenz der beiden Polyomaviren stehen. Die untersuchten Tumore wurden mit der viralen Präsenz von Vergleichskontroll-Gewebeprobe statistisch verglichen. Sowohl die Tumore als auch die Vergleichskontroll-Gewebe entsprachen den gleichen Proben wie unter 3.1 beschrieben.

Im Folgenden sind zunächst die Virusanalysen der Vergleichskontroll-Gewebe aufgeführt, gefolgt von den Ergebnissen der Tumorentitäten.

3.3.1 Virale Präsenz von Polyomaviren in Kontrollgewebe

Für die Virusanalyse von Polyomaviren in den Nävuszellnävus-Gewebeprobe standen insgesamt 18 und in den Blutproben 26 Proben zur Verfügung (Tab. 6-6, 6-7). Es wurden alle Proben auf die virale Präsenz des jeweiligen Polyomavirus analysiert (Tab.6-6, 6-7), indem eine PCR durchgeführt (2.2.7.5) und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Konnte dabei eine virale Präsenz detektiert werden, wurde diese Gewebeprobe im Folgenden für den betreffenden Polyomavirus als positiv betrachtet. Als Positiv-Kontrolle wurden beim Merkelzellpolyomavirus, im Rahmen der Methodenoptimierung als positiv bewertete Merkelzellkarzinome, verwendet. Bei den Untersuchungen auf die Präsenz des *Simian virus 40* wurde der Vektor pTD1-1 (Clontech-Takara Bio Europe) als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Dieser Vektor enthält das SV40 *large T antigene* (Abb. 6-4).

3.3.1.1 Virusanalyse von Polymaviren in Nävuszellnävus-Gewebe

Für die Untersuchung der viralen Präsenz des Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) und des *Simian virus 40* (SV40) in Nävuszellnävus-Gewebeproben (NZN) wurden für MCPyV 18 und für SV40 13 NZN-Gewebeproben analysiert (Tab. 6-6). Exemplarisch werden die Ergebnisse der Virusanalysen von MCPyV und SV40 von zehn Nävuszellnävus-Gewebeproben und den entsprechenden genomischen *GAPDH* Kontrollen in Abbildung 3-7 dargestellt.

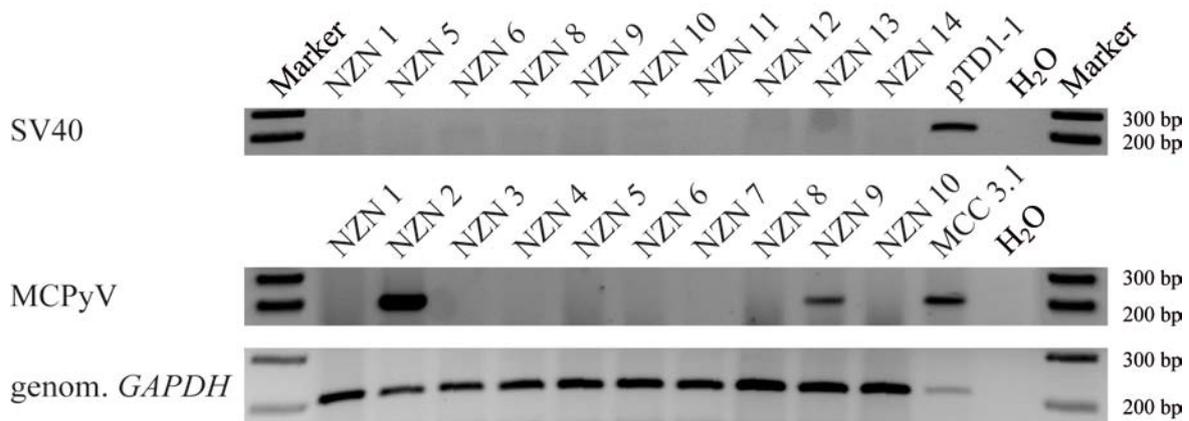


Abbildung 3-7: Virusanalyse der Polyomaviren MCPyV und SV40 sowie die genomische *GAPDH* PCR in Nävuszellnävus-Gewebeproben. Aus Nävuszellnävus-Gewebeproben (NZN) wurde DNA isoliert und mit spez. Primern amplifiziert. Der Expressionsvektor pTD1-1 dient für SV40 (191 bp) und MCC 3.1 für MCPyV (195 bp) als Positiv-Kontrolle (+), die genomische *GAPDH* PCR (204 bp) dient als DNA-Kontrolle und das Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die abgebildete Virusanalyse des Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) im Nävuszellnävus-Gewebe zeigt ein Produkt im NZN-Gewebe 1 und 9. In der Virusanalyse von SV40 konnten keine Produkte detektiert werden. Nur die Positiv-Kontrolle (pTD1-1) zeigt hier ein Produkt bei ca. 220 bp. Dieses Produkt entspricht nicht der vorhergesagten Größe durch die verwendeten Primer (191 bp), dies ist bedingt durch das Herstellungsverfahren der Positiv-Kontrolle. Die Positiv-Kontrolle enthält daher zusätzliche Basenpaare. Die *GAPDH* PCR weist in jedem der dargestellten NZN-Proben ein PCR Produkt auf. Dies zeigt, dass in jeder NZN-Probe genomische DNA vorhanden war.

Insgesamt sind drei von 18 (17%) untersuchten NZN-Gewebeproben MCPyV und keine Probe für SV40 positiv (Tab. 3-5).

3.3.1.2 Virusanalyse von Polyomaviren in Blut

Für die Untersuchung der viralen Präsenz des Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) und des *Simian virus 40* (SV40) in Blutproben wurden für MCPyV und SV40 je 26 Blutproben analysiert (Tab. 6-7). Exemplarisch werden die Ergebnisse der Virusanalysen von MCPyV und SV40 von zehn Blutproben und den entsprechenden genomischen *GAPDH* Kontrollen in Abbildung 3-8 dargestellt.

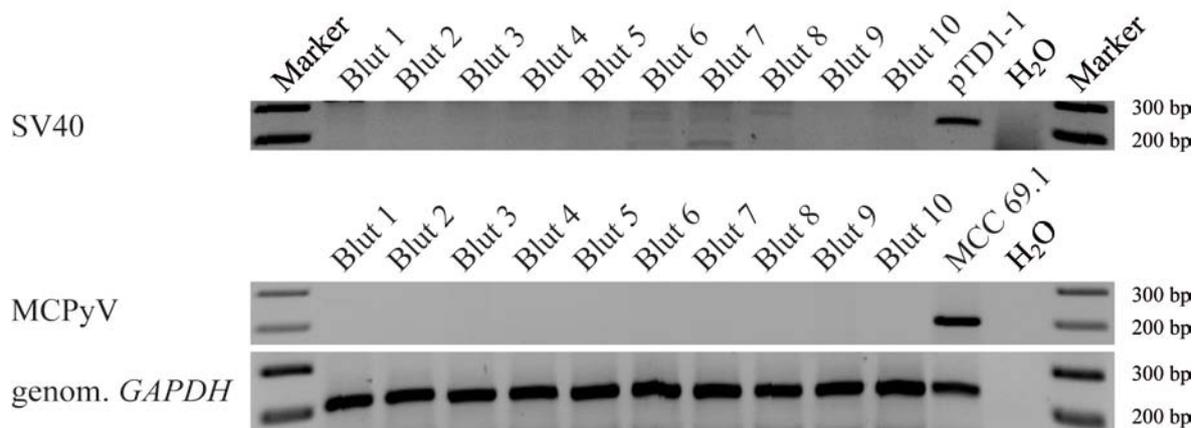


Abbildung 3-8: Virusanalyse des Polyomavirus MCPyV und SV40 sowie die genomische *GAPDH* PCR in Blutproben. Aus Blutproben wurde DNA isoliert und mit spez. Primern amplifiziert. Der Expressionsvektor pTD1-1 dient für SV40 (191 bp) und MCC 69.1 für MCPyV (195 bp) als Positiv-Kontrolle (+), die genomische *GAPDH* PCR (204 bp) dient als DNA-Kontrolle und das Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die abgebildeten Virusanalysen zeigen in den dargestellten Blutproben weder für MCPyV noch für SV40 ein Produkt für eine virale Präsenz (Abb. 3-8). Eine DNA-Kontrolle über eine *GAPDH* PCR zeigt, dass in jeder Probe genomische DNA vorhanden war und weist somit darauf hin, zeigt dass die fehlenden Produkte der Virusanalysen nicht durch das Fehlen von genomischer DNA resultiert. Insgesamt ist eine von 26 (4%) untersuchten Blutproben MCPyV und keine Probe für SV40 positiv (Tab. 3-5).

Tabelle 3-5: Daten der viralen Präsenz der untersuchten Polyomaviren im Nävuszellnävus- und Blut-Vergleichskontroll-Gewebe.

Polyomaviren	Virale Präsenz im NZN-Vergleichs- kontroll-Gewebe in %	Virale Präsenz im Blut- Vergleichskontroll- Gewebe in %
MCPyV	17% (3/18)	4% (1/26)
SV40	0% (0/13)	0% (0/26)

Der Inhalt der Klammern zeigt das Verhältnis der Anzahl der infizierten Tumore zu der Gesamtanzahl der untersuchten Tumore. (Dabei entspricht die erste Zahl der Menge der infizierten Tumore und die zweite Zahl der Gesamtmenge der untersuchten Tumore)

Zusammenfassend ist der Polyomavirus SV40 weder in den NZN-Gewebe- noch in den Blutproben präsent (Tab. 3-5). Im NZN-Gewebe zeigen 17% der untersuchten Proben eine virale Präsenz von MCPyV und 4% in den Blutproben.

Diese Daten bilden das Ausgangsmaterial für vergleichende statistische Analysen (2.2.12) mit den im Folgenden dargestellten Ergebnissen der Virusanalysen der neuroendokrinen Tumore.

3.3.2 Präsenz des Merkelzellpolyomavirus im malignen Melanom

Für die Untersuchung der viralen Präsenz des (MCPyV) im malignen Melanom wurden 97 Tumore analysiert (Tab. 6-3). Es wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt. Konnte dabei eine virale Präsenz detektiert werden, wurde dieser Tumor im Folgenden für den Merkelzellpolyomavirus als positiv betrachtet. Als Positiv-Kontrolle wurden Merkelzellkarzinome verwendet. Exemplarisch werden die Ergebnisse der Virusanalysen von 14 malignen Melanomen und den entsprechenden genomischen *GAPDH* Kontrollen in Abbildung 3-9 dargestellt.

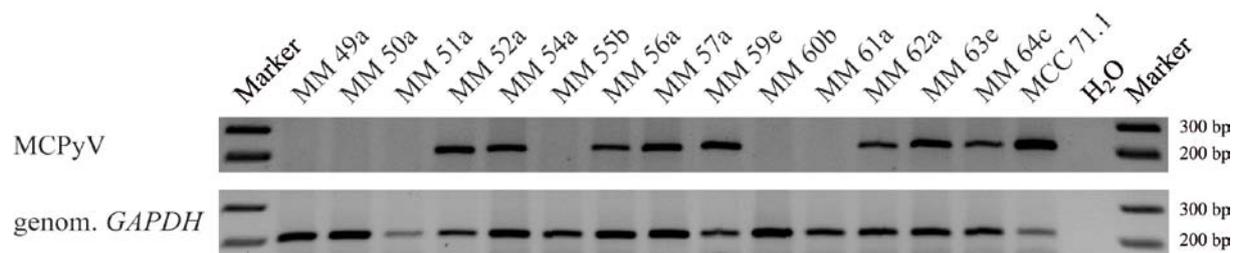


Abbildung 3-9: Virusanalyse des Polyomavirus MCPyV und genomische *GAPDH* PCR im malignen Melanom. Aus malignen Melanomen (MM) wurde DNA isoliert und mit spez. Primern amplifiziert. MCC 71.1 dient für MCPyV (195 bp) als Positiv-Kontrolle (+), die genomische *GAPDH* PCR (204 bp) dient als DNA-Kontrolle und das Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

In den 14 untersuchten malignen Melanomen zeigen die Tumore MM 52a, MM 54a, MM 56a, MM 57a, MM 59e, MM 62a, MM 63e und MM 64c ein deutliches Produkt in der Virusanalyse für MCPyV (Abb. 3-9). Die ebenfalls dargestellten Produkte der DNA-Kontrollen (genom. *GAPDH*) zeigen die Anwesenheit von intakter genomischer DNA in den untersuchten Proben.

Die virale Präsenz des untersuchten Polyomavirus MCPyV konnte in insgesamt 35% der 97 untersuchten malignen Melanome nachgewiesen werden. Dieser Wert sowie die statistischen Daten sind mit den Daten der anderen neuroendokrinen Tumore in der Tabelle 3-6 zusammengefasst.

3.3.3 Präsenz des Merkelzellpolyomavirus im Merkelzellkarzinom

Für die Untersuchung der viralen Präsenz des MCPyV und SV40 im Merkelzellkarzinom wurden für MCPyV 98 und für SV40 40 Merkelzellkarzinome analysiert (Tab. 6-4). Es wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positiv-Kontrolle wurden Merkelzellkarzinome verwendet. Bei den Untersuchungen auf die Präsenz des *Simian virus 40* wurde der Vektor pTD1-1 (Clontech-Takara Bio Europe) als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Dieser Vektor enthält das SV40 *large T antigene* (Abb. 6-2). Exemplarisch werden die Ergebnisse der Virusanalysen von MCPyV von 13 Merkelzellkarzinomen in Abbildung 3-10 dargestellt.

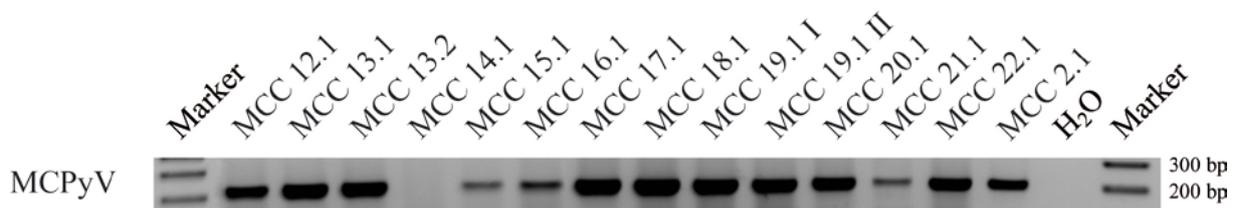


Abbildung 3-10: Virusanalyse der Polyomaviren MCPyV im Merkelzellkarzinom. Aus Merkelzellkarzinomen (MCC) wurde DNA isoliert und mit spez. Primern amplifiziert. Das MCC 2.1 dient für MCPyV (195 bp) als Positiv-Kontrolle (+) und das Wasser (H₂O) dient als negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Von den 13 untersuchten MCCs zeigen zwölf ein deutliches Produkt für die Virusanalyse von MCPyV (Abb. 3-10). Der Tumor MCC 14.1 zeigt kein MCPyV spezifisches Produkt. Eine DNA Kontrolle mittels genomischer *GAPDH* PCR wurde aufgrund des hohen Anteils positiver MCPyV Produkte nicht durchgeführt.

Insgesamt konnte der Polyomavirus MCPyV im Merkelzellkarzinom in 92% aller untersuchten Tumore nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde keine virale Präsenz des SV40 gefunden. Diese Ergebnisse sowie die statistischen Werte sind mit den anderen Daten der anderen neuroendokrinen Tumore in der Tabelle 3-6 zusammengefasst.

3.3.4 Präsenz des Merkelzellpolyomavirus im kleinzelligen Lungenkarzinom

Für die Untersuchung der viralen Präsenz des MCPyV und SV40 im kleinzelligen Lungenkarzinom wurden je 18 Tumore analysiert (Tab. 6-5). Es wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positiv-Kontrolle wurden beim Merkelzellpolyomavirus verschiedene im Rahmen der Methodenoptimierung als positiv bewertete Merkelzellkarzinome verwendet. Bei den Untersuchungen auf die Präsenz des *Simian virus 40* wurde der Vektor pTD1-1

von Clontech-Takara Bio Europe (2.1.3) als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Dieser Vektor enthält das SV40 *large T antigene* (Abb. 6-2). Exemplarisch werden die Ergebnisse der Virusanalysen von MCPyV von elf kleinzelligen Lungenkarzinomen und den entsprechenden genomische *GAPDH* Kontrollen in Abbildung 3-11 dargestellt.

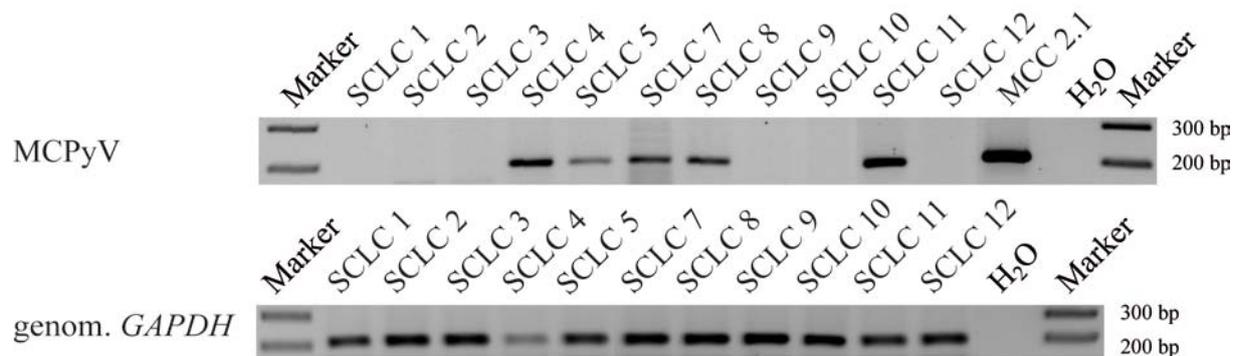


Abbildung 3-11: Virusanalyse des Polyomavirus MCPyV und genomische *GAPDH* PCR im kleinzelligen Lungenkarzinom. Aus kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) wurde DNA isoliert und mit spez. Primern amplifiziert. Das MCC 2.1 dient für MCPyV (204 bp) als Positiv-Kontrolle (+), die genomische *GAPDH* PCR (195 bp) dient als DNA-Kontrolle und das Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Von den elf untersuchten SCLCs zeigen fünf (SCLC: 4, 5, 7, 8 und 11) ein deutliches Produkt für den MCPyV (Abb.3-11). Die ebenfalls dargestellten Produkte der DNA-Kontrollen (genom. *GAPDH*) zeigen die Anwesenheit von intakter DNA in den untersuchten Proben.

Die Analyse auf eine virale Präsenz der beiden untersuchten Polyomaviren MCPyV und SV40 im kleinzelligen Lungenkarzinom zeigt, dass 39% der untersuchten Tumore eine MCPyV Präsenz aufweisen. Auch in dieser Tumorentität konnte keine virale Präsenz des SV40 detektiert werden (Abb. 3-11). Diese Ergebnisse sowie die statistischen Werte sind mit den Daten der anderen neuroendokrinen Tumoren in der Tabelle 3-6 zusammengefasst.

3.3.5 Zusammenfassung der Virusanalysen

In der Tabelle 3-6 werden die Ergebnisse der Virusanalysen der untersuchten Polyomaviren MCPyV und SV40 in allen neuroendokrinen Tumoren (malignes Melanom, Merkelzellkarzinom und kleinzelliges Lungenkarzinom) und in den untersuchten Vergleichskontroll-Geweben (NZN-Gewebe und Blut) sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse von Zusammenhängen zwischen der viralen Präsenz der Polyomaviren und der Tumorentität tabellarisch dargestellt. Dabei ist der prozentuale Anteil der infizierten Tumore angegeben. Zum besseren Verständnis der Daten wurde zusätzlich das Verhältnis der Anzahl von infizierten Tumoren zu der Gesamtanzahl der untersuchten Tumore dargestellt.

Weiter sind die p -Werte des exakten zweiseitigen Tests nach *Fisher* angegeben. Der erste Wert entspricht dem p -Wert, wenn NZN-Gewebe als Vergleichskontroll-Gewebe verwendet und mit den Tumoren verglichen wird, der zweite wenn Blutproben als Vergleichskontroll-Gewebe verwendet werden. Der p -Wert in eckigen Klammern ist das Ergebnis des Signifikanztests, wenn NZN-Gewebe und Blutproben zusammengefasst als ein Vergleichskontroll-Gewebe behandelt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse tabellarisch (Tab. 3-6) aufgeführt und anschließend erläutert.

Tabelle 3-6: Zusammenfassung der viralen Präsenzen der untersuchten Polyomaviren und der Irrtumswahrscheinlichkeiten (p -Werte) des Zusammenhangs zwischen den viralen Präsenzdaten in den jeweiligen neuroendokrinen Tumoren

Virale Präsenz								
Polyomaviren	malignes Melanom (MM)	Signifikanz [†] MM vs. NZN/Blut [NZN + Blut]	Merkelzellkarzinom (MCC)	Signifikanz [†] MCC vs. NZN/Blut [NZN + Blut]	kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC)	Signifikanz [†] SCLC vs. NZN/Blut [NZN + Blut]	Nävuszellnävus (NZN)	Blut
MCPyV	35% (34/97)	0,172 / 0,001*** [0,001***]	92% (90/98)	<0,001*** / <0,001*** [<0,001***]	39% (7/18)	0,264 / 0,005** [0,01**]	17% (3/18)	4% (1/26)
SV40	na	kSm	0% (0/40)	kSm	0% (0/18)	kSm	0% (0/13)	0% (0/26)

Der Inhalt der Klammern () zeigt das Verhältnis der Anzahl der infizierten Tumore zu der Gesamtanzahl der untersuchten Tumore. Die jeweils zweite Spalte (grau hinterlegt) zeigt die p -Werte der jeweiligen neuroendokrinen Tumore (NET) im Vergleich zu dem NZN-Gewebe / Blutproben. Der p -Wert in Klammern [] bezieht beide Vergleichskontroll-Gewebe ein. [†]: exakter Test nach Fisher (zweiseitig); *: $p \leq 0,05$ signifikant; **: $p \leq 0,01$ hoch signifikant; ***: $p \leq 0,001$ höchst signifikant; na: nicht analysiert; kSm: kein Signifikanztest möglich, da mindestens eine Variable als Konstante vorlag.

Das Polyomavirus MCPyV konnte in allen untersuchten Tumorentitäten detektiert werden. Die größte und zugleich höchst signifikante [$p < 0,001$] virale Präsenz im Vergleich zum zusammengefassten Vergleichskontroll-Gewebe wurde im Merkelzellkarzinom gefunden. 92% aller untersuchten Tumore zeigten ein positives Produkt für diesen Polyomavirus. Das maligne Melanom und das kleinzellige Lungenkarzinom weisen Präsenzen in der annähernd gleichen Größenordnung auf. So zeigen 35% [$p < 0,001$] aller untersuchten malignen Melanome eine höchst signifikante und 39% [$p = 0,01$] aller kleinzelligen Lungenkarzinome eine hoch signifikante virale Präsenz des Merkelzellpolyomavirus. Die Vergleichskontroll-Gewebe zeigen deutlich niedrigere virale Präsenzen. Insgesamt sind 17% der NZN-Gewebe- und lediglich 4% Blutproben positiv auf den MCPyV getestet worden.

Im Gegensatz dazu wurde in keiner untersuchten Tumorprobe und in keiner untersuchten Vergleichskontroll-Gewebeprobe eine virale Präsenz des Polyomavirus SV40 detektiert. Deshalb konnten für den Polyomavirus SV40 keine statistischen Tests durchgeführt werden, da alle Werte konstant sind.

Darüber hinaus konnte in keiner der untersuchten Tumorentitäten ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Hypermethylierung der untersuchten Tumorsuppressorgene und dem Polyomavirus MCPyV festgestellt werden.

3.4 Auswirkungen auf den Methylierungsstatus durch exo- und endogene Faktoren

Der folgende Teil dieser Arbeit beinhaltet die Ergebnisse der DNA methylierenden Eigenschaften von verschiedenen endogenen und exogenen Noxen auf humane Zellen. Dabei wurde die Wirkung von der DNA Methyltransferase delta 3b4 ($\Delta DNMT3b4$), dem *latent membrane protein 1* (LMP-1), dem Cytokin Interleukin-6 (IL-6) und von UV-B Licht auf die Zelllinien IGR-I, normale humane epidermale Melanocyten (NHEM), Buff1280 und HaCat untersucht (Tab. 2-1).

3.4.1 *Latent membrane proteine 1*

Es wurde gezeigt, dass das *latent membrane proteine 1* (LMP-1) des HHV 4 in der Lage ist in den Nasen- und Rachenepithelzellen die Expression von RASSF1A zu erniedrigen und so im Verdacht steht das Nasopharynxkarzinom auszulösen (Man *et al.*, 2007). Es lässt sich nun vermuten, dass die Inaktivierung von *RASSF1A* durch epigenetische Prozesse beeinflusst wird. Diese Vermutung wird im Folgenden in den dargestellten Experimenten überprüft.

3.4.1.1 Keine Auswirkungen auf den Methylierungsstatus einer transienten Transfektion von *LMP-1* in IGR-I Zellen

Das Vektorkonstrukt mit *latent membrane proteine 1* wurde von Prof. Yu-Sun Chang gestellt und war im pFLAG-CMVTM-2 Expressionsvektor über Hind III und BamH I kloniert worden. Dieses Vektorkonstrukt wurde in IGR-I Zellen transient transfiziert und die Auswirkungen auf den Methylierungsstatus von *LMP-1* auf die Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* mit Hilfe des Methylierungsassays MSP analysiert. Weiter wurden Expressionsassays (sqRT-PCR) der Tumorsuppressorgene sowie von IL-6 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3-12 und 3-13 dargestellt.

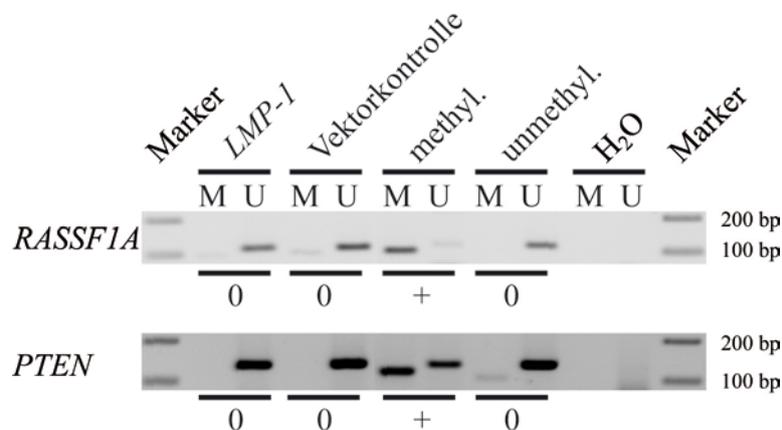


Abbildung 3-12: Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* in *LMP-1* transient transfizierten IGR-I Zellen. Aus mit *LMP-1* und Vektorkontrolle transient transfizierten IGR-I Zellen wurde nach 6 Tagen Kultivierungszeit, isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A* 105 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungs-kontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet.

Die MSP Methylierungsanalysen der *LMP-1* transient transfizierten IGR-I Zellen und der Vektorkontrolle zeigen sowohl bei *RASSF1A* als auch bei *PTEN* deutliche Produkte in den mit U gekennzeichneten Spuren (Abb. 3-12). In den Spuren, die methylierte DNA Amplifikate zeigen (M), wurden in beiden Tumorsuppressorgenen keine Produkte detektiert. Es sind allerdings beim Tumorsuppressorgen *RASSF1A* sehr schwache Produkte in den mit M gekennzeichneten Spuren der Transfektion als auch in die Vektorkontrolle detektiert worden. Die methylierten Kontrollen (methyl.) zeigen je ein methyliertes und die unmethylierten Kontrollen (unmethyl.) je ein unmethyliertes Produkt. Bei beiden methylierten Kontrollen treten unmethylierte Produkte durch eine unvollständige

in vitro Methylierung auf. Bei der unmethylierten Kontrolle des Tumorsuppressorgens *PTEN* zeigt sich ein Nebenprodukt in der methylierungsspezifischen Spur (M), wie es in Abb. 3-1, 2 und 5 beschrieben wurde. Methylierungsanalysen von *CDKN2A* zeigten keinerlei Produkte, was auf einen Verlust des Gens hindeutet und werden nicht dargestellt.

Insgesamt konnte bei *RASSF1A* und *PTEN* durch eine transiente Transfektion von *LMP-1* keine Methylierung herbeigeführt werden.

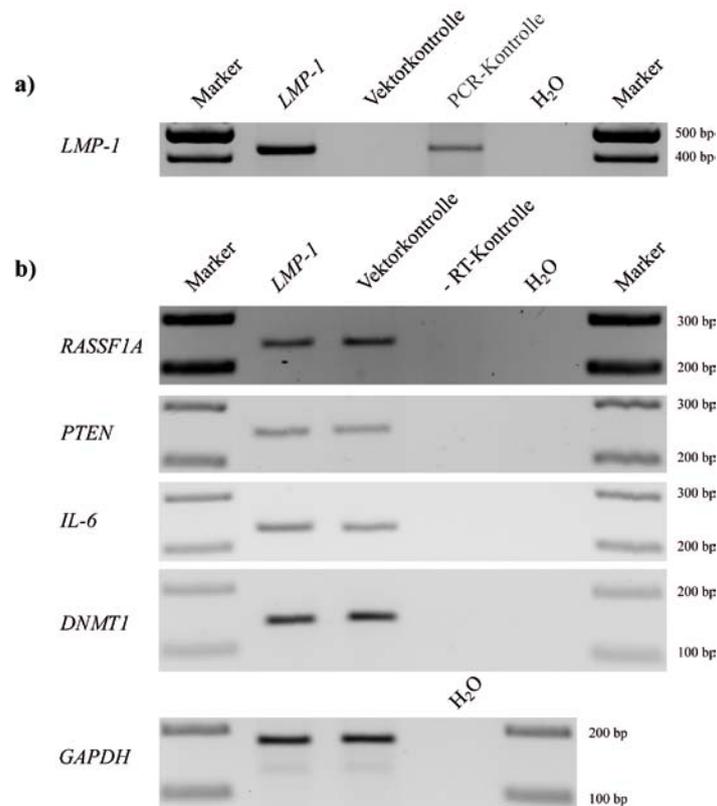


Abbildung 3-13: Expressionsergebnisse der LMP-1 transient transfizierten IGR-I Zellen. a) Transfektionskontrolle der transienten *LMP-1* (411 bp) Transfektion. Das untransfizierte *LMP-1* Konstrukt (1 pg) dient als PCR-Kontrolle. b) Expressionsanalyse von *RASSF1A* (239 bp), *PTEN* (246 bp), *IL-6* (225 bp), *DNMT1* (133 bp) und *GAPDH* (176 bp). Aus mit *LMP-1* und Vektorkontrolle transient transfizierten IGR-I Zellen wurde nach 6 Tagen Kultivierungszeit isolierte RNA nach einer RT-PCR mit genspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Wasser (H₂O) dient in jeder RT-PCR als Negativ-Kontrolle und eine DNase behandelte RNA dient als -RT Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Den Expressionsanalysen der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* sowie dem Cytokin *IL-6* ging eine Transfektionskontrolle des *LMP-1* Konstrukts in den transient transfizierten IGR-I Zellen voraus (Abb. 3-13).

Es ist ein deutliches LMP-1 spezifisches Produkt in der Spur zu erkennen, die die Transfektion des Konstrukts in IGR-I Zellen darstellt. Hingegen bleibt in der Vektorkontrolle dieses Produkt aus. Die

PCR-Kontrolle wird durch eine PCR, in der ausschließlich das Konstrukt als *template* vorlag, sichergestellt (Abb. 3-13 a). Die –RT Kontrollen zeigen kein Produkt und stellen so sicher, dass keine genomische DNA und mRNA amplifiziert wird, sondern nur *in vitro* transkribierte cDNA.

Insgesamt sind bei *RASSF1A*, *PTEN*, *IL-6* und *DNMT1* keine Unterschiede zwischen der LMP-1 Transfektion und der Vektorkontrolle zu erkennen (Abb. 3.13 b).

3.4.2 DNA-Methyltransferase delta 3b Variante 4

Es wurde gezeigt, dass die Variante 4 der DNA Methyltransferase DNMT3b (Δ DNMT3b4) die Fähigkeit besitzt, spezifisch den Promotor des Tumorsuppressorgens von *RASSF1A* zu methylieren (Wang *et al.*, 2007a). Diese Hypothese wird im Folgenden in den dargestellten Experimenten überprüft.

3.4.2.1 Keine Auswirkungen auf den Methylierungsstatus einer transienten Transfektion von Δ DNMT3b4 in IGR-I Zellen

Das Vektorkonstrukt Δ DNMT3b4 wurde von Prof. Dr. You-hong Fan gestellt und war im pcDNA6/V5-HisC Expressionsvektor über *Nhe I* und *BamH I* kloniert worden. Dieses Vektorkonstrukt wurde in IGR-I Zellen transient transfiziert und die methylierenden Eigenschaften von Δ DNMT3b4 auf die Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* mit Hilfe der gleichen Assays wie unter 3.4.1.1 angegeben analysiert.

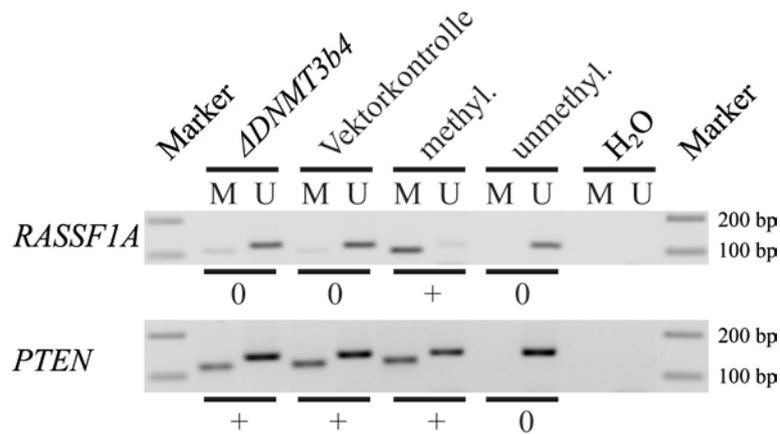


Abbildung 3-14: Ergebnisse Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* in $\Delta DNMT3b4$ transient transfizierten IGR-I Zellen. Aus mit $\Delta DNMT3b4$ und Vektorkontrolle transient transfizierten IGR-I Zellen wurde nach 6 Tagen Kultivierungszeit, isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungs-spezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methylierten (*RASSF1A*: 93 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethylierten (*RASSF1A*: 105 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H_2O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet; *: zeigt das methylierte MSP Produkt bei *PTEN*.

Die MSP Methylierungsanalysen der $\Delta DNMT3b4$ transient transfizierten IGR-I Zellen und der Vektorkontrolle zeigen ein ähnliches Ergebnis wie das der LMP-1 transfizierten IGR-I Zellen. Es konnten sowohl bei *RASSF1A* als auch bei *PTEN* deutliche Produkte in den mit U gekennzeichneten Spuren detektiert werden (Abb. 3-14). In den methylierungsspezifischen Spuren des $\Delta DNMT3b4$ Konstrukts (M) und der Vektorkontrolle (M) der MSP von *RASSF1A* zeigen sich ebenfalls schwache Produkte. Bei *PTEN* konnten ebenfalls in den methylierungsspezifischen Spuren (M) sowohl bei $\Delta DNMT3b4$ transfizierten als auch in der Vektorkontrolle Produkte detektiert werden. Diese Produkte besitzen die gleiche Intensität und zeigen an, dass die Zelllinie IGR-I schwache Zellkultur bedingte Veränderung erworben hat. Methylierungsanalysen von *CDKN2A* zeigten keinerlei Produkte und werden nicht dargestellt.

Insgesamt konnte bei den Tumorsuppressorgenen *RASSF1A* und *PTEN* durch eine transiente Transfektion von $\Delta DNMT3b4$ keine Methylierung herbeigeführt werden.

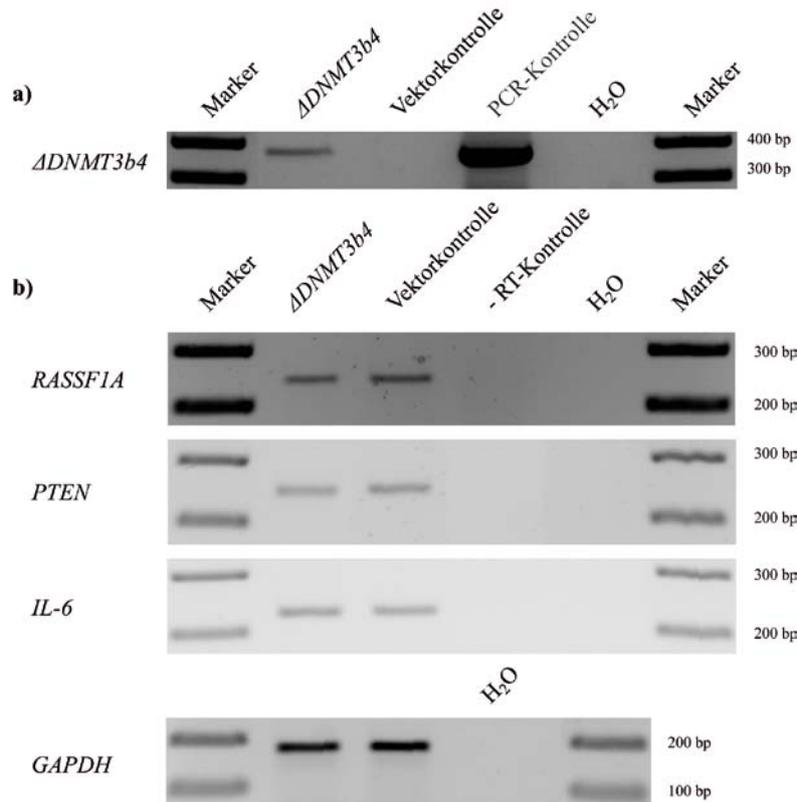


Abbildung 3-15: Expressionsergebnisse der $\Delta DNMT3b4$ transient transfizierten IGR-I Zellen. a) Expressionskontrolle der transienten $\Delta DNMT3b4$ (357 bp) Transfektion. Das untransfizierte $\Delta DNMT3b4$ Konstrukt (1 μg) dient als PCR-Kontrolle. b) Expressionsanalyse von *RASSF1A* (239 bp), *PTEN* (246 bp), *IL-6* (225 bp) und *GAPDH* (176 bp). Aus mit $\Delta DNMT3b4$ und Vektorkontrolle transient transfizierten IGR-I Zellen wurde nach 6 Tagen Kultivierungszeit isolierte RNA nach einer RT-PCR mit genspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Wasser (H_2O) dient in jeder RT-PCR als Negativ-Kontrolle und eine DNase behandelte RNA dient als -RT Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Transfektionskontrolle der transienten $\Delta DNMT3b4$ Konstrukt Transfektion in IGR-I Zellen zeigt ein deutliches $\Delta DNMT3b4$ spezifisches Produkt. Die Transfektion mit dem „leeren“ Vektor zeigt kein Produkt. Eine PCR-Kontrolle, bei der das aufgereinigte $\Delta DNMT3b4$ Konstrukt als *template* verwendet wurde, zeigt ebenfalls ein Amplifikat im auftrennenden Agarosegel (Abb. 3-15 a).

Die Expressionsanalyse von *RASSF1A* zeigt eine leicht reduzierte Intensität in den Zellen, die mit dem $\Delta DNMT3b4$ Konstrukt transfiziert wurden, im Gegensatz zu den Zellen, die mit der Vektorkontrolle transfiziert wurden (Abb. 3-13 b). Jedoch ist dieser Intensitätsunterschied ebenfalls bei *GAPDH* zu erkennen (Abb. 3-15 b). Daher werden die Intensitäten der Produkte als gleich bewertet. Bei *PTEN* und *IL-6* sind keine deutlichen Unterschiede zwischen der $\Delta DNMT3b4$ Transfektion und der Vektorkontrolle zu erkennen (Abb. 3-13 b). Eine -RT Kontrolle stellt wiederum sicher, dass nur transkribierte cDNA amplifiziert wurde.

Insgesamt konnte bei *RASSF1A*, *PTEN* und *IL-6* keine Veränderung des Expressionslevels durch eine transiente Transfektion von $\Delta DNMT3b4$ detektiert werden.

3.4.2.2 Eine stabile Transfektion von $\Delta DNMT3b4$ erhöht die Expression von *RASSF1A*, *PTEN* und *IL-6*

Da bei einer transienten Transfektion keine Veränderungen zu erkennen waren und die methylierenden Eigenschaften von $\Delta DNMT3b4$ bei Wang *et al.* bei einer stabilen Transfektion auftrat, wurde eine stabile Transfektion durchgeführt, um dort etwaige Auswirkungen feststellen zu können. Es wurde ein mit $\Delta DNMT3b4$ positiv stabil transfizierter Klon untersucht.

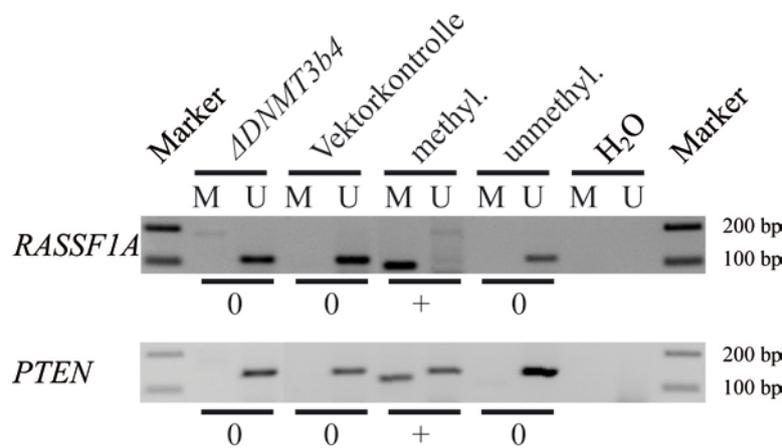


Abbildung 3-16: Ergebnisse Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* in $\Delta DNMT3b4$ stabil transfizierten IGR-I Zellen. Aus mit $\Delta DNMT3b4$ und Vektorkontrolle stabil transfizierten IGR-I Zellen eines Klons wurde isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A* 105 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet.

Auch die MSP Methylierungsanalysen der $\Delta DNMT3b4$ stabil transfizierten IGR-I Zellen und der Vektorkontrolle zeigen sowohl bei *RASSF1A* als auch bei *PTEN* deutliche Produkte in den mit U gekennzeichneten Spuren (Abb. 3-16) und keinerlei Produkte in den methylierungsspezifischen Spuren (M) beider Tumorsuppressorgene.

Methylierungsanalysen von *CDKN2A* zeigten keinerlei Produkte und werden nicht dargestellt. Insgesamt konnte bei *RASSF1A* und *PTEN* durch eine stabile Transfektion von $\Delta DNMT3b4$ keine Methylierung herbeigeführt werden.

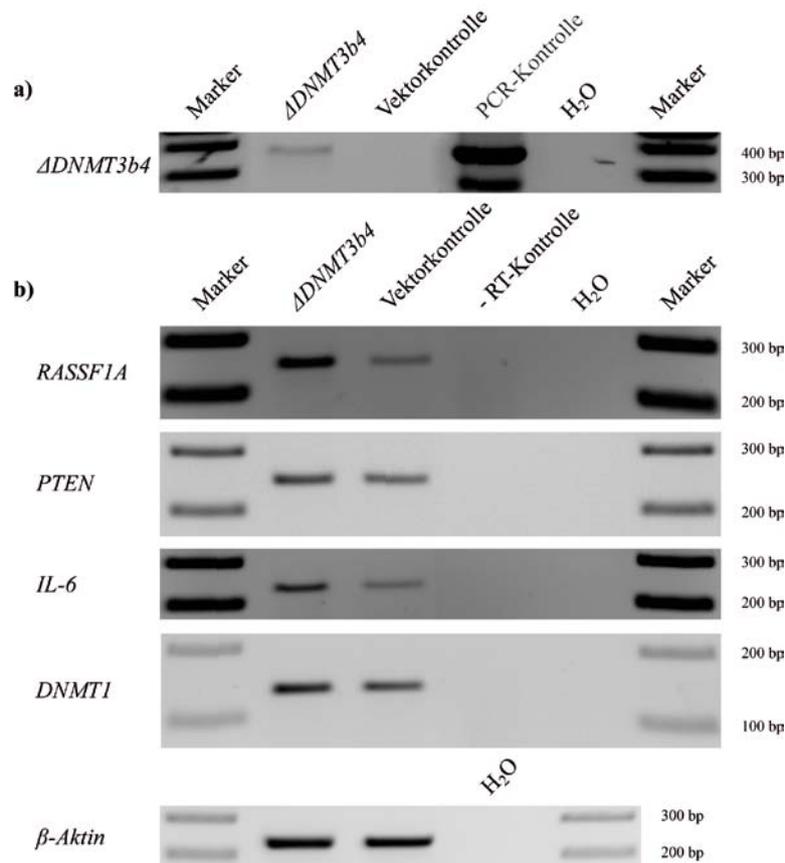


Abbildung 3-17: Expressionsergebnisse der $\Delta DNMT3b4$ stabil transfizierten IGR-I Zellen. a) Expressionskontrolle der stabilen $\Delta DNMT3b4$ (357 bp) Transfektion. Das untransfizierte $\Delta DNMT3b4$ Konstrukt dient als PCR-Kontrolle. b) Expressionsanalyse von *RASSF1A* (239 bp), *PTEN* (246 bp), *IL-6* (225 bp), *DNMT1* (133 bp) und β -Aktin (226 bp). Aus mit $\Delta DNMT3b4$ und Vektorkontrolle stabil transfizierten IGR-I Zellen wurde isolierte RNA nach einer RT-PCR mit genspezifischen Primerpaaren, amplifiziert. Wasser (H_2O) dient in jeder RT-PCR als Negativ-Kontrolle und eine DNase behandelte RNA dient als -RT Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Genauso wie bei der transienten $\Delta DNMT3b4$ Konstrukt Transfektion wurde bei der Stablen ebenfalls eine Transfektionskontrolle durchgeföhrt. Die Spur des stabilen $\Delta DNMT3b4$ Klons zeigt ein deutliches $\Delta DNMT3b4$ spezifisches Produkt, welches in stabil transfizierten Klonen der Vektorkontrolle ausbleibt. Die Amplifikationskontrolle der PCR mit dem reinen $\Delta DNMT3b4$ Vektorkonstrukt zeigt ebenfalls ein deutliches Produkt und gewöhrlleistet die ordnungsgemöhre Amplifizierung der Transfektionskontrolle (Abb. 3-17 a)

Die *semi*-quantitativen Expressionsanalysen (sqRT-PCR) von *RASSF1A* zeigen ein intensiveres sqRT-PCR Produkt von *RASSF1A* in $\Delta DNMT3b4$ stabil transfizierten Zellen. Ebenso kann bei dem Tumorsuppressorgen *PTEN*, im Vergleich zu dem stabil transfizierten Zellklon der Vektorkontrolle, ein intensiveres sqRT-PCR Produkt in dem stabil transfizierten $\Delta DNMT3b4$ IGR-I Zellklon erkannt werden (Abb. 3-17 b). Bei der *semi*-quantitativen Expressionsanalyse des Cytokins *IL-6* zeigt sich eine Steigerung der Bandenstärke im stabilen $\Delta DNMT3b4$ Zellklon im Vergleich zum Zellklon der

Vektorkontrolle (Abb. 3-17 b). Die Methyltransferase *DNMT1* zeigt im Vergleich zu der Vektorkontrolle eine leicht stärkere Bande. Die –RT Kontrollen zeigen keine Produkte und verdeutlichen dadurch, dass nur cDNA amplifiziert wurde.

Insgesamt konnte bei *RASSF1A*, *PTEN*, *IL-6* und *DNMT1* durch eine stabile Transfektion von *ΔDNMT3b4* eine Steigerung der Expression detektiert werden, wobei die Intensität der Produkte von *RASSF1A* und *IL-6* verstärkt auftrat. Die Expressionssteigerung von *PTEN* und *DNMT1* ist gering, aber detektierbar.

3.4.3 Mittleres ultraviolettes Licht beeinflusst die Expression von IL-6 und Methyltransferasen

Zur Analyse der Auswirkungen von UV-B Licht auf den Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen, deren Expression und der Expression von Methyltransferasen und Interleukin-6 wurden humane Keratinocyten mit UV-B Licht bestrahlt. Zur Behandlung wurden humane HaCat Zellen und der Ultraviolet Crosslinker CL-1000 mit einem UV-B Leuchtmittel (312 nm) verwendet. Die Zellen wurden mit einer Bestrahlungsdosis von 100 J/m^2 bestrahlt (de Vos *et al.*, 1994; Kirnbauer *et al.*, 1991). Eine Probe wurde im Abstand von 24 h fünfmal mit der Bestrahlungsdosis bestrahlt. Diese Probe soll eine chronische Bestrahlung simulieren und wird im Folgenden als „chronisch“ bezeichnet. Weiterhin wurde eine Kinetik durchgeführt, dazu wurden nach einer einmaligen Bestrahlung mit 100 J/m^2 die Zellen nach 2, 4, 6 und 10 Stunden Kultivierungszeit im Inkubator geerntet, DNA sowie RNA isoliert und für die entsprechenden Assays weiterbearbeitet (2.2.7.5). Die chronisch behandelten Zellen wurden nach einer Kultivierungszeit von 12h nach der letzten Bestrahlung geerntet und entsprechend weiterverarbeitet.

Für die Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* wurden die Methylierungsassays *methylation specific PCR* (MSP) und *combined bisulfite restriction analysis* (COBRA) (2.2.7.3) angewendet. Für die Expressionsanalyse von *IL-6*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* wurde die *semi-quantitative PCR* (sqRT-PCR) (2.2.7.5) angewendet und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ergebnisse der Methylierungsanalysen und der sqRT-PCRs sind im Folgenden exemplarisch dargestellt (Abb. 3-18).

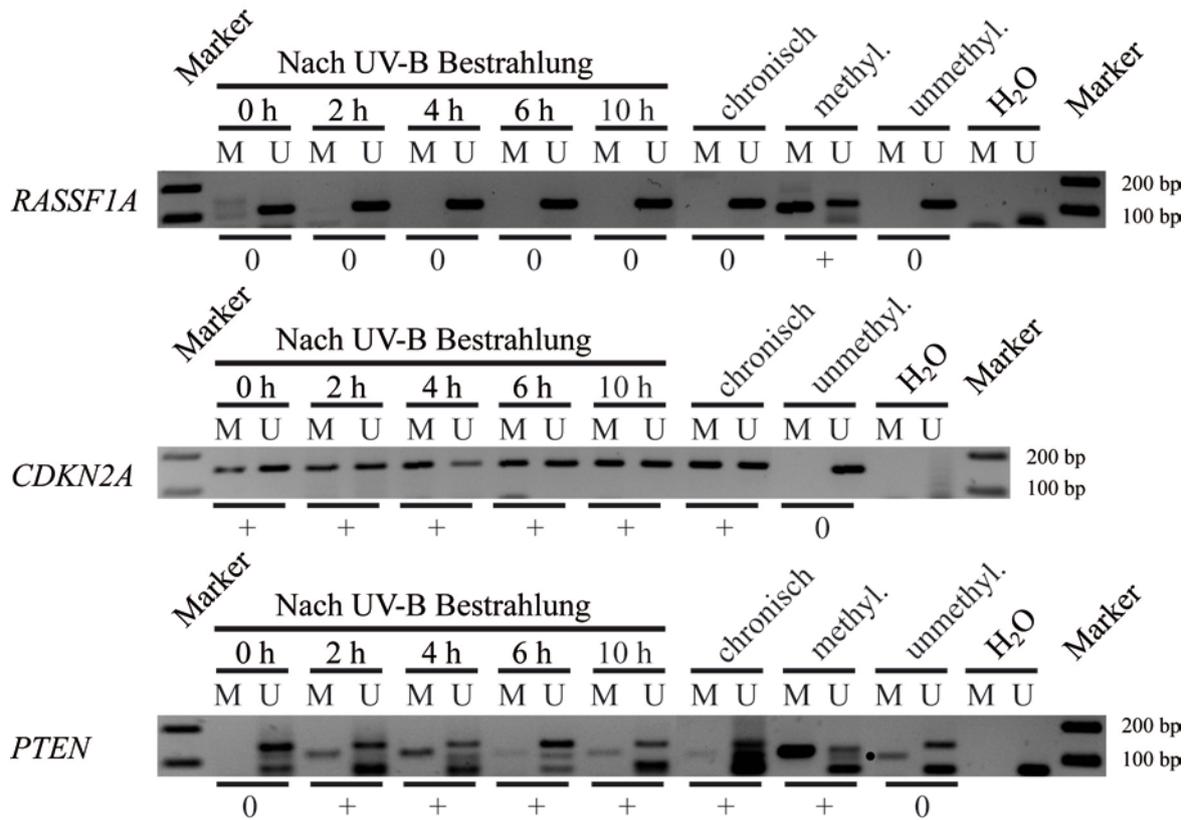


Abbildung 3-18: Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* in UV-B exponierten HaCat Zellen. Aus HaCat Zellen wurde nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (2 h, 4 h, 6 h, 10 h, chronisch) nach einer UV-B Exposition isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *CDKN2A*: 150 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A*: 105 bp; *CDKN2A*: 151 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine Probe, die nicht bestrahlt wurde dient als Negativkontrolle für die Bestrahlung (0 h). Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; + Probe wurde als methyliert bewertet. •: zeigt ein Nebenprodukt bei *PTEN*.

Die Methylierungsanalyse MSP zeigt für die Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* folgende Ergebnisse: *RASSF1A* zeigt in allen bestrahlten Proben der UV-B Kinetik (0 h, 2 h) Produkte in der Spur des Primerpaares, das unmethylierte DNA amplifiziert (U). In der Spur für methylierte DNA (M) sind keinerlei Produkte zu erkennen (Abb. 3-18).

Die Methylierungsanalyse des Tumorsuppressorgen *CDKN2A* zeigt in allen Proben der UV-B Kinetik sowohl in den Spuren der Methylierten (M) als auch in den Spuren der unmethylierten Produkte (U) ein Amplifikat (Abb. 3-18). Dies deutet darauf hin, dass die Promotorregion von *CDKN2A* in jeder Probe partiell methyliert vorliegt.

Das Tumorsuppressorgen *PTEN* zeigt in der Kontrollprobe (0 h) keine Produkte, die auf eine Methylierung hindeuten. Es kann nur in der rechten Spur (U) ein Produkt detektiert werden. Nach zwei Stunden Inkubationszeit nach einer UV-B Bestrahlung von 100 J/m² kann eine leichte Bande in der linken Spur (M) detektiert werden. Dies deutet auf eine Methylierung im untersuchten Bereich hin. Dies trifft ebenfalls auf die Probe zu, die vier Stunden nach der Strahlenexposition geerntet wurde.

Diese Bandenstärke ist intensiver als das Produkt bei zwei Stunden. Nach sechs und zehn Stunden nimmt die Intensität dieses Produktes sehr stark ab und erreicht fast die Produktstärke der unbehandelten Kontrolle. Jedoch sind noch leichte Produkte zu detektieren. In der chronisch behandelten Probe sind wie in der unbestrahlten Probe nur Produkte in der rechten Spur zu identifizieren, was auf einen unmethylierten Promotor hindeutet.

Insgesamt wurde in der Promotorregion der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *CDKN2A* keine Methylierung detektiert, die sich auf eine Bestrahlung mit UV-B Licht zurückführen lässt. Bei *PTEN* erkennt man eine Methylierung 2 h nach der Bestrahlung, die sich nach 4 h etwas verstärkt und bei 6 und 10 Stunden wieder fast völlig verschwindet. In der chronischen Bestrahlung tritt ebenfalls eine sehr schwache Methyleirung auf.

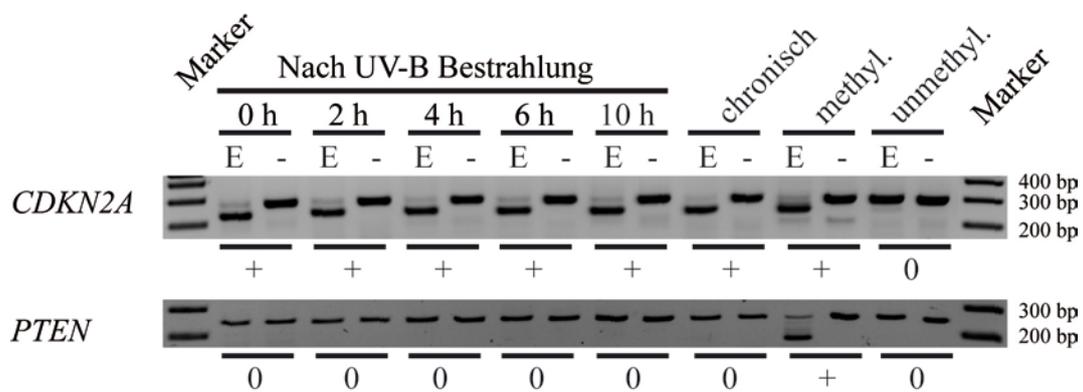


Abbildung 3-19: Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *PTEN* in UV-B exponierten HaCat Zellen. Aus HaCat Zellen wurde nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (0h, 2h, 4, 6, 10h, chronisch) nach einer UV-B Exposition isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert und mit der 5'-CpG-3' spezifischen Restriktionsendonuklease *Taq^αI* gespalten. Dabei entspricht (E) dem mit *Taq^αI* behandelten PCR-Produkt (*CDKN2A*: 268 bp, *Taq^αI*-Verdau-Produkte: 220 und 48 bp; *PTEN*: 245 bp, *Taq^αI*-Verdau-Produkte: 169, 12, 13, 12 und 39 bp) und (-) der unbehandelten *mock*-Restriktion. Zeigen sich in (E) Restriktionsprodukte wird die Probe als methyliert bewertet. Eine unbestrahlte Probe dient als Negativ-Kontrolle für die Bestrahlung (0 h). Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Zur Auswertung wurden die Verdau-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; + Probe wurde als methyliert bewertet.

Die Methylierungsanalyse COBRA zeigt für das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* in jeder Probe ein ähnliches Methylierungsmuster. Es ist in jeder Probe, die mit der Restriktionsendonuklease (*Taq^αI*) behandelt wurde, Restriktionsprodukte zu detektieren. Zusätzlich zu den Restriktionsprodukten sind intensitätsschwächere Produkte von der Größe des Produkts des *mock*-Verdau zu erkennen. Dies deutet auf eine partielle Promotormethylierung von *CDKN2A* hin.

Die Ergebnisse der COBRA von *PTEN* zeigen in der jeweils linken Spur der UV-B Kinetik keine Verdauprodukte. Nur die methylierte Kontrolle (methyl.) zeigt ein Verdauprodukt bei einer Größe von ca. 169 bp.

Insgesamt konnte die partielle Methylierung des *CDKN2A* Promotors in allen Proben der UV-B Kinetik mit Hilfe der Methode MSP und COBRA bestätigt werden. Die in der MSP des

Tumorsuppressorgens *PTEN* (Abb. 3-18) detektierte auftretende und abklingende Methylierung in den Proben 2 h, 4 h, 6 h, 10 h nach einer Bestrahlung konnte in der COBRA Analyse (Abb. 3-19) nicht bestätigt werden.

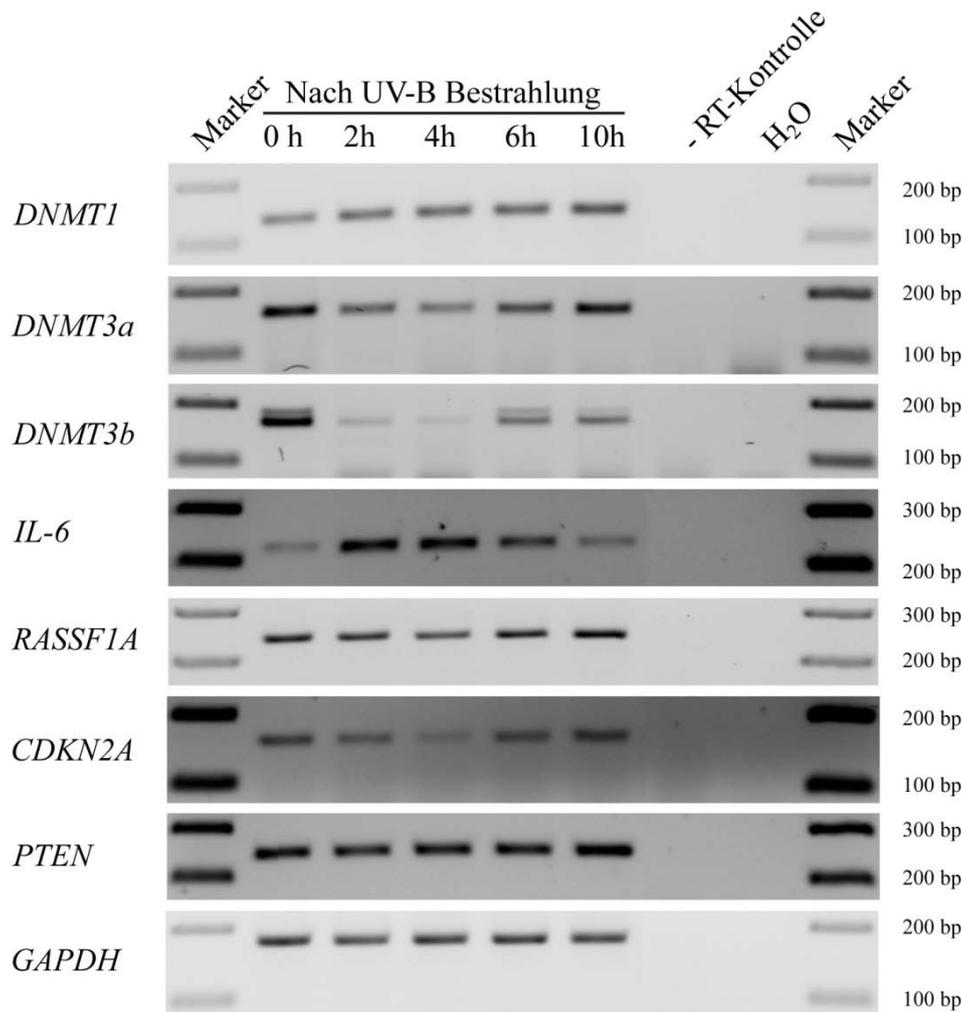


Abbildung 3-20: Expressionsergebnisse von UV-B exponierten HaCat Zellen. Aus UV-B exponierten (100 J/m^2) HaCat Zellen wurde nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (2h 4, 6, 10h, chronisch) RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Anschließend wurde mit cDNA-spezifischen Primerpaaren eine sqRT-PCR (*DNMT1*: 133 bp; *DNMT3a*: 158 bp; *DNMT3b*: 163 bp; *IL-6*: 225 bp; *RASSF1A*: 239 bp; *CDKN2A* 157 bp; *PTEN*: 246 bp) durchgeführt. Eine Probe, die nicht bestrahlt wurde dient als Negativ-Kontrolle für die Bestrahlung (0 h). Eine -RT-Kontrolle dient als Kontrolle dafür, dass keine genomische DNA amplifiziert wird und Wasser (H_2O) dient als Negativ-Kontrolle. Eine sqRT-PCR von *GAPDH* (176 bp) zeigt, dass in jeder Probe äquivalente Mengen von cDNA amplifiziert wurden. Zur Auswertung wurden die sqRT-PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die *semi*-quantitativen RT-PCRs der Tumorsuppressorgene, der DNA Methyltransferasen und von Interleukin-6 zeigen folgende Ergebnisse: Um zunächst zu kontrollieren, dass in jeder Probe jeder sqRT-PCR eine äquivalente Menge an cDNA verwendet wird, wurde eine sqRT-PCR mit dem *housekeeping* Gen *GAPDH* durchgeführt. Diese sqRT-PCR zeigt in jeder verwendeten Probe ein Produkt mit gleicher Bandenstärke (Abb. 3-20). Die *DNMT1* zeigt über den ganzen Versuchszeitraum

eine leicht steigende Bandenintensität. Die Methyltransferase *DNMT3a* und *3b* zeigen hingegen, dass die Bandenstärke bei zwei und bei vier Stunden zunächst abnimmt, um bei sechs und zehn Stunden wieder zuzunehmen. Dabei tritt dieser reproduzierbare Effekt bei *DNMT3b* stärker als bei *DNMT3a* auf. Bei *DNMT3a* erreicht die Bandenstärke bei zehn Stunden wieder die Ausgangsintensität der unbehandelten Probe (0 h). Bei *DNMT3b* bleibt die Bandenstärke bei sechs und zehn Stunden gleich und erreicht nicht wieder die Stärke der unbehandelten Probe (0 h) (Abb. 3-20).

Die Bandenintensität von *IL-6* der unbehandelten Probe (0 h) ist sehr gering. Nachdem die HaCat Zellen einer Bestrahlung von UV-B Licht ausgesetzt wurden, steigt die Bandenintensität von *IL-6* stark an. Die Bandenstärke erreicht 2 h bis 4 h nach der Exposition das Maximum an Intensität. Sechs Stunden nach der Bestrahlung sinkt die Bandenstärke wieder leicht ab, um nach zehn Stunden wieder auf die gleiche Bandenintensität wie die unbehandelte Kontrolle abzusinken (Abb. 3-20). Das Ergebnis des *semi*-quantitativen Expressionsassays der UV-B behandelten HaCat Zellen zeigt eine geringe Herunterregulierung der mRNA von *RASSF1A* bei 2 h und 4 h nach der Bestrahlung mit UV-B Licht. Diese Expression steigt bei sechs und zehn Stunden nach der Bestrahlung wieder auf die gleichen Bandenintensität der Kontrolle (0 h) an (Abb. 3-20).

Die Bandenstärke des *semi*-quantitativen Expressionsassay des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* sinkt nach einer UV-B Exposition leicht ab und erreicht nach vier Stunden das Minimum, um dann nach sechs Stunden wieder anzusteigen. Die Bandenstärke erreicht nach zehn Stunden wieder die Ausgangsintensität der unbehandelten Kontrolle. *PTEN* zeigt wie das *housekeeping* Gen *GAPDH* in allen Proben der UV-B Kinetik ein gleich starkes Produkt.

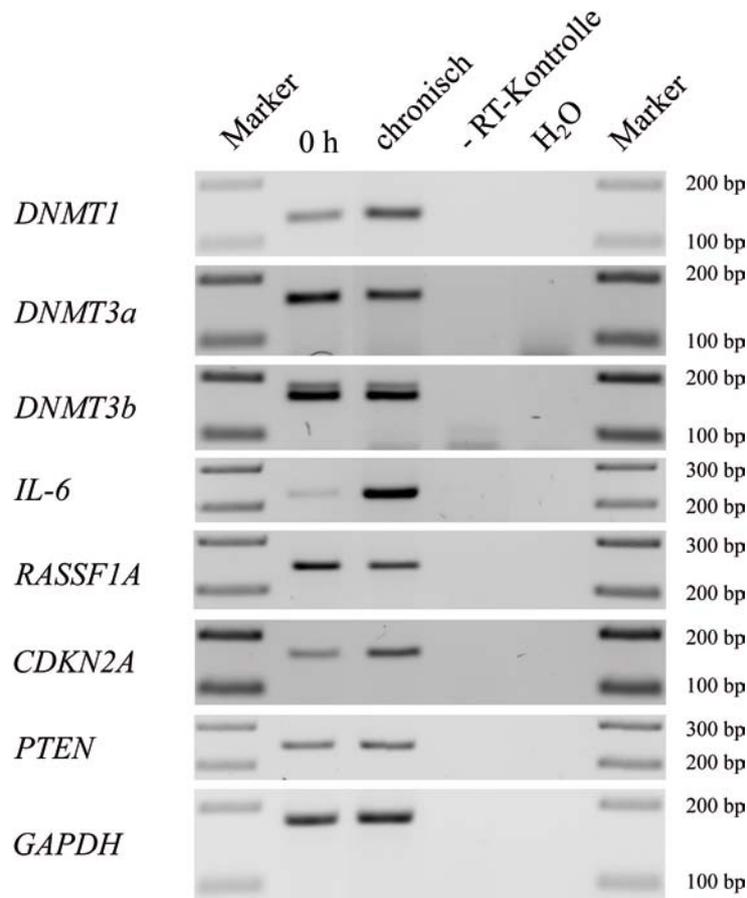


Abbildung 3-21: Expressionsergebnisse von chronisch UV-B exponierten HaCat Zellen. Aus chronisch UV-B exponierten (100 J/m²) HaCat Zellen wurde nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (2h 4, 6, 10h, chronisch) RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Anschließend wurde mit cDNA-spezifischen Primerpaaren eine sqRT-PCR (*DNMT1*: 133 bp; *DNMT3a*: 158 bp; *DNMT3b*: 163 bp; *IL-6*: 225 bp; *RASSF1A*: 239 bp; *CDKN2A* 157 bp; *PTEN*: 246 bp) durchgeführt. Eine Probe, die nicht bestrahlt wurde dient als Negativ-Kontrolle für die Bestrahlung (0 h). Eine -RT-Kontrolle dient als Kontrolle dafür, dass keine genomische DNA amplifiziert wird und Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Eine sqRT-PCR von *GAPDH* (176 bp) zeigt, dass in jeder Probe äquivalente Mengen von cDNA amplifiziert wurden. Zur Auswertung wurden die sqRT-PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die chronisch behandelten Proben zeigen ein ähnliches Expressionsmuster wie die Proben der Bestrahlungskinetik. Die DNA Methyltransferase *DNMT1* zeigt bei der chronisch behandelten Probe ein intensiveres Produkt als die unbehandelte Probe (Abb. 3-21). Die beiden Methyltransferasen *DNMT3a* und *DNMT3b* zeigen gleiche Intensitäten zu ihrer unbehandelten Kontrolle. Die Bandenstärke von Interleukin-6 ist sehr viel stärker in der chronisch behandelten Probe als in der unbehandelten Probe. Ebenfalls ein leicht intensiveres Produkt kann bei *CDKN2A* bei einer chronischen Bestrahlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle detektiert werden. Gleiche Intensitäten zwischen einer chronischen Behandlung und der Kontrolle können bei dem

Tumorsuppressorgen *PTEN* beobachtet werden. Das *housekeeping* Gen *GAPDH* besitzt ebenfalls, wie erwartet, in jeder Probe ein gleich starkes Produkt (Abb. 3-21).

Die chronische Behandlung von UV-B Licht auf die HaCat Zellen hat leichte Auswirkungen auf die Expression von *RASSF1A*. Es kann ein kontrastärmeres Produkt im Vergleich zur Kontrolle (0 h) in der chronisch bestrahlten Zellprobe detektiert werden. Dies zeigt, dass durch eine chronische UV-B Exposition eine leichte Herunterregulierung der Expression von *RASSF1A* stattfindet.

Insgesamt konnte durch eine Bestrahlung von Keratinocyten mit UV-B Licht eine Erhöhung des mRNA-Level von *IL-6* und der Methyltransferase *DNMT1* detektiert werden. Weiterhin zeigten die Methyltransferasen *DNMT3a* und *DNMT3b* eine starke und die Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *CDKN2A* eine schwache temporäre Erniedrigung des mRNA-Level. *PTEN* zeigte keine Veränderung im Expressionsmuster. Es konnte keine Promotormethylierung der drei untersuchten Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* detektiert werden.

3.4.4 Exogene Supplementierung des Cytokins Interleukin-6

Durch Hodge *et al.* wurde in der Literatur beschrieben, dass durch eine exogene Supplementierung von Interleukin-6 (IL-6) die Re-Methylierung der Promotorregion des Tumorsuppressorgens *p53* unterstützt wird (Hodge *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob IL-6 in der Lage ist Stoffwechselforgänge auszulösen, die auch andere Tumorsuppressorgene durch eine Promotormethylierung inaktivieren können, wurden humane Melanocyten und Buff1280 Zellen mit Interleukin-6 behandelt (2.2.1.1). Hierzu wurde über zehn Passagen bei jeder Passage IL-6 zum Medium supplementiert und die Auswirkungen auf den DNA Methylierungsstatus von supplementierten IL-6 auf die Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* mit Hilfe der Methylierungsassays MSP und COBRA analysiert. Exemplarisch werden die Ergebnisse der MSPs und COBRAs der Passagen sechs bis zehn der supplementierten Melanocyten und Buff1280 Zellen im Folgenden dargestellt (Abb. 3-22, 3-23 und 3-24).

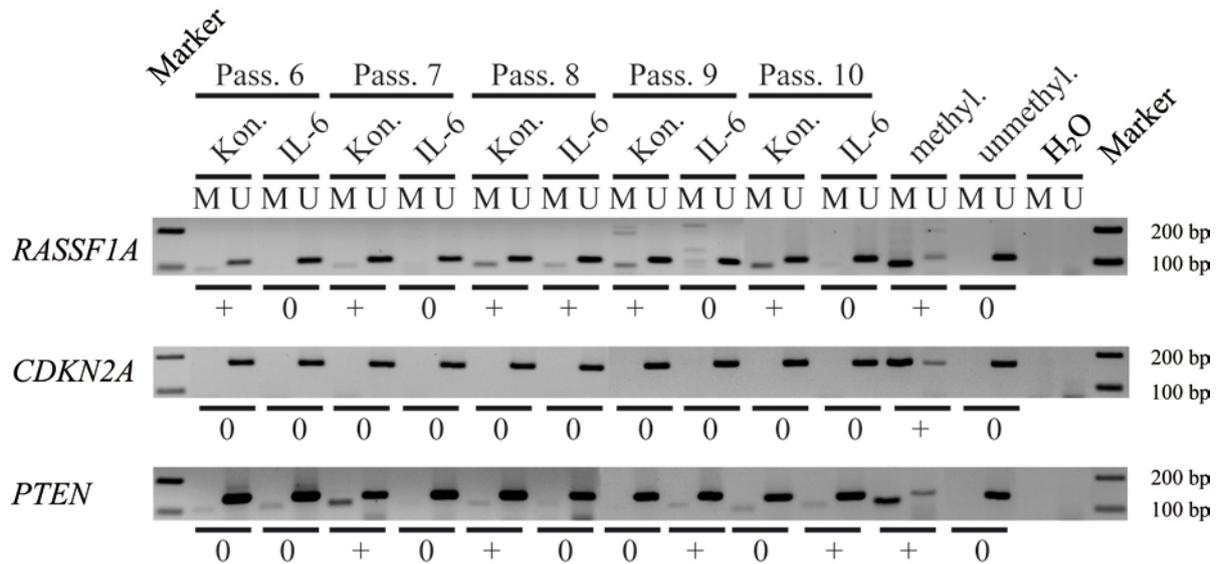


Abbildung 3-22: Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* (Passagen 6-10) in IL-6 supplementierten humanen Melanocyten. Aus IL-6 supplementierten humanen Melanocyten wurde nach zehn Passagen Kultivierungszeit, isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *CDKN2A*: 150 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A* 105 bp; *CDKN2A*: 151 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Pass.: Passage; Kon.: Kontrolle (unbehandelt); IL-6: IL-6 behandelt; 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet; *: zeigt das methylierte MSP Produkt bei *PTEN*; •: zeigt ein Nebenprodukt bei *PTEN*.

Die *methylation specific* PCR der mit IL-6 supplementierten normalen humanen Melanocyten zeigen in den Methylierungsmustern der drei Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* sehr heterogene Ergebnisse. Gezeigt sind jeweils die Passagen sechs bis zehn. Für *CDKN2A* konnten in den gesamten zehn Passagen nur unmethylierte Produkte in der jeweils rechten Spur (U) detektiert werden (Abb. 3-22).

Bei dem Tumorsuppressorgen *RASSF1A* wurde in jeder gezeigten Passage sowohl in der unbehandelten Probe (Kon.) also auch in der mit IL-6 supplementierten Probe ein unmethyliertes Produkt in der jeweils rechten Spur (U) detektiert. Zusätzlich treten in den unbehandelten Proben der Passagen sechs bis zehn methylierte Produkte auf. Diese Produkte besitzen eine leichte Tendenz sich mit steigender Passage zu verstärken. Dies wird besonders bei den Passagen acht bis zehn deutlich. Es wurden nur methylierte Produkte in IL-6 behandelten Zellen detektiert, die ebenfalls in der unbehandelten Kontrolle ein methyliertes Produkt aufwiesen (Abb. 3-22).

In den fünf gezeigten Passagen sechs bis zehn zeigen für das Tumorsuppressorgen *PTEN* alle Proben, sowohl die unbehandelten (Kon.) als auch die behandelten (IL-6) Proben, ein intensives Produkt in der jeweils unmethylierten rechten Spur (U). In den Passagen neun und zehn wird ein schwaches methyliertes Produkt (M) in den mit IL-6 behandelten Zellen detektiert, was in den unbehandelten Zellen nicht auftritt.

Weiter zeigte sich in den unbehandelten Proben (Kon.) der Passagen sieben und acht je ein methyliertes Produkt (Abb. 3-22).

Insgesamt wurden in humanen Melanocyten beim Tumorsuppressorgen *PTEN* in Passage neun und zehn sehr schwache methylierten Produkte detektiert. Jedoch aufgrund der intensiveren methylierten Bande der unbehandelten Zellen in Passage sieben werden diese schwachen Banden als nicht IL-6 spezifisch angesehen. Weiter wurden in den Tumorsuppressorgen *RASSF1A* und *CDKN2A* keine methylierten Produkte detektiert, die sich auf eine Supplementierung von IL-6 zurückführen lassen.

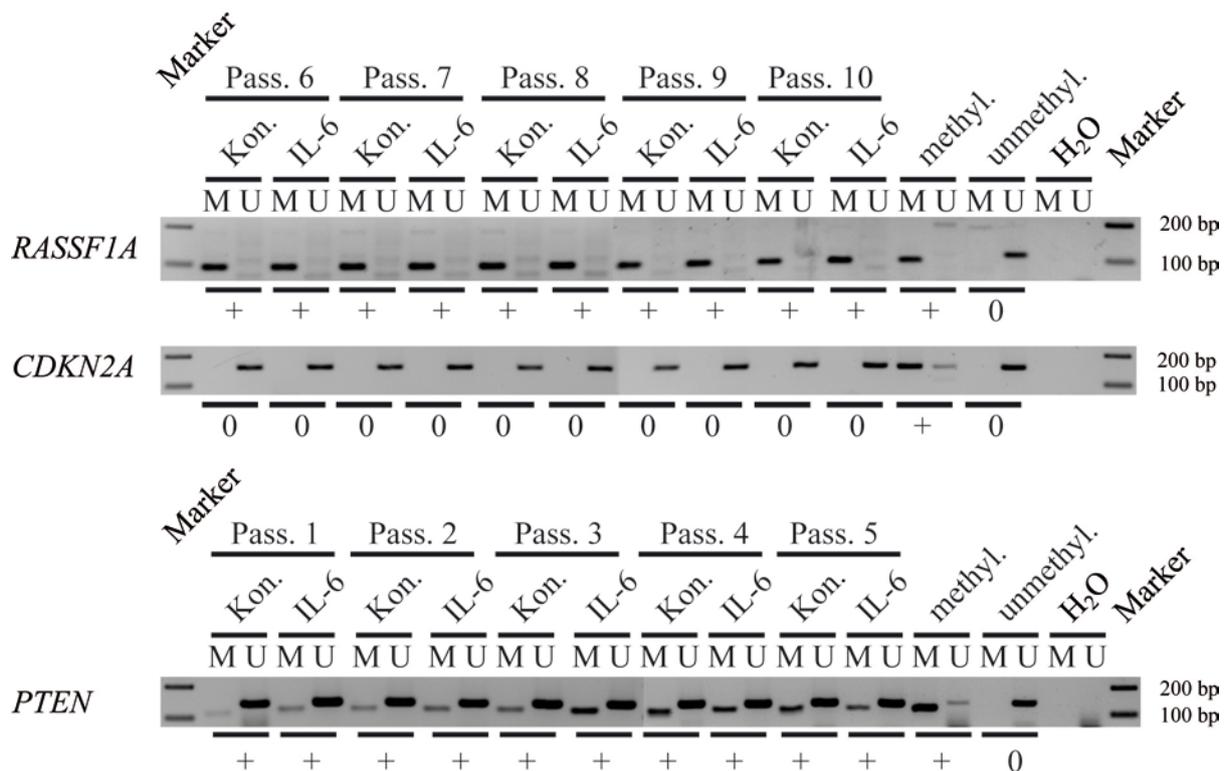


Abbildung 3-23: Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* (Passagen 6-10) und *PTEN* (Passagen 1-5) in IL-6 supplementierten Buff1280 Zellen. Aus IL-6 supplementierten Buff1280 Zellen wurde nach zehn Passagen Kultivierungszeit isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert. Dabei entspricht (M) dem methyliertem (*RASSF1A*: 93 bp; *CDKN2A*: 150 bp; *PTEN*: 117 bp) und (U) dem unmethyliertem (*RASSF1A* 105 bp; *CDKN2A*: 151 bp; *PTEN*: 135 bp) Produkt. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Wasser (H₂O) dient als Negativ-Kontrolle. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Pass.: Passage; Kon.: Kontrolle (unbehandelt); IL-6: IL-6 behandelt; 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet.

Die Methylierungsanalysen der Passagen sechs bis 10 der Supplementierung von IL-6 in Buff1280 Zellen von *RASSF1A* zeigen, dass *RASSF1A* in jeder Passage einen vollständig methylierten Promotor aufweist. Es sind nur Banden in der linken methylierten Spur (M) detektierbar. Die Methylierungsanalyse von *CDKN2A* zeigt, dass in allen Proben der Passagen sechs bis zehn, sowohl in den unbehandelten als auch den behandelten Proben, nur unmethylierte Bande (U) detektiert werden können (Abb. 3-23).

Beim Tumorsuppressorgen *PTEN* treten in jeder Probe der behandelten und unbehandelten Zellen sowohl unmethylierte als auch methylierte Produkte auf. Die unmethylierten Produkte haben in jeder Probe die gleiche Intensität und treten in jeder Probe der dargestellten Passagen auf (1 bis 5) (Abb. 3-23). Die Intensität der methylierten Produkte ist unterschiedlich. In jede Probe liegt der *PTEN* Promotor partiell methyliert.

Insgesamt sind alle Proben der behandelten bzw. unbehandelten Zellen in der untersuchten Promotorregion von *RASSF1A* ausschließlich methyliert und in der Promotorregion von *CDKN2A* komplett unmethyliert. Für das Tumorsuppressorgen *PTEN* sind die Proben partiell methyliert und weisen sowohl methylierte als auch unmethylierte Produkte auf, egal ob es sich dabei um behandelte oder unbehandelte Proben handelt. Lediglich in Passage drei ist ein deutlich intensiveres methyliertes Produkt in den IL-6 behandelten Zellen zu erkennen.

Um einen Einfluss auf den Methylierungsstatus in der behandelten Probe in Passage drei zu untersuchen wurde eine quantitative COBRA Analyse durchgeführt.

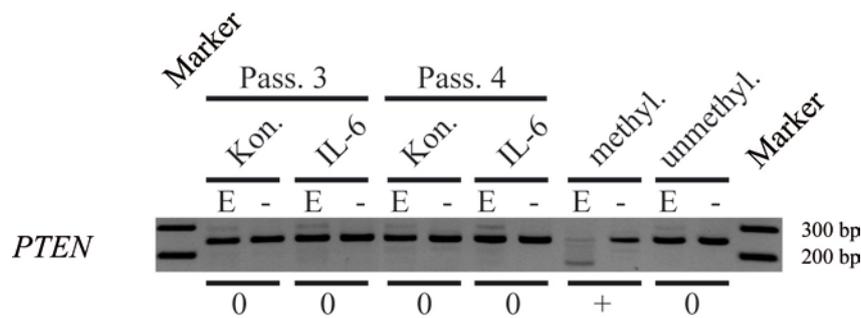


Abbildung 3-24: Ergebnisse der Methylierungsanalyse des Tumorsuppressorgens *PTEN* (Passagen 3 und 4) in IL-6 supplementierten Buff1280 Zellen. Aus IL-6 supplementierten Buff1280 Zellen wurde nach zehn Passagen Kultivierungszeit isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen- und methylierungsspezifischen Primerpaaren amplifiziert und mit der 5'-CpG-3' spezifischen Restriktionsendonuklease *Taq^I* gespalten. Dabei entspricht (E) dem mit *Taq^I* behandelten PCR Produkt (*PTEN*: 245 bp, *Taq^I*-Verdau-Produkte: 169, 12, 13, 12 und 39 bp) und (-) der unbehandelten *mock*-Restriktion. Zeigen sich in (E) Restriktionsprodukte wird die Probe als methyliert bewertet. Eine *in vitro* methylierte (methyl.) und eine unmethylierte (unmethyl.) DNA-Probe dienen als Methylierungskontrollen. Zur Auswertung wurden die Verdau-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp Marker aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Pass.: Passage; Kon.: Kontrolle (unbehandelt); IL-6: IL-6 behandelt; 0: Probe wurde als unmethyliert bewertet; +: Probe wurde als methyliert bewertet.

Um die unterschiedlichen Intensitäten der methylierten Produkte von *PTEN* in IL-6 behandelten Buff1280 Zellen in Passage drei (Abb. 3-23) auf einen Supplementierungseffekt von IL-6 zurückführen zu können, wurde für die Passage drei und vier eine COBRA Analyse durchgeführt.

In Abbildung 3-24 ist deutlich zu erkennen, dass weder die IL-6 behandelten (IL-6) noch die unbehandelten Kontrollzellen (Kon.) Verdau-Produkte zeigen und damit keine Promotormethylierung für *PTEN* aufweisen. Alle Verdau-Produkte weisen die gleiche Größe (245 bp) und Intensität auf. Die Positiv-Kontrolle (methyl.) zeigt hingegen deutlich das Verdau-Produkt mit der Größe von 169 bp.

Zusammenfassend wurde weder in den normalen humanen Melanocyten noch in den Buff1280 Melanomzellen eine durch IL-6 Supplementierung hervorgerufene Methylierung in den Tumorsuppressorgenen *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* detektiert.

4 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73* und die Virusanalysen der Polyomaviren MCPyV und SV40 in den untersuchten 230 malignen Melanomen (MM), den 98 Merkelzellkarzinomen (MCC), den 18 kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) sowie den Vergleichskontroll-Geweben (18 NZN-Gewebe und 26 Blutproben) diskutiert. Darüber hinaus werden die Zusammenhänge der klinisch pathologischen Charakteristika und die Auswirkungen auf den Methylierungsstatus der untersuchten exogenen und endogenen Einflüsse diskutiert.

4.1 Hypermethylierung von *RASSF1A* und *PTEN* im malignen Melanom

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* in den untersuchten malignen Melanomen diskutiert. Dabei lag *RASSF1A* in 12% ($p = 0,033$), *CDKN2A* in 22% ($p = 0,676$) und *PTEN* in 60% ($p < 0,001$) der Tumore in der Promotorregion methyliert vor (Tab. 3-2).

Dem Tumorsuppressorgen *RASSF1A* wird eine bedeutende Rolle bei der Tumorgenese des malignen Melanoms zugesprochen (Spugnardi *et al.*, 2003). Die Literaturangaben von 55% konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht verifiziert werden. Es wiesen lediglich 12% aller untersuchten Tumore eine Hypermethylierung auf ($p = 0,033$). Dieser Methylierungsgrad ist signifikant, liegt jedoch deutlich unter den Angaben der Literatur. Die mögliche Ursache dafür könnte die Herkunft des untersuchten Tumormaterials sein. Die Tumorproben der Studie von Spugnardi *et al.* aus dem Jahre 2003 stammen aus den USA, die Proben dieser Arbeit stammen aus Deutschland. In den USA erkrankten im Jahre 2002 33 von 100.000 Menschen am malignen Melanom und anderen Hautkrebsentitäten. In Deutschland waren es dagegen nur 8 von 100.000 Menschen (WHO). Das Risiko in den USA an Hautkrebs zu erkranken ist demzufolge ca. viermal so groß wie das Risiko in Deutschland. Einen ähnlich hohen Wert weist der Faktor auf, mit dem die Ergebnisse der Studie von Spugnardi *et al.* und die Ergebnisse dieser Arbeit differieren. So findet Spugnardi *et al.* 4,6x mehr *RASSF1A* Promotormethylierungen in amerikanischen Hautkrebstumoren als diese Arbeit in deutschen Tumorproben.

Dies deutet zum einen darauf hin, dass in den USA durch eine erhöhte Sonnenlichtexposition Hautkrebs vermehrt auftritt und zum anderen, dass durch diese erhöhte Sonnenlichtexposition vermehrt Tumore mit einer Promotormethylierung in Tumorsuppressorgenen entstehen. Weiter sprechen diese Befunde dafür, dass die energetische Qualität des Sonnenlichts in der westlichen Hälfte der USA sich von der in Deutschland erheblich unterscheidet. Diese Vermutung wird durch Satelliten gestützte globale UV Messungen bestätigt (Abb. 6-6). Der jährlichen Durchschnitt des UV-Index¹¹ ist in Los Angeles mit einem Wert von 6,3 mehr als doppelt so hoch wie der UV-Index in Berlin mit 3 (Quelle: Bundesamt für Strahlenschutz¹²). Zusammenfassend konnten die Methylierungsdaten früherer Studien nicht bestätigt, aber unter Berücksichtigung der Probenherkunft erklärt werden.

Das zweite untersuchte Tumorsuppressorgen, welchem ebenfalls eine Rolle bei der Tumorgenese des malignen Melanoms zugesprochen wird, ist der Zellzyklus Inhibitor *CDKN2A* (Straume *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde ein Methylierungsgrad von 22% detektiert. Dieser Prozentwert ist jedoch nicht signifikant, da in den Vergleichskontroll-Geweben ein ähnlich hoher Prozentsatz der Proben methyliert vorlag. Daher kann nichts über die Tumorspezifität für das maligne Melanom ausgesagt werden. Jedoch spielen Deletionen und Mutationen des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* in der Karzinogenese von vielen Tumoren eine Rolle (Nobori *et al.*, 1994). So treten im Pankreas Adenokarzinom häufig Deletionen und homozygote Mutationen auf (Bartsch *et al.*, 1995; Caldas *et al.*, 1994).

Innerhalb des PKB/AKT Signalweges übernimmt *PTEN* die Funktion eines Tumorsuppressorgens (Carnero, 2010). Ein aktives Protein verhindert die Zellmigration und Zellteilung. Durch eine Inaktivierung von *PTEN* kommt es zu einer Erhöhung des Phosphatidylinosit-3, 4, 5-triphosphat (PIP3), welches jedoch von einem aktiven PTEN zu PIP2 dephosphoryliert wird. PIP3 aktiviert die Proteinkinase B. Durch die Inaktivierung von PTEN entsteht eine Erhöhung von PIP3 und somit eine Erhöhung von Proteinkinase B. Diese Kinase hemmt den Eintritt in die Apoptose. Daher sind Zellen mit inaktivierten PTEN unfähig in die Apoptose einzugehen (Carnero, 2010; Di Cristofano and Pandolfi, 2000). Die Methylierungsanalysen der Promotoreregionen im malignen Melanom wiesen eine auffallend hohe höchst signifikante Hypermethylierung 60% ($p < 0,001$) des Tumorsuppressorgens *PTEN* auf, wobei das NZN-Gewebe mit 11% ebenfalls eine Methylierung aufweist. Jedoch liegt diese deutlich unter der Methylierungsrate der Tumorproben. In den Blutproben wurde keinerlei Methylierung detektiert.

In der Literatur wird eine vermehrte epigenetische Inaktivierung von des *PTEN* Promotors mit 62% bei Melanom-Patienten beschrieben (Mirmohammadsadegh *et al.*, 2006). Daher bestätigen die eruierten Ergebnisse die Literaturangaben. Des Weiteren ist eine verminderte Expression von *PTEN* sehr häufig in malignen Melanomen zu finden (Goel *et al.*, 2006; Mikhail *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2000). Ein Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung von *PTEN* und dessen Expression

¹¹ UV-Index: Der UV-Index (abgekürzt: UVI) ist ein Maß für die höchste sonnenbrandwirksame Bestrahlungsstärke, die von der Sonne während des Tages auf einer horizontalen Fläche hervorgerufen wird (BfS).

¹² Quelle: Bundesamt für Strahlenschutz (BfS) http://www.bfs.de/de/uv/uv_messnetz/uvi/world.html

konnte anhand von immunhistologischen Analysen verifiziert werden (Abb. 6-5). Daher ist anzunehmen, dass *PTEN* eine besondere Rolle in der Tumorgenese des malignen Melanoms zukommt.

4.1.1 Erhöhte *PTEN* Methylierung durch Sonnenexposition korreliert negativ mit der Überlebenswahrscheinlichkeit

Durch die lückenlosen Nachsorgedaten der Patienten nach den Resektionen der malignen Melanome war es möglich, für verschiedene klinisch-pathologische Daten sowie für die Methylierungsdaten den Einfluss auf das Überleben zu bestimmen. Dazu wurden Kaplan-Meier Überlebensanalysen sowie uni- und multivariate Cox-Regressionen durchgeführt (Abb. 3-6; Tab. 3-3 und 3-4).

Es konnte für eine Reihe der klinisch-pathologischen Parameter ein signifikanter Zusammenhang mit der Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. dem Rezidiv-freien-Überleben festgestellt werden. So hängen die Parameter der Tumordicke ($p < 0,001$), des Tumordurchmessers ($p < 0,001$), der Ulzeration ($p < 0,001$) und dem Mitoseindex ($p = 0,001$) mit der Überlebenswahrscheinlichkeit zusammen (Tab. 6-8). Es kann davon ausgegangen werden, dass ein aggressiver Tumor mit einem starken Dicken- und Tiefenwachstum ein schnelles Wachstum besitzt und daher eine hohe Mitoserate aufweist. Genauso hängt die Tumordicke offenkundig damit zusammen, dass ein Tumor ulzeriert, also die *Stratum basale* durchbricht. Ist ein Tumor ulzeriert, kommt es schnell zur Metastasenbildung (Poste and Fidler, 1980) und dadurch zu einer schlechteren Überlebensprognose. Daher ist ebenso nachzuvollziehen, dass das SSM (oberflächlich spreitendes Melanom) verglichen mit der Gesamtheit aller untersuchten Tumore im Gegensatz zum NMM (noduläres malignes Melanom) eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweist, da es oberflächlich wächst und deswegen nicht so stark ulzeriert wie das NMM (Abb. 6-8) ($p < 0,001$). Die gleichen Argumente gelten auch in Bezug auf das Rezidiv-freie-Überleben. Je größer der Tumor, umso tiefer wächst er auch und ulzeriert schneller, so dass nach einer Resektion das Rezidiv-freie-Überleben umso kürzer ist, desto dicker und größer der Tumor zum Zeitpunkt der Resektion war.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt, umso älter der Patient zum Zeitpunkt der Resektion war (Tab. 6-8) ($p < 0,001$). Umso so älter ein Patient ist, umso geringer ist die Regenerations- und Heilungsfähigkeit (Pschyrembel, 2007). Ein älterer Patient, dem ein Tumor entfernt wird, hat größere Schwierigkeiten die Läsion zu regenerieren als ein jüngerer Patient. Zudem wird ein älterer Patient aufgrund der abnehmenden Selbstheilungskräfte wahrscheinlich bereits Metastasen gebildet haben, welches die Überlebenswahrscheinlichkeit weiter herabsetzt (von Figura and Lenhard Rudolph, 2009). Die genannten klinisch-pathologischen Parameter des Tumordurchmessers, der Tumordicke, der Mitoserate und des Alters wurden darüber hinaus durch eine multivariate Cox Regression als unabhängige Faktoren identifiziert (Tab. 3-4), bilden also wichtige unabhängige Prognosefaktoren für die Überlebenswahrscheinlichkeit des malignen Melanoms.

Sehr interessant ist der Befund, dass Männer eine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als Frauen (Abb. 3-6 d; $p = 0,019$). Es wurde zwar berichtet, dass das Plattenepithelkarzinom bei Männern dreimal häufiger auftritt als bei Frauen (Hall *et al.*, 1997), dies mag jedoch zum einen an den unterschiedlichen Freizeitbekleidungsgehnheiten und der Lebensweise liegen und zum anderen an der fehlenden Lichtschutzsorgfalt der männlichen Bevölkerung (Hall *et al.*, 1997; McCarthy *et al.*, 1999). Dass eine unterschiedliche Lebensweise nicht der Grund für eine unterschiedliche Tumorgenese und damit Sterblichkeit der beiden Geschlechter ist, wurde durch Befunde von Thomas-Ahner *et al.* 2007 entkräftet. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei gleicher chronischer UV-B Bestrahlung die Männchen trotzdem früher und mehr Tumore ausbilden als die Weibchen (Thomas-Ahner *et al.*, 2007). Dies weist auf signifikante Unterschiede in der Tumorgenese von UV-B induzierten Tumoren zwischen den Geschlechtern im Mausmodell hin. Thomas-Ahner *et al.* 2007 zeigte, dass dieser Unterschied durch unterschiedliche Konzentrationen von Antioxidantien zurückzuführen war. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied der Auswirkungen auf das Überleben in UV-B induzierter malignen Melanome beim Menschen beobachtet werden (Tab. 3-6 c und b), so dass die genannte Studie ebenso auf den Menschen übertragbar ist.

Ebenso deutet die Lokalisierung der Tumore an den Akren auf eine UV Abhängigkeit hin. Tritt ein Tumor an den Akren auf, ist die Überlebenswahrscheinlichkeit geringer, als wenn er an anderen Körperstellen lokalisiert ist. Die Akren sind als äußere Körperenden definiert (sprich Ohren, Nasenspitze, Jochbein, Kinn, Finger und Zehen). Diese Stellen sind meist sonnenexponierte Körperregionen und deuten so einen Zusammenhang zwischen der Sonneneinstrahlung und der Aggressivität des malignen Melanoms an. Diese Andeutung wird dadurch bekräftigt, dass Tumore, die eine starke, durch UV-Licht ausgelöste, basophile Degeneration aufweisen, ebenfalls mit einer höheren Sterblichkeitsrate korrelieren (Abb. 3-6 c; $p = 0,035$).

Zusätzlich korrelierte eine starke basophile Degeneration mit der Hypermethylierung des Tumorsuppressorgens *PTEN* ($p = 0,011$) und weiter korrelierte die ebenso sonnenexponierte Stellen beschreibende TANS (*thorax, upper arm, neck, scalp*) Lokalisierung mit einer Methylierung von *PTEN* ($p = 0,043$). Die TANS Lokalisierung bezieht ähnlich der akralen Lokalisierung die sonnenexponierten Körperregionen des Oberkörpers, des Oberarms, des Hals und Kopfes ein. Zusammengenommen zeigen diese Korrelationen, dass eine UV-Bestrahlung direkt mit einer Methylierung der Promotorregion von *PTEN* zusammenhängt. Die Bedeutsamkeit eines inaktivierten *PTEN* Tumorsuppressorgens im malignen Melanom wird nochmals durch eine verminderte Überlebenswahrscheinlichkeit unterstrichen. So ist in der vorliegenden Arbeit eine *PTEN* Methylierung als unabhängiger Faktor für das Auftreten des malignen Melanoms identifiziert worden (Lahtz *et al.*, 2010). Die Sterblichkeitsrate ist bei Patienten mit einem methylierten *PTEN* Promotor um 75% erhöht (Tab. 3-4; $p = 0,014$).

Das bedeutet abschließend, dass die Promotorregion von *PTEN* vermehrt in Tumoren methyliert ist, die eine basophile Degeneration aufweisen und an sonnenexponierten Stellen lokalisiert sind. Dies führt zu der These, dass im malignen Melanom eine Methylierung des *PTEN* Promotors durch UV Strahlung herbeigeführt werden kann. Diese These wird unter Berücksichtigung experimenteller Daten unter 4.5.2 weiter diskutiert.

4.1.2 Kein Einfluss von UV Licht auf die *BRAF* Mutagenese im malignen Melanom

Insgesamt wurde in 67% der untersuchten Melanome eine *BRAF* Mutation detektiert (Tab. 6-2), wobei eine Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse keinen signifikanten Zusammenhang ergab. Dies wurde in früheren Studien bereits publiziert (Akslen *et al.*, 2005). Daher entspricht das gefundene Ergebnis dem bisherigen wissenschaftlichen Kenntnisstand und unterstreicht abermals die korrekte Handhabung der verwendeten Analysen. Allerdings widersprechen die gewonnenen Daten in dem Punkt, dass ein Einfluss von UV Licht auf die *BRAF* Mutagenese besteht (Besaratinia and Pfeifer, 2008). So wurde zwischen der basophilen Degeneration, die eine UV Schädigung der Haut darstellt, und einer Mutation in *BRAF* (T>A) im Gegensatz zu Besaratinia und Pfeifer eine negative Korrelation festgestellt ($p = 0,004$) (Lahtz *et al.*, 2010). Diese Ereignisse hängen demzufolge nicht zusammen und schließen sich sogar aus. Weiter wurde kein Zusammenhang zwischen einer *BRAF* Mutation und der TANS Lokalisierung gefunden, wie dies im Gegensatz bei einer *PTEN* Hypermethylierung der Fall ist. Weiterhin wurde zwischen der basophilen Degeneration und einer Mutation in *BRAF* eine negative Korrelation festgestellt. Daher weisen die Daten zusammengenommen darauf hin, dass eine Mutation von *BRAF* (T>A) unabhängig von UV Licht entsteht.

Ulzerierte Melanome haben im Vergleich zu den nicht ulzerierten Melanomen einen signifikant höheren Anteil an *BRAF* Mutationen ($p = 0,006$). Sie schließen sich gegenseitig aus ($p = 0,004$) (Lahtz *et al.*, 2010).

Ebenfalls wurde im Gegensatz zur Literatur kein Synergie-Effekt zwischen einer *BRAF* Mutation und einer *RASSF1A* Hypermethylierung gefunden (Reifenberger *et al.*, 2004). Auch hier muss darauf verwiesen werden, dass in dieser Studie sehr umfangreiches Tumormaterial zur Verfügung stand. Reifenberger *et al.* hat diesen Synergie-Effekt in einer Grundlage von nur 17 Tumoren festgestellt. Das Tumormaterial dieser Arbeit übertraf mit 217 das Material von Reifenberger um das 12,8fache. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Synergie-Effekt durch die geringe Stichprobengröße in Erscheinung tritt.

4.2 Hypermethylierung von *RASSF1A* im Merkelzellkarzinom

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73* in den untersuchten Merkelzellkarzinomen diskutiert. Dabei lag *RASSF1A* in 51% ($p < 0,001$), *CDKN2A* in 22% ($p = 0,782$), *PTEN* in 5% ($p = 1$), *FHIT* und *TP73* in keinem und *PTPRG* in 4% der Tumore in der Promotorregion methyliert vor (Tab. 3-2).

Die Methylierungsanalysen der Tumorsuppressorgene zeigten eine starke Hypermethylierung des *RASSF1A* Promotors mit 51% ($p < 0,001$) (Tab. 3-2) (Lahtz *et al.*, 2009a). Diese Methylierung ist höchst signifikant, da keine Methylierungen im *RASSF1A* Promotor in allen Vergleichskontroll-Geweben gefunden wurden. Von einem ebenso hohen Wert einer *RASSF1A* Methylierung wurde bereits in der Literatur im malignen Melanom mit 55% berichtet. Die eigens vorher beschriebenen und untersuchten malignen Melanome ergaben einen Methylierungsgrad von 12% (Lahtz *et al.*, 2010). Sehr hohe Methylierungsgrade (94%) sind beim kleinzelligen Lungenkarzinom zu finden (Lahtz *et al.*, 2009b; Richter *et al.*, 2009). Trotz dieser höchst signifikanten *RASSF1A* Promotor-Hypermethylierung und der höchst signifikanten viralen Infektion von dem neuentdeckten Merkelzellpolyomavirus konnte kein Zusammenhang zwischen der Methylierung und der Infektion gefunden werden, wie es bei dem Polyomavirus SV40 bekannt ist (Hachana *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2005; Toyooka *et al.*, 2001a). Auf diese Unabhängigkeit deuten auch drei MCCs (MCC: 14.1; 76.1; 78.1; Tab. 6-4) hin. Bei diesen Tumoren konnte keine virale Infektion von MCPyV nachgewiesen werden, jedoch weisen sie eine Hypermethylierung des Promotors auf. Diese Daten zeigen, dass der Mechanismus der Promotormethylierung von *RASSF1A* unabhängig von der Infektion des MCPyV stattfinden kann. Das zweite Tumorsuppressorgen, das einen erhöhten Methylierungsgrad im Promotorbereich aufwies, war der Zellzyklus Inhibitor *CDKN2A*. Der Zellzyklus Inhibitor *CDKN2A* liegt in Tumoren häufig inaktiviert vor (Herman *et al.*, 1995; Nobori *et al.*, 1994). In 22% der untersuchten MCCs konnte eine Hypermethylierung festgestellt werden. Jedoch ist dieses Ergebnis nicht signifikant, da in den Vergleichskontroll-Geweben mit 19% im NZN-Gewebe und mit 17% in den Blutproben nur leicht geringere Werte detektiert wurden (Tab. 3-2). Daher entspricht das Ergebnis des Methylierungsgrades in den MCC dem normalen Methylierungsgrad und ist nicht tumorspezifisch. Im Gegensatz dazu berichtet Lassacher *et al.*, dass eine *CDKN2A* Promotormethylierung in 5% aller MCC auftritt. Die Schlussfolgerung, dass *CDKN2A* im MCC tumorspezifische Eigenschaften besitzt, kann in der Arbeit von Lassacher *et al.* nicht mit Sicherheit gezeigt werden, da keine Vergleichskontroll-Gewebe und nur 18 MCCs analysiert wurden (Lassacher *et al.*, 2008). Dies bedeutet, dass Lassacher *et al.* eine Methylierung in nur einem MCC detektiert hat. Ohne Vergleichskontroll-Gewebe kann von so einem wenig aussagekräftigen Ergebnis nicht auf einen generellen 5%igen Methylierungsgrad geschlossen

werden. Daher ist zusammenfassend anzunehmen, dass *CDKN2A* im Merkelzellkarzinom nicht vermehrt methyliert ist.

Von den beiden Tumorsuppressorgenen *TP73* und *FHIT* wurde beschrieben, dass genetische Veränderungen für eine Inaktivierung im MCC eine Rolle spielen (Sozzi *et al.*, 1996; Van Gele *et al.*, 2000). Jedoch wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Methylierung in der Promotorregion der beiden Tumorsuppressorgene detektiert. Auch in den Vergleichskontroll-Geweben konnte im Fall von *TP73* keine Methylierung gefunden werden. Im Fall von *FHIT* wurde in den Vergleichskontroll-Geweben jedoch ein Methylierungsgrad von je 18% detektiert (Tab. 3-2). Daher könnte eher von einer Hypomethylierung von *FHIT* im MCC gesprochen werden. Um dies allerdings mit letzter Sicherheit aussagen zu können, müssen mehr Vergleichskontroll-Gewebe auf den Methylierungsgrad von *FHIT* analysiert werden. Daher deuten die Ergebnisse an, dass *TP73* und *FHIT* nicht durch eine Hypermethylierung der Promotorregion inaktiviert werden.

Das Gen *protein tyrosine phosphatase receptor type G (PTPRG)* ist ein putatives Tumorsuppressorgen. Es wurden Hypermethylierungen von *PTPRG* im malignen Melanom und im kutanen T-Zell Lymphom gefunden (Furuta *et al.*, 2006; van Doorn *et al.*, 2005). Feng *et al.* hat gezeigt, dass in zwei Fällen das MCPy Virus in dieses Gen integriert und somit einen Funktionsverlust herbeiführt (Feng *et al.*, 2008). In dieser Arbeit lagen nur in Paraffin eingebettete MCCs vor. Deswegen stand zu wenig DNA zur Verfügung, um die *southern blot* Analysen von Feng *et al.* zu verifizieren. Stattdessen wurde der Methylierungsstatus von *PTPRG* untersucht und analysiert, ob eine Hypermethylierung des Gens für die Pathogenese des MCC ebenfalls eine Relevanz besitzt. Insgesamt wurde nur in 4% der untersuchten MCCs eine Hypermethylierung gefunden bei einer völlig ausbleibenden Methylierung in allen Vergleichskontroll-Geweben (Tab. 3-2). Mit 4% muss allerdings eine Hypermethylierung von *PTPRG* als signifikantes Ereignis in der Pathogenese des MCC ausgeschlossen werden. Dies trifft ebenfalls auf eine Hypermethylierung von *PTEN* zu, das mit 5% in der Größenordnung von *PTPRG* liegt. Im Merkelzellkarzinom spielt *PTEN* im Gegensatz zum malignen Melanom ebenfalls keine relevante Rolle.

4.3 Hypermethylierung von *RASSF1A* im kleinzelligen Lungenkarzinom

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* in den untersuchten kleinzelligen Lungenkarzinomen diskutiert. Dabei lag *RASSF1A* in 94% ($p < 0,001$), *CDKN2A* in 56% ($p = 0,006$) und *PTEN* in 35% ($p = 0,005$) der Tumore in der Promotorregion methyliert vor (Tab. 3-2). Das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) ist wie das maligne Melanom und das Merkelzellkarzinom eine sehr aggressive neuroendokrine

Tumorentität mit einer hohen Mortalität (Iannuzzi and Scoggin, 1986). Interessanterweise zeigt das MCC genetische Veränderungen, die mit denen des SCLC vergleichbar sind (Popp *et al.*, 2002; Van Gele *et al.*, 2004; Van Gele *et al.*, 1998). Daher wurde angenommen, dass die Pathogenese in ähnlicher Weise verlaufen könnte.

Wie die anderen neuroendokrinen Tumore wurde auch das kleinzellige Lungenkarzinom Methylierungsanalysen unterzogen. Aus der Literatur ist bekannt, dass das SCLC in dem Tumorsuppressorgen *RASSF1A* hohe Methylierungsgrade aufweist (Dammann *et al.*, 2000; Dammann *et al.*, 2001; Toyooka *et al.*, 2001b). In den untersuchten SCLCs konnte ein sehr hoher höchst signifikanter Methylierungsgrad von 94% ($p < 0,001$) der Promotorregion von *RASSF1A* detektiert werden (Lahtz *et al.*, 2009b). Damit wurden die Angaben der Literatur bestätigt, was wiederum als Maß für die Richtigkeit der evaluierten Daten spricht. Es kann abermals gezeigt werden, dass sich der Methylierungsgrad von *RASSF1A* für die Lungenkrebsdiagnostik eignet (Grote *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007b).

Des Weiteren wurde eine Hypermethylierung im Zell-Zyklus-Inhibitor *CDKN2A* mit 56% ($p = 0,006$) detektiert. Dies bestätigt ebenfalls Literaturangaben (Toyooka *et al.*, 2001b). Der Wert von 56% ist trotz des Auftretens von *CDKN2A* Methylierungen im Vergleichskontroll-Gewebe im Gegensatz zum malignen Melanom und dem MCC signifikant. Insgesamt bestätigen die Daten den derzeitigen Wissenstand über epigenetische Inaktivierungen der untersuchten Tumorsuppressorgene im SCLC.

4.4 Virusanalysen in neuroendokrinen Tumoren

Es ist bekannt, dass eine virale Infektion in humanen Zellen zu Krebs führen kann (Peltecu *et al.*, 2009; zur Hausen *et al.*, 1975) und dass eine Infektion des Polyomavirus SV40 mit dem Auftreten einer Hypermethylierung der Promotorregion des Tumorsuppressorgens *RASSF1A* im malignen Mesotheliom, in Prostata- und Brustkrebs korreliert (Hachana *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005; Toyooka *et al.*, 2001a). *RASSF1A* ist ein bedeutendes Beispiel für ein epigenetisch reguliertes Tumorsuppressorgen. Es reguliert den Zellzyklus und Apoptose (Richter *et al.*, 2009). Vor kurzem wurde im neuroendokrinen Merkelzellkarzinom ein neuer Polyomavirus identifiziert. Die virale Präsenz dieses Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) wurde in 80% der untersuchten Tumore detektiert (Feng *et al.*, 2008).

Um die virale Präsenz der Polyomaviren des neuentdeckten Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) und des *Simian virus 40* (SV40) zu analysieren, wurden PCRs durchgeführt, die einen Teil des viralen Genoms amplifizieren. Zusätzlich wurden die Virusanalysen in normalen und nicht-entarteten Gewebe durchgeführt und anschließend mit den Ergebnissen der Tumore statistisch verglichen.

4.4.1 Präsenz des Merkelzellpolyomavirus im malignem Melanom, Merkelzellkarzinom und kleinzelligem Lungenkrebs

Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit im malignen Melanom in 35% ($p = 0,001$), im Merkelzellkarzinom in 92% ($p < 0,001$) und im kleinzelligen Lungenkarzinom in 39% der untersuchten Tumore eine virale Präsenz des Merkelzellpolyomavirus detektiert (Lahtz *et al.*, 2009a). Eine virale Präsenz des SV40 Virus konnte weder in den untersuchten Merkelzellkarzinomen noch in den kleinzelligen Lungenkarzinomen gefunden werden.

In den untersuchten 98 MCCs wiesen 92% eine virale Infektion des MCPyV auf ($p < 0,001$) (Tab. 3-6). Damit liegt die gefundene Infektionsrate um 12% höher als die von Feng *et al.* gezeigte. Dieser Unterschied lässt sich jedoch leicht damit erklären, dass in der Studie nur zehn Merkelzellkarzinome analysiert wurden, während in dieser Arbeit etwa das Zehnfache an Tumoren zur Verfügung stand. Weiter wurde in dem als Vergleichskontroll-Gewebe verwendeten Nävuszellnävus-Gewebe eine 17%ige und in den verwendeten Blutproben eine 4%ige virale Infektionsrate detektiert. Diese Werte entsprechen ebenfalls den Ergebnissen von Feng *et al.* Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das MCPyV eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des MCC darstellt.

Wegen des hohen Potentials der Polyomaviren Krebs auszulösen, wurde zusätzlich in den MCCs die virale Infektion des SV40 Polyomavirus analysiert. Jedoch wurde in keinem einzigen MCC oder einem verwendeten Vergleichskontroll-Gewebe eine virale Infektion von SV40 gefunden.

Virusanalysen der SCLC Tumore ergaben, dass 39% der Tumore mit dem MCPyV infiziert sind (Tab. 3-6; $p = 0,01$). Die Infektionsraten des Vergleichskontroll-Gewebes entsprechen den bereits weiter oben erwähnten. Eine Infektion von SV40 konnte nicht detektiert werden. Damit liegt die Infektionsrate im SCLC mit 39% um 53% niedriger als im MCC mit 92%. Das Ergebnis liegt ebenfalls unter der europäischen Durchschnittsinfektionsrate mit 77-85% im MCC (Becker *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2008; Kassem *et al.*, 2008). Obwohl es sich bei beiden Tumorentitäten um neuroendokrine Tumore handelt, scheinen die Krebsursachen doch nicht völlig identisch zu sein. Dies könnte daraus resultieren, dass die Hauptursache für das SCLC im Tabakkonsum und dadurch bedingte chronische Entzündungen zu suchen ist (Doll and Hill, 1952). Würde diese Ursache ausgeschlossen werden können, könnte sich der Anteil an infizierten Tumoren eventuell erhöhen. Aufgrund der hohen Mortalität des SCLC stehen jedoch nur wenige Gewebeproben dieser Tumorentität zur Verfügung, da selten überhaupt eine Resektion vorgenommen wird. Daher stehen sehr wenige Tumore für Studien zur Verfügung, in denen die Ursache nicht im Tabakkonsum liegen kann. So muss für weitere Studienzwecke im Hinblick auf eine MCPyV Infektion eine genügend große Menge SCLCs von Nichtrauchern analysiert werden. Interessanterweise liegt der Anteil der MCPyV Infektion im SCLC (39%; $p = 0,01$) in einer ähnlichen Größenordnung wie die MCPyV Infektionsrate im malignen Melanom vor (35%; Tab. 3-6; $p = 0,001$). Das maligne Melanom ist ebenfalls ein neuroendokriner Tumor. Da die Hauptursache des malignen Melanoms in der

Sonnenlichtexposition liegt (Berking, 2005) und die Hauptursache des SCLC im Tabakkonsum (Doll and Hill, 1952), verhalten sich diese beiden Tumorentitäten in Bezug auf eine virale Infektion des MCPy Virus geradezu identisch. Daher deuten die Ergebnisse dieser Arbeit an, dass eine Infektion des MCPy Virus eine Rolle in der Pathogenese von SCLC und dem malignen Melanom spielen kann. Es sind noch Verifizierungen nötig, bevor mit Sicherheit dem MCPy Virus eine Rolle für die Tumorgenese zugesprochen werden kann.

Wie oben erwähnt konnte im SCLC keine virale Infektion des Polyomavirus SV40 detektiert werden. Aufgrund von Literaturangaben ist bekannt, dass eine Infektion mit SV40 mit einer Hypermethylierung von *RASSF1A* assoziiert sein kann (Hachana *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2005; Toyooka *et al.*, 2001a). Da keine SV40 Infektion im untersuchten Tumorgewebe gefunden wurde, konnte keine Assoziation zwischen einer *RASSF1A* Methylierung und SV40 Infektion festgestellt werden. Genauso konnte keine Assoziation zwischen einer viralen Präsenz des MCPyV und einer *RASSF1A* Hypermethylierung festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die epigenetische Stilllegung von *RASSF1A* nicht notwendigerweise aufgrund einer MCPyV Infektion stattfindet.

4.5 Endo- und exogene methylierende Noxen

4.5.1 *LMP-1* und *DNMT3b4* zeigen keine Auswirkungen auf den Methylierungsstatus

Insgesamt wurde in *LMP-1* transient transfizierten IGR-I Zellen keine Auswirkung auf den Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* festgestellt (Abb. 3-12). Weiterhin zeigten die durchgeführten *semi*-quantitativen Expressionsassays (sqRT-PCR) im Vergleich zur Vektorkontrolle keine Veränderungen der Expressionen für *RASSF1A*, *PTEN*, das Cytokin IL-6 und die Methyltransferase *DNMT1* (Abb. 3-13).

Das virale Onkoprotein LMP-1 ist membranständig, dabei besteht die Transmembrandomäne aus sechs Segmenten. Das Protein besteht aus 386 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 63.kDa (Li and Chang, 2003). Über die Transmembrandomäne kommt es in der Membran zu einer Oligomerisierung mehrerer LMP-1 Proteine (Floettmann and Rowe, 1997; Gires *et al.*, 1997). Dies führt ohne Liganden zu einer dauerhaften Aktivierung von LMP-1. Jedoch muss ein regulierter Abbau von LMP-1 erfolgen (Aviel *et al.*, 2000), da es in zu hoher Konzentration für die Zelle zytotoxisch ist (Hammerschmidt *et al.*, 1989). LMP-1 hat allgemein mitogene (Dirmeier *et al.*, 2005), antiapoptotische (Eliopoulos and Young, 2001) und antiseneszente Eigenschaften (Yang *et al.*, 2004). Die antiseneszente Eigenschaft entsteht unter anderem durch eine Verminderung der Expression des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* (Yang *et al.*, 2000). Man *et al.* hat experimentell gezeigt, dass das

Onkoprotein LMP-1 des Epstein-Barr Virus in der Lage ist den Promotor von *RASSF1A* zu inaktivieren (Man *et al.*, 2007). Dazu verwendete Man *et al.* eine mit LMP-1 stabil transfizierte immortalisierte Nasopharynx-Epithelzelllinie (Lo *et al.*, 2003; Tsao *et al.*, 2002). Das Nasopharyngeal Karzinom besitzt eine positive Assoziation mit einem hypermethyliertem *RASSF1A* Promotor und einer Infektion des Epstein-Barr Virus (Zhou *et al.*, 2005). Diese Auswirkung des Onkoproteins LMP-1 auf den Methylierungsstatus von *RASSF1A* konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Eine weitere Eigenschaft des LMP-1 Proteins ist die Induktion einer IL-6 Produktion über die Aktivierung des p38MAP-Kinase Signalweges (Eliopoulos *et al.*, 1999). Auch diese Eigenschaft von LMP-1 konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Grund für diese Ergebnisse kann in der Beschaffenheit der verwendeten Zelllinie begründet sein. In dieser Arbeit wurde für die transiente Transfektion von *LMP-1* die Zelllinie einer Melanommetastase (IGR-I) verwendet. Man *et al.* verwendete für seine Experimente eine immortalisierte asiatische Nasopharynx-Epithelzelllinie. Dieses Gewebe scheint eine besondere Präferenz gegenüber den Transformationseigenschaften des Onkoproteins LMP-1 des Epstein-Barr Virus zu besitzen, da das Nasopharynxkarzinom in Asien mit einer Inzidenz von 30/100.000 Einwohnern auf tritt. Im Gegensatz dazu ist die Inzidenz in Mitteleuropa und Nordamerika nur 0,5 bis 1/100.000 Einwohner (Titcomb, 2001). 80 bis 90% der Patienten in Asien besitzen Antikörper gegen den Epstein-Barr Virus (Vasef *et al.*, 1997). Somit ist der Grund für die hohe Nasopharynxkarzinom-Häufigkeit in Asien eine Infektion des Epstein-Barr Virus (EBV) und die asiatische Bevölkerung scheint zudem gegenüber dieser Krankheit besonders anfällig zu sein (Vokes *et al.*, 1997). Daher könnte der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeit und der von Man *et al.* in diesen Unterschieden begründet sind.

Die transiente Transfektion von IGR-I Zellen mit der Methyltransferase $\Delta DNMT3b4$ zeigen weder eine Auswirkung auf den Methylierungsstatus der untersuchten Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *PTEN* (Abb. 3-14) noch eine Veränderung der Expression von *RASSF1A*, *PTEN*, dem Cytokin IL-6 und der Methyltransferase *DNMT1* im Vergleich zur Vektorkontrolle in den *semi*-quantitativen Expressionsassays (sqRT-PCR) (Abb. 3-15).

Stabil transfizierte Zellen eines Klons zeigen ebenfalls keine Veränderung des Methylierungsstatus von *RASSF1A* und *PTEN* (Abb. 3-16). Jedoch wurde eine verstärkte Expression von *RASSF1A* und *IL-6* im Vergleich zu der Vektorkontrolle festgestellt (Abb. 3-17). *PTEN* und *IL-6* zeigen in diesem Expressionsassay im Vergleich zur Vektorkontrolle eine detektierbare Zunahme des jeweiligen Produktes (Abb. 3-17).

Die DNA-Methyltransferasen sind essentiell für die normale embryonale Entwicklung von Säugetieren und für die Regulierung des *imprinting* und der X-Chromosominaktivierung (Robertson and Wolffe, 2000; Surani, 1998). Die *de novo* Methyltransferasen DNMT3a und 3b legen während der Embryonalentwicklung das Methylierungsmuster für die jeweiligen Gene fest. Dieses

Methylierungsmuster wird von der *maintenance* Methyltransferase DNMT1 über die Zellteilungen der somatischen Zellen erhalten (Bestor, 2000; Jeltsch, 2002). Eine Unterfamilie der Methyltransferase *DNMT3b* sind ihre alternativen *splice*-Varianten, die sog. *ΔDNMT3bs*, bestehend aus *ΔDNMT3b3*, *ΔDNMT3b4*, *ΔDNMT3b5* und *ΔDNMT3b6* (Okano *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2002). Diese alternativen *splice*-Varianten sind die vorherrschenden exprimierten Formen der Methyltransferase *DNMT3b* im kleinzelligen Lungenkarzinom (Wang *et al.*, 2006). Durch Wang *et al.* wurde gezeigt, dass die *splice*-Variante *ΔDNMT3b4* in die Regulation der Methylierung des *RASSF1A* Promotors im Lungenkrebs involviert ist (Wang *et al.*, 2007a). Wang *et al.* schloss aus diesen Ergebnissen, dass Methylierungen von Promotorregionen unterschiedlich reguliert werden können und dass *ΔDNMT3bs* in diese promotorspezifischen *de novo* Methylierungen involviert sind (Wang *et al.*, 2007a). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in transienten Experimenten von *ΔDNMT3b4* mit IGR-I Zellen weder eine Veränderung des Methylierungsstatus des *RASSF1A* und *PTEN* Promotors noch eine Veränderung in der Expression der beiden Tumorsuppressorgene von *IL-6* und der Methyltransferase *DNMT1*. Wang *et al.* hat in seiner Arbeit ausschließlich stabil transfizierte Zellklone verwendet und nach fünf bis zehn Passagen Methylierungsassays durchgeführt. Das kann die fehlende Reaktion der transient transfizierten Zellen auf die *splice*-Variante *ΔDNMT3b4* erklären. Die Inkubationszeit ist bei transienten Experimenten für diesen Wirkmechanismus zu kurz und kann nicht greifen.

Bei dem stabilen Transfektionsexperiment wurden ebenfalls keine Veränderungen des Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene festgestellt, jedoch zeigten die *semi*-quantitativen Expressionsanalysen eine Expressionssteigerung von *RASSF1A* und *IL-6* im Vergleich zur Vektorkontrolle. Leicht intensivere Produkte konnten bei der Expression von *PTEN* und *DNMT1* festgestellt werden. Diese Befunde zeigen, dass die Annahme einer spezifischen Promotormethylierung der *ΔDNMT3bs* von Wang *et al.* nicht auf alle Gewebetypen gleichermaßen angewendet werden kann. Die für die Transfektionsexperimente verwendete Zelllinie von Wang *et al.* war eine immortalisierte humane Bronchialepithel Zelllinie (HBE1). Es ist bekannt, dass das kleinzellige Lungenkarzinom sehr oft im *RASSF1A* Promotor methyliert vorliegt (Dammann *et al.*, 2001). Es ist anzunehmen, dass im Lungengewebe eine Prädisposition existiert den Promotor von *RASSF1A* zu methylieren. Diese Prädisposition ist gewebsspezifisch bzw. tumorspezifisch. Demzufolge muss die Schlussfolgerung von Wang *et al.* bezüglich der Promotorspezifität der *ΔDNMT3bs* erweitert werden. Die Ergebnisse der Experimente dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das Wirkungsspektrum der *ΔDNMT3bs* nicht nur in Bezug auf verschiedene Tumorsuppressorgene spezifisch unterschiedlich ist, sondern sich auch von Gewebe zu Gewebe unterscheidet.

4.5.2 UV-B löst einen Anstieg von IL-6 und DNMT1 aus

Die Bestrahlung von humanen Keratinocyten (HaCat) mit UV-B Licht zeigt keine Auswirkungen auf den Methylierungsstatus der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* (Abb. 3-18; 3-19). Allerdings löst die Bestrahlung einen Anstieg der Expression von *DNMT1* und Interleukin-6 aus, der im Falle der Methyltransferase anhält und bei IL-6 wieder abfällt. Weiter tritt eine temporäre Abnahme der Expression von *DNMT3a*, *DNMT3b*, *CDKN2A* und *RASSF1A* zwei und vier Stunden nach der UV-B Bestrahlung auf, die nach zehn Stunden weitestgehend wieder das Ausgangslevel erreicht (Abb. 3-20).

RASSF1A und *CDKN2A* weisen keine Veränderungen des Methylierungsstatus im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (0 h) auf (Abb. 3-18). *RASSF1A* ist in allen Proben unmethyliert und *CDKN2A* ist in allen Proben partiell methyliert, was im Fall von *CDKN2A* durch eine COBRA Analyse verifiziert wurde (Abb. 3-18).

Für das Tumorsuppressorgen *PTEN* konnte in der *methylation specific* PCR eine geringe Methylierung der Promotorregion zwei und vier Stunden nach einer UV-B Bestrahlung festgestellt werden (Abb. 3-18), die jedoch in einer weiteren COBRA Analyse nicht verifiziert werden konnte (Abb. 3-19).

Die *semi*-quantitativen Expressionsanalysen zeigen ein stetiges Ansteigen des Methyltransferase *DNMT1* mRNA-Level innerhalb der ersten zehn Stunden nach der UV-B Exposition (Abb. 3-20). Auch die chronisch bestrahlten Zellen zeigen ein höheres mRNA-Level für *DNMT1* als die unbehandelte Kontrolle (Abb. 3-21). Die mRNA-Level der Methyltransferasen *DNMT3a* und *DNMT3b* sinken nach der Exposition zunächst ab (2h und 4h), um anschließend (6h bis 10h) wieder fast das Ausgangslevel zu erreichen (Abb. 3-20).

Das mRNA-Level von Interleukin-6 steigt kurz nach der Exposition (2h bis 4h) stark an um anschließend (6h bis 10h) wieder auf die Produktintensität der unbehandelten Kontrolle abzusinken (Abb. 3-20). Die chronisch behandelten Zellen zeigen ebenfalls gegenüber der unbehandelten Kontrolle ein gesteigerte mRNA-Level (Abb. 3-21).

Die mRNA-Level der beiden Tumorsuppressorgene *RASSF1A* und *CDKN2A* sinken nur leicht ab und erreichen bei vier Stunden nach einer UV-B Exposition den niedrigsten Wert, um dann wieder auf das Anfangsniveau bei zehn Stunden nach der Bestrahlung anzusteigen (Abb. 3-20). Die Expression von *RASSF1A* in den chronisch behandelten Zellen sinkt im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Bei *CDKN2A* steigt das mRNA-Level in den chronisch bestrahlten Keratinocyten leicht an (Abb. 3-21). Das mRNA-Level von *PTEN* zeigt keine Veränderung durch eine Bestrahlung von UV-B Licht, weder in der Kinetik noch in den chronisch behandelten Zellen (Abb. 3-20; 3-21).

De Vos *et al.* hat gezeigt, dass durch eine Bestrahlung von humanen Keratinocyten mit UV-B Licht (100 J/m²) *in vitro* die Expression von Interleukin-6 um das 5fache ansteigt. Dieser Anstieg erreicht

das Maximum etwa 6h nach der Bestrahlung. Anschließend sinkt die Expression wieder stark ab, um den Ausgangswert des mRNA-Levels nach etwa 25h zu erreichen (de Vos *et al.*, 1994).

In dieser Arbeit wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Das mRNA-Level erreichte das Maximum nach 2h bis 4h und sank nach 10h wieder auf das Ausgangsniveau ab. Obwohl die gesamte Reaktion der Keratinocyten schneller abläuft als in der Literatur beschrieben, wurden die Ergebnisse von de Vos *et al.* verifiziert.

Weiter wurde in der Literatur berichtet, dass das Cytokin IL-6 in der Lage ist den Promotor der Methyltransferase *DNMT1* und die Enzymaktivität zu regulieren (Hodge *et al.*, 2001). Diese Zunahme der Expression von IL-6 kann ebenfalls in den Ergebnissen dieser Arbeit über die *semi*-quantitative RT-PCR beobachtet und somit bestätigt werden (Abb. 3-20). Daher ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit durchgeführten *semi*-quantitativen RT-PCRs und die erhaltenen Ergebnisse auf quantitative Assays übertragbar sind. Dementsprechend zeigen die durchgeführten *semi*-quantitativen Assays dieser Arbeit, dass die *de novo* Methyltransferasen *DNMT3a* und *DNMT3b* ebenfalls durch eine Exposition von UV-B Licht beeinflusst werden. Entgegen des Verhaltens der *maintenance* Methyltransferase DNMT1 steigt die Expression der *de novo* Methyltransferasen nicht an, sondern sinkt nach 2h bis 4h sehr stark ab. Bei *DNMT3b* ist fast ein vollständiger Verlust der Expression zu erkennen (Abb. 3-20). Sehr interessant ist der Sachverhalt, dass sich die Expressionsmuster von *DNMT3b* und *IL-6* exakt komplementär verhalten. In dem Maße wie die Expression von *IL-6* zunimmt, nimmt die Expression von *DNMT3b* ab (Abb. 3-20). Dies ist jedoch nur eine Beobachtung, ein direkter kausaler Zusammenhang wurde nicht nachgewiesen. Jedoch deutet die Tatsache, dass die Methyltransferase DNMT1 durch IL-6 reguliert werden kann (Hodge *et al.*, 2001) und dass sich das Expressionsverhalten von *DNMT3b* und *IL-6* exakt komplementär verhalten (Abb. 3-20), an, dass *IL-6* ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von *DNMT3b* haben könnte. In der Literatur ist von einem derartigen Zusammenhang bisher nichts veröffentlicht worden.

Es ist bekannt, dass die Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b eine wichtige Rolle in der Tumorgenese verschiedener Tumore spielen (Deng *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2009; Roll *et al.*, 2008). Daher ist das Ergebnis einer temporären Expressionsverringerung der *de novo* Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b durch eine UV-B Bestrahlung hoch interessant und sollte verifiziert werden.

Insgesamt zeigen die Daten an, dass *in vivo* durch eine Sonnenlicht-Exposition und die daraus resultierende Expressionssteigerung von Interleukin-6 eine Expressionssteigerung der DNA-Methyltransferase DNMT1 zur Folge hat. Dies wurde in der Literatur durch de Vos *et al.* und Hodge *et al.* beschrieben und in dieser Arbeit experimentell bewiesen (de Vos *et al.*, 1994; Hodge *et al.*, 2001).

Aufgrund der Expressionssteigerung der Methyltransferase *DNMT1* lässt sich vermuten, dass die erhöhte Konzentration der Methyltransferase eine verstärkte Methylierung der DNA zur Folge hat. Tatsächlich zeigen die *semi*-quantitativen RT-PCRs, dass bei *CDKN2A* geringere mRNA-Level nach 2h bis 4h auftreten (Abb. 3-20). Das Tumorsuppressorgen *RASSF1A* zeigt ebenfalls 4h nach der UV-B

Exposition ein erniedrigtes mRNA-Level (Abb. 3-20). Diese Expressionserniedrigung von *CDKN2A* und *RASSF1A* ist jedoch nicht auf eine Inaktivierung des jeweiligen Promotors durch eine vermehrte Methylierung zurückzuführen. Der Promotor von *CDKN2A* weist über die gesamte UV-B Kinetik einen gleichbleibenden partiellen Methylierungsstatus auf und der *RASSF1A* Promotor liegt in allen Proben zu 100% unmethyliert vor (Abb.3-18; 3-19).

Insgesamt kann daher kein Zusammenhang zwischen einer UV-B Exposition und einem erniedrigten mRNA-Level der Tumorsuppressorgene und einer Promotormethylierung gezeigt werden, obwohl eine gesteigerte Expression der Methyltransferase *DNMT1* durch die UV-B Exposition ausgelöst wurde. Die temporäre Expressionserniedrigung der Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *RASSF1A* beruht nicht auf epigenetischen Prozessen bzw. konnten diese mit den durchgeführten Methoden nicht nachgewiesen werden.

Hierzu sollten quantitative Verfahren angewendet werden, da der Effekt einer durch UV-B oder IL-6 artifiziell herbeigeführten Methylierung wahrscheinlich sehr gering ausfällt, weswegen dieser Effekt vermutlich in den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit durch die eher qualitativen bis *semi*-quantitativen Methoden nicht detektiert werden konnte. Dafür bieten sich die Pyrosequenzierung von PCR-Amplifikaten der Promotorregionen der Tumorsuppressorgene und *real-time* PCR Methoden an. Weiter lässt sich durch inhibierende RNAi Experimente, IL-6 als potentieller Methylierung auslösender Faktor identifizieren. Verschwindet der UV-B indizierte Methylierungsprozess, wenn Interleukin-6 inhibiert wird, ist Interleukin-6 in diesen Prozess involviert und ist ein interessanter Kandidat für weitere Experimente für die Aufklärung epigenetischer Inaktivierungen.

4.5.3 Supplementiertes IL-6 zeigt keine Auswirkungen auf den Methylierungsstatus

Durch eine exogene Supplementierung von IL-6 konnte weder in den Buff1280 Zellen noch in den normalen humanen Melanocyten eine Methylierung der Promotorregion der untersuchten Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* ausgelöst werden.

Hodge *et al.* hat gezeigt, dass exogen supplementiertes Interleukin-6 in der Lage ist eine Reaktion auszulösen, die über weitere Faktoren, die zuvor demethylierte Promotorregion des Tumorsuppressorgens *p53* remethylieren kann (Hodge *et al.*, 2005). Aufgrund der Ergebnisse von Hodge *et al.* und der zuvor durch UV-B Bestrahlung artifiziell erzeugte mRNA-Level Steigerung der Methyltransferase *DNMT1* und von *IL-6* (Abb. 3-21; 4.3.1) wird vermutet, dass ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von IL-6 und einer Promotormethylierung besteht. Es wurde in der Literatur und in dieser Arbeit gezeigt, dass durch UV-B Licht eine Expressionssteigerung von Interleukin-6 erzeugt werden kann, was eine Expressionssteigerung von der Methyltransferase *DNMT1* zur Folge hat (de Vos *et al.*, 1994; Hodge *et al.*, 2001). Jedoch wurde

durch die UV-B Bestrahlung in dieser Arbeit keine Methylierung in den untersuchten Promotoreregionen der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* erzeugt (Abb. 3-20). Die ausbleibende Methylierung könnte daraus resultieren, dass der Versuchszeitraum für die erforderliche zelluläre Reaktion, um eine Methylierung zu erzeugen, zu kurz bemessen war. Daher und um zu zeigen, dass Interleukin-6 direkt und keine anderen UV-B induzierten Ereignisse für eine Methylierung über die Regulation der Methyltransferase *DNMT1* verantwortlich sind, wurden Zellen der Zelllinie Buff1280 und normale humane Melanocyten exogen mit IL-6 supplementiert.

Es konnte in dieser Arbeit jedoch keine Promotormethylierung in den untersuchten Genen *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* festgestellt werden (Abb. 3-22, 3-23, 3-24). Die ausbleibende Methylierung könnte darauf zurück geführt werden, dass zum einen die Dosis von IL-6 zu gering war, zum anderen ist die biologische Halbwertszeit von Interleukin-6 ca. 20 min. bis 60 min. (Castell *et al.*, 1988; Montero-Julian *et al.*, 1995). So wurde zwar eine chronische Supplementierung über einen sehr langen Zeitraum (10 Passagen) gewährleistet, jedoch waren die Zeiträume, die zwischen den Supplementierungen lagen, zu groß, als dass die Zellen einem methylierenden Druck ausgesetzt waren. Die Supplementierung hätte theoretisch mehrmals täglich stattfinden müssen, um ein entsprechendes IL-6-Level zu halten, das eine Methylierung auslöst. Um die Auswirkungen von IL-6 auf den Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen gezielt untersuchen zu können, sollten daher Transfektionsexperimente durchgeführt werden, in denen *IL-6* gezielt induziert werden kann. Damit lassen sich die Auswirkungen einer temporären Überexpression von *IL-6* auf den Methylierungsstatus von Tumorsuppressorgenen untersuchen. Diese Versuche wären auch unabhängig von Reaktionen, die eine UV-B Exposition auslöst.

Insgesamt ergeben die funktionellen Experimente zur artifiziellen Erzeugung von Promotormethylierungen durch IL-6 Supplementierung sehr interessante Ansätze für die Aufklärung des Mechanismus zur Entstehung Promotormethylierungen in somatischen Zellen. Letztendlich konnte der letzte Schritt nicht gezeigt werden, wurde aber in der Literatur beschrieben (Hodge *et al.*, 2005). Dies lässt den Ansatz vermuten, dass Interleukin-6 eine bedeutende Rolle in der epigenetischen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zukommt, sei es durch Hautkrebs auslösende Sonnenexpositionen oder durch Lungenkrebs erzeugende chronische Entzündungen durch inhalativen Tabakkonsum.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die epigenetischen Veränderungen der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* und die virale Präsenz der Polyomaviren MCPyV und SV40 in den neuroendokrinen Tumorentitäten des malignen Melanoms, des kleinzelligen Lungenkarzinoms und des Merkelzellkarzinoms untersucht. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen endo- (*ADNMT3b4* und IL-6) und exogener (UV-B Licht, virale Infektion) Faktoren auf Melanom-Zellen, normale humane Melanocyten und Keratinocyten auf den Methylierungsstatus ermittelt.

Der Merkelzellpolyomavirus wurde in 92% ($p < 0,001$) aller Merkelzellkarzinome detektiert. Im kleinzelligen Lungenkarzinom und malignem Melanom konnte der Virus zu je 40% (SCLC: $p = 0,01$; MM: $p = 0,001$) der Tumore gefunden werden. Der SV40 Virus konnte in keiner Probe diagnostiziert werden. Die Promotormethylierung von *RASSF1A* betrug im malignen Melanom 12% ($p = 0,033$). Im Merkelzellkarzinom war sie hoch (51%; $p < 0,001$) und im kleinzelligen Lungenkarzinom sehr hoch (94%; $p < 0,001$). Die Promotormethylierung von *CDKN2A* war im Vergleich zum Vergleichskontroll-Gewebe im kleinzelligen Lungenkarzinom signifikant erhöht (56%; $p = 0,006$). Das Tumorsuppressorgen *PTEN* wies im malignen Melanom eine hohe Promotormethylierung (60%; $p < 0,001$) auf. Insgesamt wurde keine Korrelation zwischen der viralen Präsenz und einer Hypermethylierung gefunden. Im malignen Melanom wurde *PTEN* als signifikanter unabhängiger Prognosefaktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit identifiziert. Darüber hinaus wurde im malignen Melanom eine Korrelation zwischen der Hypermethylierung von *PTEN* und einer starken basophilen Degeneration ($p = 0,011$) sowie mit einer sonnenexponierten Lokalisierung der Tumore ($p = 0,043$) gefunden. Die Sterblichkeit von Patienten mit einem methylierten *PTEN* Promotor ist um 75% erhöht ($p = 0,014$). Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass im malignen Melanom eine Methylierung des *PTEN* Promotors durch UV Strahlung herbeigeführt werden kann. Diese These wurde durch eine Bestrahlung von Keratinocyten mit UV-B Licht *in vitro* überprüft. Durch diese UV-B Licht Exposition konnte ein Anstieg der Expression der Methyltransferase *DNMT1* und von IL-6 sowie eine vorübergehende Verringerung der Expression der Methyltransferasen *DNMT3a* und *DNMT3b* detektiert werden, jedoch konnte keine Promotormethylierung von *RASSF1* und *PTEN* induziert werden. Da bekannt ist, dass IL-6 in der Lage ist die Expression der Methyltransferasen zu regulieren, wurden normale humane Melanocyten und Melanom-Zellen exogen mit IL-6 supplementiert. Durch diese Supplementierung wurde keine Promotormethylierung ausgelöst. Diese Resultate deuten an, dass UV Licht *in vivo* eine über IL-6 induzierte Promotormethylierung auslöst und damit einen Einfluss auf die Karzinogenese von Hautkrebsentitäten hat.

5.1 Summary

In the present work, the epigenetic changes of the tumor suppressor genes *RASSF1A*, *CDKN2A* and *PTEN* and the viral presence of polyoma viruses MCPyV and SV40 in neuroendocrine tumor entities of the malignant melanoma, small cell lung cancer and merkel cell carcinoma have been investigated. Furthermore the impact of endogenous (*DNMT3b4* and IL-6) and exogenous (UV-B radiation, viral infection) factors on melanoma cells, normal human melanocytes and keratinocytes and according methylation status was determined.

The merkel cell polyomavirus was detected in 92% ($p < 0,001$) of all merkel cell carcinoma. In small cell lung cancer and malignant melanoma the virus was found in 40% (SCLC: $p = 0,01$; MM: $p = 0,001$) of tumors. The SV40 virus was not detected in any sample. The promoter methylation of *RASSF1A* was 12% ($p = 0,033$) in malignant melanoma. In merkel cell carcinoma the methylation status was high (51%; $p < 0,001$) and in small cell lung cancer very high (94%; $p < 0,001$). The promoter methylation of *CDKN2A* was significantly higher (56%; $p = 0,006$) in small cell lung cancer than in the control tissue. The tumor suppressor gene *PTEN* showed a high promoter methylation (60%; $p < 0,001$) in malignant melanoma. In total no correlation between the viral presence and a hypermethylation was found. In malignant melanoma *PTEN* was identified as a significant independent factor for prognosis of patient survival. In addition, a correlation between hypermethylation of *PTEN* and a strong basophile degeneration ($p = 0,011$) or “sun exposed” localization ($p = 0,043$) of tumors was shown. Patients mortality with a methylated *PTEN* promoter is increased by 75% ($p = 0,014$). These results led to the hypothesis, that in malignant melanoma a methylation of the *PTEN* promoter could be caused by UV radiation. This assumption was verified by radiation of keratinocytes with UV-B *in vitro*. After exposition to UV-B radiation expression of methyltransferase *DNMT1* and *IL-6* was increased, as well as a transient decrease in the expression of the methyltransferases *DNMT3a* und *DNMT3b* was detected. However no promoter methylation of *RASSF1* and *PTEN* was induced. It is known, that IL-6 shows the ability to regulate the expression of methyltransferases, therefore normal human melanocytes and melanoma cells were supplemented exogenously with IL-6. By this supplementation no promoter methylation was induced. These results indicate, that UV light *in vivo* causes a IL-6 induced promoter methylation and therefore influences the carcinogenesis of skin cancer.

6 Anhang

6.1. Abbildungen

6.1.1 Genom des Merkelzellpolyomavirus

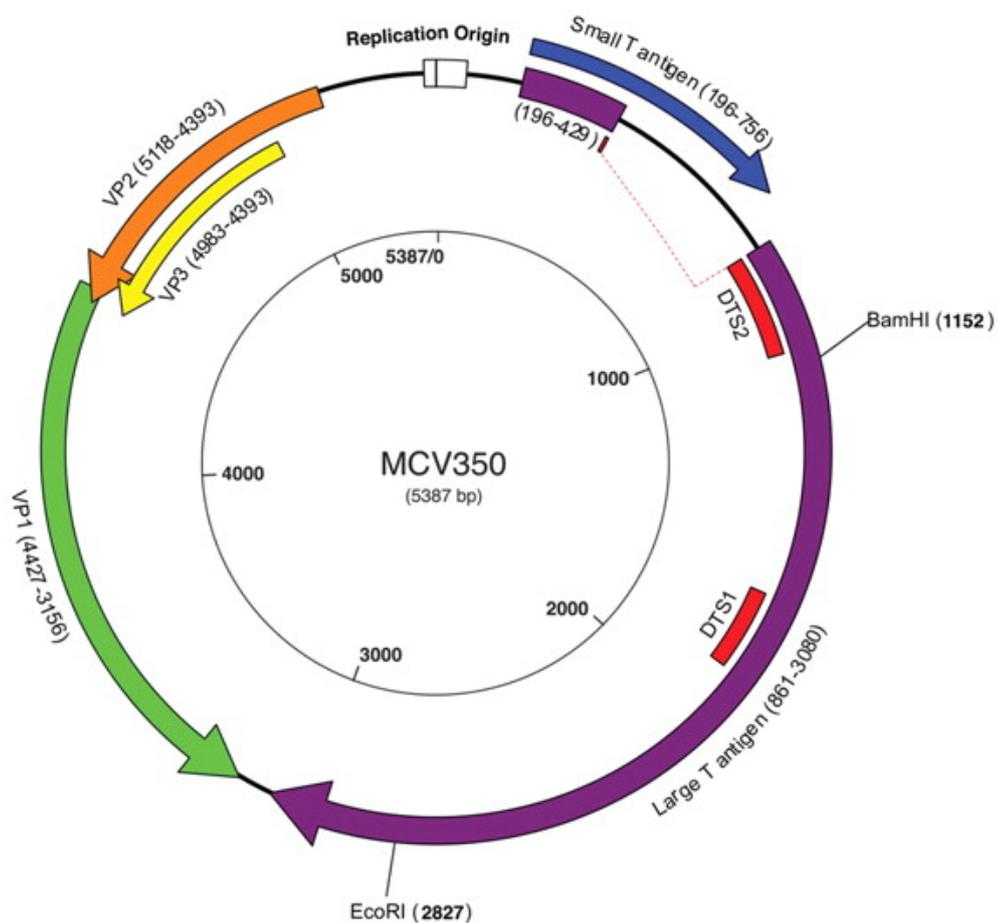


Abbildung 6-1: Genomkarte des Merkelzellpolyomavirus (MCPyV 350). Accessionnummer: NC_010277. Bildquelle: (Feng *et al.*, 2008). DTS: Digital transcriptome subtraction; VP: Virus Protein, *EcoRI* und *BamHI*: Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* (5'-GAATTC-3') und *BamHI* (5'-GGATCC-3').

6.1.2 Expressionsvektor für das *latent membrane proteine 1*

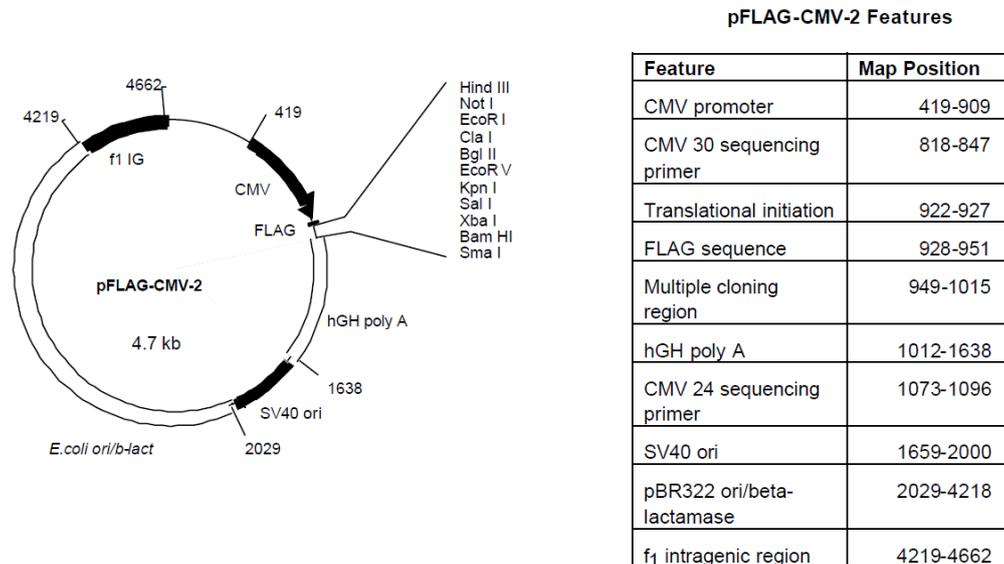


Abbildung 6-2: Vektorkarte des pFlag-CMV-2 Expressionsvektors für *E. coli* und humane Zellen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH. In dieser Arbeit verwendet als Vektorkonstrukt mit kloniertem *latent membrane protein 1*. Kloniert über *BamHI* und *HindIII*. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Yu-Sun Chang, Taiwan (Tsai *et al.*, 2002).

Quelle: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Vector/e7398vec.Par.0001.File.tmp/e7398vec.pdf> inzwischen neu designt.

6.1.3 Expressionsvektor für die Methyltransferase $\Delta DNMT3b4$

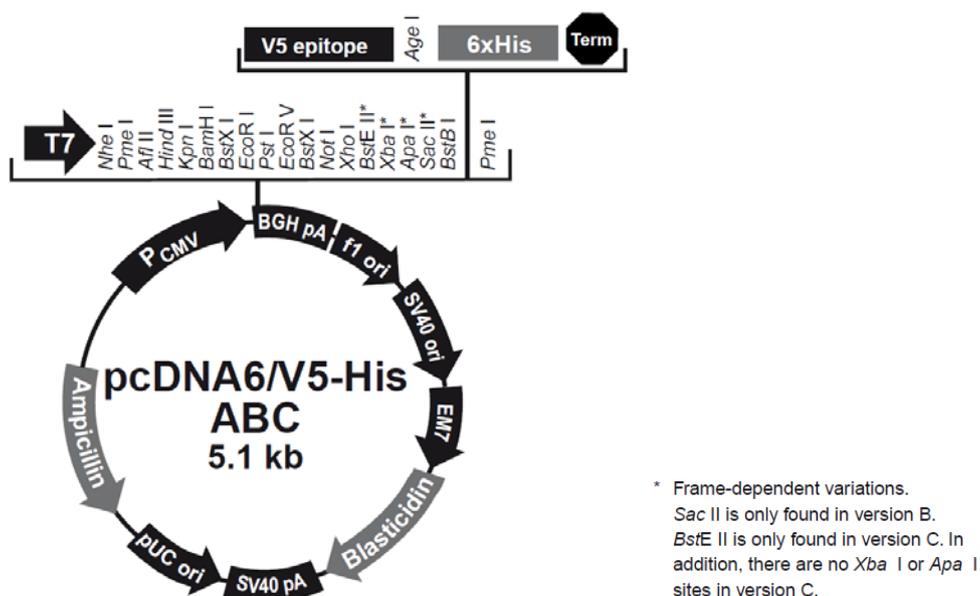


Abbildung 6-3: Vektorkarte des pcDNA6/V5-His ABC Expressionsvektotr für humane Zellen von Invitrogen GmbH. In dieser Arbeit verwendet als Vektorkonstrukt mit kloniertem $\Delta DNMT3b4$. Kloniert über *NheI* und *BamHI* in Variante C. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. You-hong Fan.

Quelle: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna6v5his_map.pdf

6.1.4 SV40 Kontrollvektor

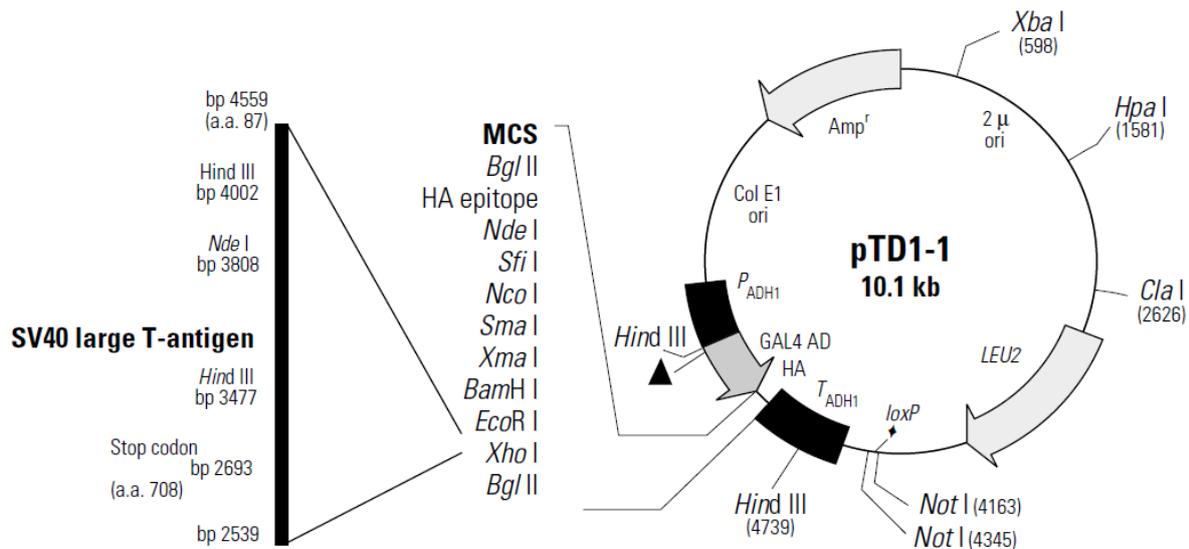


Abbildung 6-4: Vektorkarte des pTD1-1 Expressionsvektors für humane Zellen von Clontech-Takara Bio Europe. In dieser Arbeit als Positiv-Kontrolle für die virale Präsenz des Polyomavirus SV40 verwendet. Bildquelle : http://www.clontech.com/images/pt/dis_manuals/PT3062-1.pdf

6.1.5 Abbildung der immunhistologischen Expressionsanalyse von PTEN im malignen Melanom

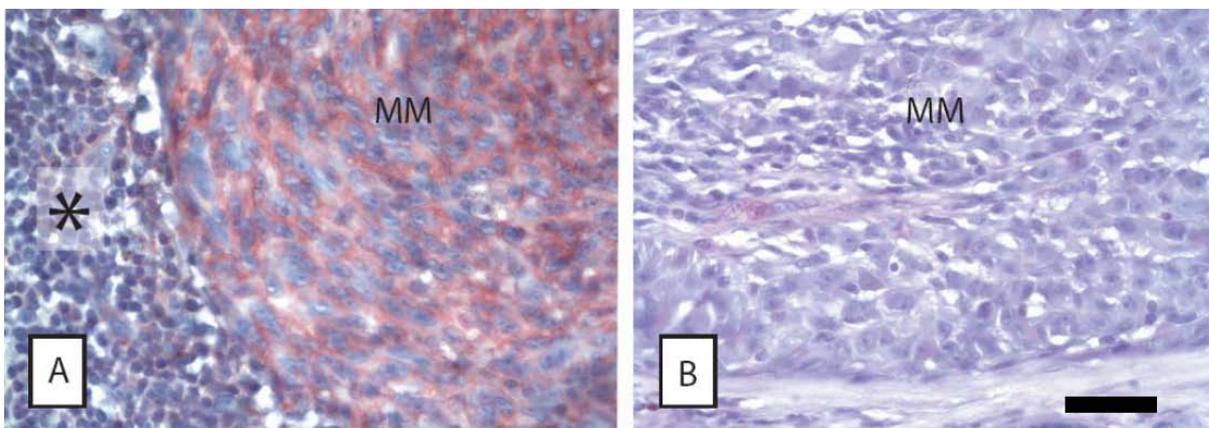


Abbildung 6-5: Immunhistologische Expressionsanalyse von PTEN. **A:** Oberflächlich spreitendes Melanom, Tumordicke 1,89 mm, Clark-Level IV mit einer starken PTEN Expression (rot gefärbte Bereiche). Die starke Expression steht im Zusammenhang mit einem unmethyliertem *PTEN* Promotor (Tumor Nr. 221; Tab. 6-3). **B:** Noduläres malignes Melanom, Tumordicke 6 mm, Clark-Level IV ohne PTEN Expression (keine rot gefärbten Bereiche). Die fehlende Expression von PTEN steht im Zusammenhang mit einem methyliertem *PTEN* Promotor (Tumor Nr.7; Tab. 6-3). MM: maligne Melanomzellen; *: entzündete Zellen. Maßstab entspricht 20 μ m.

6.1.6 Weltweiter UV-Index am 27.6.2007

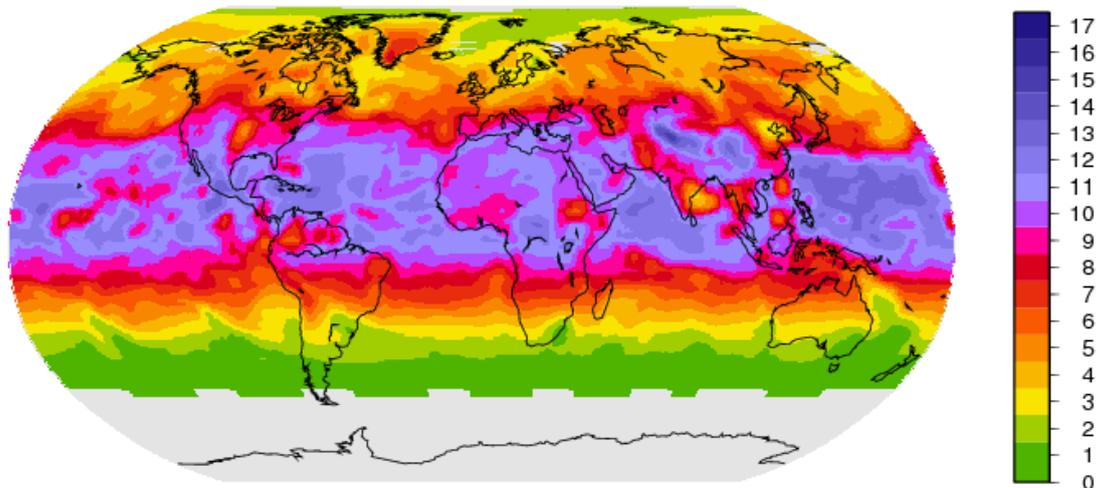


Abb. 6-6: Weltweites tägliches Maximum des UV-Index bei klarem Himmel am 27.6.2007 (Satelliten gestützt)
Bildquelle: <http://promote.fmi.fi/>

6.2. Tabellen

6.2.1 Zusammenfassung der klinisch und histo-pathologischen Daten der malignen Melanome

Tabelle 6-1: Klinische und histologische Daten von 230 untersuchten malignen Melanomen von 230 Patienten

Merkmal	Untersuchungsgröße	Probenumfang	Ergebnisse
Alter	Median; Mittelwert	230	61,9; 60 ± 14,6 Jahre
Geschlecht	Mann vs. Frau	230	105 vs. 125
Anfangsstadium	0 / IA / IB / IIA / IIB / IIC / III / IV	226	3 / 24 / 62 / 45 / 45 / 32 / 14 / 1
pT	iST / T1a / T1b / T2a / T2b / T3a / T3b / T4a / T4b	226	3 / 24 / 1 / 62 / 33 / 15 / 41 / 8 / 39
Tumor-Lokalisierung	TANS vs. nicht TANS	230	121 vs. 109
	akral vs. nicht akral	230	22 vs. 208
größter Tumordurchmesser	Median; Mittelwert	218	17,0; 20,4 ± 11,5 mm
Tumortyp	SSM / NMM / LMM / ALM / nk	230	149 / 38 / 14 / 13 / 16
Tumordicke	Median; Mittelwert	226	1,90; 2,79 ± 2,26 mm
Clark-Level	I / II / III / IV / V	230	3 / 19 / 123 / 70 / 15
Ulzeration	Ulzeration vs. keine Ulzeration	227	114 vs. 113

NZN-Assoziation	NZN-Assoziation vs. keine NZN-Assoziation	221	52 vs. 169
Infiltration Entzündung*	keine oder kaum / mittel / stark	228	98 / 74 / 56
Mitosen	Median; Mittelwert	209	0,40; 0,63 ± 1,05 pro HPF
basophile Degeneration	keine / gering / stark	222	47 / 141 / 34
Nachbeobachtungszeit	Median; Mittelwert		81,5; 77,2 ± 46,8 Monate
Rückfall (Rezidiv)	Anzahl	230	86
Tod	Anzahl	230	114

Anfangsstadium und pT nach (Balch *et al.*, 2001); TANS: *thorax, upper arm, neck, scalp* nach (Garbe *et al.*, 1995); SSM: *superficial spreading melanoma* (oberflächlich spreitendes Melanom); NMM: *nodular malignant melanoma* (noduläres malignes Melanom); LMM: *lentigo-maligna-melanoma* (Lentigo-maligna-Melanom); ALM: *acral-lentiginous melanoma* (akrolentiginöses Melanom); nk: nicht klassifiziert; HPF: *high power field*, in dieser Arbeit definiert als Durchschnitt der Anzahl der Mitosen von zehn mikroskopischen Gesichtsfeldern (HPF) bei größter Auflösung (40x) (Helmbold *et al.*, 2006). *Semiquantitativer histologischer Wert, Adaptierung der Methode nach Mansson-Brahme *et al.* (Mansson-Brahme *et al.*, 1994).

6.2.2 Zusammenfassung der Mutationsanalysen von *BRAF* und *NRAS* im malignen Melanom

Tabelle 6-2: Ergebnisse der Mutationsanalysen von *BRAF* und *NRAS*

Gen	Ergebnis
<i>BRAF</i> Mutation (gesamt)	67% (147/221)
<i>BRAF</i> c.1799 T>A p.V600E	52% (114/221)
<i>BRAF</i> c.1798 1799 GT>AA p.V600K	22% (48/221)
<i>BRAF</i> beide Mutationen	7% (15/221)
<i>NRAS</i> Mutation (A>T p.Q61L)	2% (4/230)

Der Inhalt der Klammern zeigt das Verhältnis der Anzahl von mutierten Tumoren zu der Gesamtanzahl der untersuchten Tumore. (Dabei entspricht die erste Zahl der Menge der mutierten Tumore und die zweite Zahl der Gesamtmenge der untersuchten Tumore)

6.2.3 Zusammenfassungen der histologischen, Methylierungs- und Virusanalysen der malignen Melanome, Merkelzellkarzinome und kleinzelligen Lungenkarzinomen

Tabelle 6-3: Ergebnisse der histologischen Charakterisierung (nur wichtigsten Charakteristika), der Methylierungsanalysen von den Tumorsuppressorgenen *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* sowie der viralen Präsenz von MCPyV (Merkelzellpolyomavirus) von 619 einzelnen Tumorproben von 230 untersuchten malignen Melanomen von 230 Patienten

MM	Histologische Charakterisierung				Methylierung von Tumorsuppressorgenen			Virale Präsenz
Tumorprobe	Tumortyp	Ulzeration	basophile Degeneration	TANS	<i>RASSF1A</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>PTEN</i>	MCPyV
1	SSM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	+ (1/2)	0
2	SSM	0	+	+	+ (1/3)	+ (1/3)	0 (0/1)	na
3	SSM	0	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	+ (1/3)	+
4	SSM	+	0	+	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0
5	SSM	0	0	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0
6	SSM	0	+	0	+ (2/3)	0 (0/3)	+ (3/3)	+
7	NMM	+	0	0	0 (0/3)	0 (0/2)	+ (3/3)	0
8	SSM	0	0	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0
9	SSM	0	0	0	na	na	na	na
10	SSM	+	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	+
11	SSM	+	0	0	0 (0/4)	0 (0/2)	+ (2/4)	+
12	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/1)	0 (0/2)	0
13	NMM	+	+	0	0 (0/2)	+ (1/2)	0 (0/2)	0
14	SSM	0	0	0	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	+
15	SSM	0	++	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	+
16	SSM	0	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+ (2/3)	na
17	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0
18	NMM	+	0	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0
19	NMM	+	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	+ (1/3)	+
20	SSM	+	0	0	0 (0/2)	+ (2/2)	0 (0/2)	0

21	SSM	0	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0
22	NMM	+	+	+	0 (0/2)	+(1/2)	+(2/2)	0
23	NMM	+	+	+	0 (0/2)	+(1/2)	+(1/2)	na
24	ALM	0	0	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	+
25	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (1/2)	+(2/2)	0
26	NMM	+	0	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	+
27	SSM	0	+	+	0 (0/2)	+(2/2)	0 (0/2)	na
28	SSM	+	+	0	+(2/2)	0 (0/2)	+(2/2)	+
29	SSM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/2)	0
30	SSM	0	0	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0
31	NMM	+	+	0	0 (0/4)	+(1/4)	+(2/4)	+
32	SSM	0	na	0	0 (0/5)	+(1/5)	+(1/5)	0
33	LMM	+	+	+	0 (0/9)	+(1/6)	+(5/6)	na
34	nk	0	na	0	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/2)	0
35	SSM	+	0	0	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	0
36	nk	0	++	0	0 (0/3)	0 (0/1)	+(2/2)	+
37	NMM	0	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/1)	0
38	NMM	0	0	0	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/1)	+
39	SSM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	0
40	ALM	+	0	+	0 (0/4)	0 (0/4)	+(4/4)	0
41	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0
42	SSM	0	+	+	+(1/2)	0 (0/2)	+(2/2)	0
43	nk	0	+	0	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0
44	NMM	+	+	+	0 (0/3)	0 (0/4)	+(2/4)	0
45	SSM	+	+	+	0 (0/4)	+(1/4)	+(1/4)	0
46	NMM	+	++	0	0 (0/3)	0 (0/2)	0 (0/2)	+
47	nk	+	+	0	na	0 (0/1)	+(2/3)	+
48	SSM	+	+	0	0 (0/2)	0 (0/1)	+(1/2)	0
49	NMM	+	++	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0
50	SSM	0	0	+	0 (0/2)	+(1/2)	+(2/2)	0
51	SSM	0	+	0	+(1/2)	0 (0/2)	+(2/2)	0

52	SSM	0	0	+	0 (0/2)	na	+(3/3)	+
53	SSM	+	+	+	0 (0/1)	0 (0/1)	+(2/2)	na
54	SSM	+	+	+	+(2/3)	0 (0/3)	+(3/3)	+
55	SSM	0	+	+	+(4/5)	0 (0/5)	+(2/5)	0
56	LMM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/2)	+
57	SSM	na	na	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	+
58	SSM	0	0	+	na	na	+(1/1)	na
59	SSM	0	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	+(2/3)	+
60	SSM	na	0	+	0 (0/4)	+(1/4)	+(2/4)	0
61	SSM	+	++	0	0 (0/2)	0 (0/1)	0 (0/2)	0
62	SSM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	+
63	SSM	0	0	0	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	+
64	SSM	0	0	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+(3/3)	+
65	SSM	0	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	+
66	LMM	0	+	0	0 (0/4)	+(1/2)	+(2/2)	na
67	NMM	0	+	0	0 (0/3)	na	0 (0/1)	na
68	SSM	0	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0
69	ALM	0	+	0	0 (0/5)	0 (0/5)	+(1/5)	0
70	NMM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/2)	+
71	NMM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/1)	+(2/2)	0
72	SSM	0	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0
73	ALM	+	0	0	0 (0/2)	0 (0/1)	+(1/2)	0
74	SSM	0	++	0	0 (0/1)	0 (0/2)	na	0
75	SSM	+	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+(2/2)	0
76	LMM	0	++	0	0 (0/3)	0 (0/2)	+(1/3)	na
77	SSM	+	+	+	0 (0/4)	0 (0/3)	+(4/4)	+
78	SSM	+	+	+	na	0 (0/1)	+(2/2)	na
79	nk	0	+	+	0 (0/5)	0 (0/4)	+(3/5)	0
80	SSM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/1)	+(1/2)	0
81	SSM	+	na	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	0
82	SSM	+	+	0	0 (0/2)	+(2/2)	+(2/2)	0

83	NMM	+	na	+	0 (0/1)	na	0 (0/2)	0
84	SSM	0	+	0	na	na	na	0
85	LMM	0	+	0	0 (0/2)	+(1/2)	0 (0/3)	0
86	NMM	+	+	+	0 (0/3)	0 (0/1)	+(3/3)	0
87	SSM	+	+	0	+(1/3)	0 (0/3)	+(2/3)	0
88	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	0
89	LMM	+	++	0	na	na	+(2/2)	+
90	LMM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/3)	+(2/2)	0
91	NMM	+	++	+	0 (0/2)	0 (0/3)	+(2/2)	0
92	SSM	+	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/1)	0
93	NMM	+	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	+(1/1)	0
94	SSM	0	+	+	0 (0/2)	na	na	0
95	NMM	+	++	0	0 (0/3)	na	na	0
96	LMM	0	++	0	0 (0/2)	0 (0/1)	na	na
97	nk	0	0	0	0 (0/3)	0 (0/2)	na	na
98	ALM	+	0	0	0 (0/2)	+(1/2)	na	+
99	ALM	0	na	0	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	na
100	nk	+	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	na	0
101	nk	0	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	na	0
102	SSM	0	+	+	0 (0/2)	+(1/2)	na	0
103	SSM	0	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	na	0
104	SSM	0	0	+	0 (0/2)	+(1/2)	0 (0/2)	+
105	SSM	0	0	0	+(2/3)	0 (0/3)	+(2/3)	+
106	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	+
107	nk	+	+	0	0 (0/2)	+(1/1)	+(2/2)	0
108	SSM	0	+	+	0 (0/3)	+(2/3)	+(3/3)	+
109	SSM	0	++	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	0
110	SSM	na	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/2)	+
111	ALM	0	0	0	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	0
112	SSM	0	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+(3/3)	+
113	LMM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/3)	+(1/3)	na

114	SSM	0	++	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
115	SSM	0	+	+	0 (0/1)	0 (0/2)	+(1/2)	na
116	SSM	0	++	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
117	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/1)	+(1/1)	na
118	SSM	0	++	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
119	SSM	0	0	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/2)	na
120	nk	0	++	+	0 (0/2)	+(1/2)	+(1/2)	na
121	LMM	0	++	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	na
122	SSM	0	++	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/2)	na
123	SSM	0	++	+	na	na	na	na
124	ALM	0	0	0	na	na	na	na
125	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
126	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
127	SSM	0	0	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/2)	na
128	SSM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
129	SSM	0	++	0	0 (0/3)	0 (0/3)	+(2/3)	na
130	NMM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
131	SSM	0	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	na
132	NMM	+	+	0	0 (0/1)	0 (0/3)	0 (0/3)	na
133	SSM	+	na	0	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
134	SSM	0	++	+	0 (0/3)	+(1/3)	+(1/3)	na
135	SSM	0	+	+	0 (0/2)	+(1/2)	+(2/2)	na
136	SSM	0	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	na
137	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
138	SSM	+	++	0	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
139	SSM	+	0	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+(1/3)	na
140	SSM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
141	SSM	+	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
142	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
143	SSM	+	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+(3/3)	na
144	NMM	+	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na

145	SSM	0	++	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+(3/3)	na
146	NMM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
147	SSM	+	++	+	0 (0/6)	0 (0/6)	+(5/6)	na
148	SSM	+	+	+	0 (0/4)	0 (0/4)	+(3/4)	na
149	ALM	+	0	0	0 (0/3)	0 (0/3)	+(3/3)	na
150	SSM	0	+	+	+(1/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	na
151	ALM	+	+	0	0 (0/4)	0 (0/4)	+(2/2)	na
152	NMM	+	++	+	0 (0/2)	0 (0/2)	na	na
153	SSM	0	0	0	0 (0/2)	+(1/2)	0 (0/2)	na
154	SSM	+	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	na
155	SSM	0	++	+	+(3/3)	0 (0/3)	+(3/3)	na
156	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	na	na
157	SSM	+	+	0	+(2/2)	0 (0/2)	+(1/2)	na
158	SSM	+	0	0	+(4/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	na
159	ALM	+	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	+(2/3)	na
160	SSM	+	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+(2/3)	na
161	SSM	0	++	+	+(3/3)	0 (0/3)	+(3/3)	na
162	nk	+	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	+(3/3)	na
163	SSM	+	0	0	0 (0/3)	0 (0/3)	+(1/3)	na
164	SSM	+	+	0	0 (0/4)	0 (0/4)	+(4/4)	na
165	SSM	+	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+(1/3)	na
166	SSM	0	+	+	0 (0/4)	+(1/4)	+(3/3)	na
167	SSM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	na	na
168	SSM	+	+	+	0 (0/1)	0 (0/2)	na	na
169	SSM	0	+	+	0 (0/3)	0 (0/4)	0 (0/1)	na
170	NMM	+	+	+	0 (0/2)	+(2/2)	na	na
171	NMM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	na	na
172	SSM	+	+	+	0 (0/3)	0 (0/4)	na	na
173	SSM	+	+	+	0 (0/2)	+(1/2)	na	na
174	nk	+	+	+	0 (0/3)	0 (0/4)	na	na
175	SSM	+	+	0	0 (0/4)	0 (0/4)	na	na

176	SSM	0	+	0	0 (0/3)	0 (0/3)	na	na
177	SSM	0	+	+	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/2)	na
178	SSM	+	+	0	0 (0/5)	+(2/6)	+(3/5)	na
179	NMM	+	+	+	0 (0/1)	0 (0/1)	+(2/2)	na
180	SSM	+	++	+	0 (0/5)	+(2/5)	+(3/5)	na
181	SSM	+	++	0	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/1)	na
182	SSM	+	+	+	0 (0/3)	+(3/3)	na	na
183	SSM	+	+	+	0 (0/3)	+(4/4)	na	na
184	SSM	+	++	+	0 (0/4)	+(4/5)	0 (0/2)	na
185	ALM	+	+	0	na	na	na	na
186	LMM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/3)	+(1/2)	na
187	NMM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(1/2)	na
188	NMM	+	na	+	na	+(1/1)	na	na
189	NMM	+	+	0	0 (0/1)	+(1/2)	0 (0/1)	na
190	NMM	+	+	+	0 (0/1)	0 (0/1)	+(1/1)	na
191	NMM	+	+	0	+(1/2)	0 (0/2)	+(1/1)	na
192	SSM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/1)	0 (0/2)	na
193	NMM	+	+	+	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	na
194	SSM	+	+	+	0 (0/1)	na	0 (0/2)	na
195	NMM	0	+	+	0 (0/1)	na	0 (0/2)	na
196	nk	+	+	0	+(1/2)	+(2/2)	0 (0/2)	na
197	SSM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/1)	0 (0/2)	na
198	NMM	0	+	0	0 (0/2)	na	0 (0/2)	na
199	SSM	+	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
200	SSM	0	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
201	SSM	+	0	+	0 (0/3)	0 (0/3)	+(3/3)	na
202	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
203	SSM	0	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	+(2/2)	na
204	NMM	+	+	+	0 (0/3)	+(2/3)	+(2/3)	na
205	SSM	+	0	+	0 (0/1)	na	na	na
206	LMM	0	+	0	0 (0/4)	+(1/4)	+(2/4)	na

207	SSM	+	+	0	0 (0/2)	0 (0/1)	0 (0/1)	na
208	LMM	0	+	0	na	na	0 (0/2)	na
209	SSM	+	+	+	0 (0/3)	+(1/3)	+(2/3)	na
210	SSM	0	+	0	+(1/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
211	SSM	+	0	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
212	SSM	0	0	0	+(1/2)	+(1/1)	0 (0/1)	na
213	SSM	0	0	+	+(2/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
214	SSM	+	0	0	+(2/2)	0 (1/1)	0 (0/2)	na
215	nk	0	+	+	+(2/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	na
216	nk	+	0	0	+(1/3)	0 (0/4)	0 (0/4)	na
217	nk	0	0	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
218	SSM	+	+	0	0 (0/2)	+(1/2)	0 (0/1)	na
219	SSM	+	+	0	0 (0/3)	+(3/3)	+(1/2)	na
220	SSM	+	+	0	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
221	SSM	+	+	+	0 (0/2)	+(1/2)	0 (0/2)	na
222	SSM	+	0	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
223	SSM	0	+	0	0 (0/1)	+(1/1)	+(1/1)	na
224	SSM	+	0	+	+(1/2)	0 (0/2)	+(1/2)	na
225	SSM	0	++	+	+(2/2)	0 (0/2)	+(1/2)	na
226	ALM	+	0	0	+(1/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
227	SSM	+	+	+	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	na
228	LMM	+	++	0	0 (0/2)	+(1/2)	+(2/2)	na
229	SSM	+	0	+	na	0 (0/2)	0 (0/2)	na
230	SSM	+	+	0	na	0 (0/2)	+(1/2)	na

Diese Tabelle fasst die Rohdaten der einzelnen Proben je Tumor zusammen. Die Tumorprobennummer entspricht der Patientennummer. Der Inhalt der Klammern der Methylierungsanalysen zeigt das Verhältnis der Anzahl von methylierten Proben zu der Gesamtanzahl der untersuchten Proben eines einzelnen Tumors. (Dabei entspricht die erste Zahl der Menge der methylierten Tumorproben und die zweite Zahl der Gesamtmenge der untersuchten Tumorproben je Tumor) Ist eine Probe in einem Tumor methyliert, wird der Tumor als methyliert betrachtet. MM: *malignant melanoma* (malignes Melanom), SSM: *superficial spreading melanoma* (oberflächlich spreitendes Melanom); NMM: *nodular malignant melanoma* (noduläres malignes Melanom); LMM: *lentigo-maligna-melanoma* (Lentigo-maligna-Melanom); ALM: *acral-lentiginous melanoma* (akrolentiginöses Melanom); +: Ulzeration, geringe basophile Degeneration, vorhandene TANS-Lokalisierung, vorhandene Methylierung, vorhandene virale Präsenz; ++: starke basophile Degeneration; 0: keine Ulzeration, keine basophile Degeneration, keine TANS-Lokalisierung, unmethyliert, keine virale Präsenz; na: nicht analysiert; nk: nicht klassifiziert.

Tabelle 6-4: Ergebnisse der histologischen Charakterisierung, der Methylierungsanalysen von den Tumorsuppressorgenen *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73* sowie der viralen Präsenz von MCPyV (Merkelzellpolyomavirus) und SV40 (*Simian virus 40*) von 108 untersuchten Tumorproben von 98 einzelnen Merkelzellkarzinomen von 91 Patienten

MCC	Histologische Charakterisierung		Methylierung von Tumorsuppressorgenen						Virale Präsenz	
Tumorprobe	Tumortyp	P/R/U	<i>RASSF1A</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>PTEN</i>	<i>FHIT</i>	<i>PTPRG</i>	<i>TP73</i>	MCPyV	SV40
1.1	MCC	P	na	na	na	na	na	0	+	0
2.1	MCC	P	+	na	na	0	0	na	+	na
3.1	MCC	P	na	0	na	0	0	na	+	0
4.1	MCC	P	na	+	na	na	na	na	+	na
5.1 I	MCC	R	0	0	na	0	0	na	0	na
5.1 II	MCC	R	0	0	na	0	0	na	0	na
5.2 I	MCC	R	0	0	na	0	0	na	0	na
5.2 II	MCC	R	0	+	na	na	na	0	0	na
5.2 III	MCC	R	0	0	na	0	na	na	0	na
5.2 IV	MCC	R	0	+	na	0	0	0	0	na
5.2 V	MCC	R	0	0	na	0	0	0	+	na
5.2 VI	MCC	R	0	+	na	0	0	0	0	na
6.1	MCC	P	na	na	na	0	na	na	+	na
7.1	MCC	R	0	0	na	0	0	0	0	0
8.1	MCC	P	0	0	na	na	0	0	+	0
9.1	MCC	P	0	na	na	na	0	0	+	na
10.1	MCC	P	0	na	na	na	0	0	+	0
11.1	MCC	P	0	na	na	na	0	0	+	0
12.1	MCC	P	0	0	na	na	+	0	+	0
13.1	MCC	R	+	0	na	na	0	0	+	na
13.2	MCC	R	0	0	na	0	0	0	+	na
14.1	MCC	P	+	0	na	0	0	0	0	0
15.1	MCC	P	0	0	na	0	0	0	+	0
16.1	MCC	P	0	+	na	na	0	0	+	0
17.1	MCC	P	+	0	na	0	0	0	+	0
18.1	MCC	P	+	0	na	0	0	0	+	0

19.1 I	MCC	P	0	0	na	0	0	na	+	na
19.1 II	MCC	P	0	0	na	0	na	na	+	na
20.1	MCC	P	0	0	na	0	0	0	+	0
21.1	MCC	P	0	0	na	0	0	0	+	0
22.1	MCC	R	0	0	na	0	na	0	+	0
23.1	MCC	P	0	0	na	0	na	0	0	0
24.1	MCC	R	na	na	na	na	na	na	+	na
25.1	MCC	P	+	na	na	0	na	0	+	0
26.1	MCC	R	+	0	na	0	na	0	+	0
27.1	MCC	P	+	0	na	0	na	0	+	0
28.1	MCC	P	+	0	na	0	na	0	+	0
29.1	MCC	P	na	na	na	na	na	na	+	na
30.1	MCC	P	0	0	na	na	na	0	+	0
31.1	MCC	P	0	0	na	na	0	0	+	0
32.1	MCC	P	+	0	na	na	0	0	+	0
33.1	MCC	R	+	0	na	na	0	0	+	0
34.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	0
35.1	MCC	P	+	0	na	na	na	na	+	0
36.1	MCC	R	+	na	0	na	na	na	+	0
37.1	MCC	P	0	0	na	na	0	0	+	0
38.1	MCC	P	+	+	na	na	0	0	+	0
39.1	MCC	P	0	+	na	na	0	0	+	0
40.1	MCC	R	0	na	0	na	na	na	+	na
41.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	0
42.1	MCC	P	0	na	na	na	na	na	+	na
42.2	MCC	R	0	0	na	na	na	na	+	na
43.1	MCC	P	0	na	0	na	na	na	+	0
44.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	na
45.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	0
46.1	MCC	R	0	0	na	na	na	na	+	na
47.1	MCC	R	+	0	na	na	na	na	+	0

48.1	MCC	U	na	na	na	na	na	na	+	na
49.1	MCC	U	+	na	na	na	na	na	+	0
50.1	MCC	U	0	na	0	na	na	na	+	na
50.2	MCC	U	0	na	0	na	na	na	+	na
51.1	MCC	U	na	na	na	na	na	na	+	na
52.1	MCC	U	0	na	+	na	na	na	+	0
53.1	MCC	U	+	na	0	na	na	na	+	na
53.2	MCC	U	+	na	na	na	na	na	+	na
54.1	MCC	U	0	na	0	na	na	na	+	0
55.1	MCC	U	+	na	na	na	na	na	+	na
56.1	MCC	U	na	na	0	na	na	na	+	0
57.1	MCC	U	0	na	na	na	na	na	+	0
58.1	MCC	U	na	na	na	na	na	na	0	na
59.1	MCC	U	+	na	0	na	na	na	+	0
60.1	MCC	U	+	0	na	na	na	na	+	na
61.1	MCC	U	0	na	0	na	na	na	+	na
62.1	MCC	U	+	na	0	na	na	na	+	na
63.1	MCC	U	0	na	0	na	na	na	+	na
64.1	MCC	U	0	0	na	na	na	na	+	na
64.2	MCC	U	0	0	na	na	na	na	+	na
65.1	MCC	U	0	na	na	na	na	na	+	na
66.1	MCC	U	+	na	0	na	na	na	+	na
67.1	MCC	U	na	na	0	na	na	na	+	na
68.1 I	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	na
68.1 II	MCC	P	na	na	na	na	na	na	0	na
68.2 I	MCC	R	na	na	na	na	na	na	+	na
68.2 II	MCC	R	na	na	na	na	na	na	+	na
69.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	na
70.1	MCC	U	+	na	0	na	na	na	+	na
71.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	na
72.1	MCC	U	na	na	0	na	na	na	+	na

73.1	MCC	P	0	na	0	na	na	na	0	na
74.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	na
75.1	MCC	P	na	na	na	na	na	na	+	na
76.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	0	na
77.1	MCC	P	na	na	0	na	na	na	+	na
78.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	0	na
79.1	MCC	P	0	na	0	na	na	na	+	na
80.1	MCC	P	0	na	+	na	na	na	+	na
81.1	MCC	P	0	na	0	na	na	na	+	na
82.1	MCC	P	+	+	na	na	na	na	+	na
83.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	na
84.1 I	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	na
84.1 II	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	na
85.1	MCC	P	0	+	na	na	na	na	+	na
86.1	MCC	P	+	+	na	na	na	na	+	na
87.1	MCC	P	+	0	0	na	na	na	+	na
88.1	MCC	U	+	na	na	na	na	na	+	na
89.1	MCC	U	+	+	na	na	na	na	+	na
90.1	MCC	P	0	na	0	na	na	na	+	na
91.1	MCC	P	+	na	0	na	na	na	+	na

Die Tumorprobennummer setzt sich aus der Patientenummer und der individuellen Tumornummer zusammen. Römische Ziffern beschreiben dabei verschiedene Proben desselben Tumors. Die alternierende grau weiße Schattierung stellt je Schattierung einen einzelnen Tumor dar. MCC: *Merkel cell carcinoma* (Merkelzellkarzinom); P: primärer Tumor; R: Rezidiv; U: unklare P/R Zuordnung; +: vorhandene Methylierung, vorhandene virale Präsenz; 0: unmethyliert, keine virale Präsenz; na: nicht analysiert.

Tabelle 6-5: Ergebnisse der histologischen Charakterisierung, der Methylierungsanalysen von den Tumorsuppressorgenen *RASSF1A*, *CDKN2A* und *PTEN* sowie der viralen Präsenz von MCPyV (Merkelzellpolyomavirus) und SV40 (*Simian virus 40*) von 18 untersuchten kleinzelligen Lungenkarzinomen von 18 Patienten

SCLC	Histologische Charakterisierung		Methylierung von Tumorsuppressorgenen			Virale Präsenz	
	Tumortyp	P/LK	<i>RASSF1A</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>PTEN</i>	MCPyV	SV40
1	SCLC	P	+	0	0	0	0
2	SCLC	P	+	+	0	0	0
3	SCLC	P	+	+	0	0	0
4	SCLC	LK	+	0	na	+	0
5	SCLC	LK	+	+	0	+	0
6	SCLC + SCC	P	0	+	0	0	0
7	SCLC	P	+	+	0	+	0
8	SCLC	P	+	0	+	+	0
9	SCLC	P	+	0	+	0	0
10	SCLC	LK	+	0	0	0	0
11	SCLC	P	+	+	+	+	0
12	SCLC + SCC	P	+	0	0	0	0
13	SCLC	P	+	+	0	0	0
14	SCLC	LK	+	0	+	+	0
15	SCLC	P	+	+	+	0	0
16	SCLC	P	+	0	0	+	0
17	SCLC	P	+	+	0	0	0
18	SCLC	P	+	+	+	0	0

Die Tumorprobennummer entspricht Patientennummer. SCLC: *small cell lung cancer* (kleinzelliges Lungenkarzinom); SCC: *Squamous cell carcinoma* (Plattenepithelkarzinom); SCLC + SCC: Misch tumor aus kleinzelligem Lungen- und Plattenepithelkarzinom; P: primärer Tumor; LK: Lymphknoten; +: vorhandene Methylierung, vorhandene virale Präsenz; 0: unmethyliert, keine virale Präsenz; na: nicht analysiert.

6.2.4 Zusammenfassungen der Methylierungs- und Virusanalysen der Vergleichskontroll-Gewebe Nävuszellnävus-Gewebe und der Blutproben

Tabelle 6-6: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von den Tumorsuppressorgenen *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73* sowie der viralen Präsenz von MCPyV (Merkelzellpolyomavirus) und SV40 (*Simian virus 40*) von 18 untersuchten Nävuszellnävus-Gewebeproben von 18 Patienten

NZN	Methylierung von Tumorsuppressorgenen						Virale Präsenz	
Gewebeprobe	<i>RASSF1A</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>PTEN</i>	<i>FHIT</i>	<i>PTPRG</i>	<i>TP73</i>	MCPyV	SV40
1	0	0	0	+	0	0	0	0
2	0	0	na	0	0	0	+	na
3	0	0	na	0	na	na	0	na
4	0	0	0	0	0	0	0	na
5	0	+	+	+	0	0	0	0
6	0	+	0	0	0	0	0	0
7	0	0	na	0	na	na	0	na
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	+	0	0	+	0
10	0	+	0	0	0	0	0	0
11	0	0	na	0	na	na	0	0
12	na	na	na	na	na	na	0	na
13	0	0	na	0	na	na	0	0
14	0	0	na	0	na	na	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	+	0
17	0	0	na	0	na	na	0	0
18	0	na	na	0	na	na	0	0

Die Probennummer entspricht der Patientennummer. +: vorhandene Methylierung, vorhandene virale Präsenz; 0: unmethyliert, keine virale Präsenz; na: nicht analysiert.

Tabelle 6-7: Ergebnisse der Methylierungsanalysen von den Tumorsuppressorgenen *RASSF1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *FHIT*, *PTPRG* und *TP73* sowie der viralen Präsenz von MCPyV (Merkelzellpolyomavirus) und SV40 (*Simian virus 40*) von 26 untersuchten Blutproben von 26 Patienten

Blut	Methylierung von Tumorsuppressorgenen						Virale Präsenz	
Gewebeprobe	<i>RASSF1A</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>PTEN</i>	<i>FHIT</i>	<i>PTPRG</i>	<i>TP73</i>	MCPyV	SV40
1	0	0	0	+	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	+	0	0	0	0
4	0	+	0	+	0	0	0	0
5	0	0	0	+	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	+	0
8	0	+	0	0	0	0	0	0
9	na	na	na	na	na	na	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	na	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	na	na	na	na	na	na	0	0
14	na	na	na	na	na	na	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	na	0	0	na	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	+	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	+	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Probennummer entspricht der Patientennummer. +: vorhandene Methylierung, vorhandene virale Präsenz; 0: unmethyliert, keine virale Präsenz; na: nicht analysiert.

6.2.5 Zusammenfassung der Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier der malignen Melanome

Tabelle 6-8: Schätzwertgrößen der Ereignisanalyse nach Kaplan-Meier des Gesamtüberlebens und des Rezidiv freien Überlebens (nur signifikante Daten gezeigt)

Gesamtüberleben	Schätzwert ¹³	Standardfehler	95% KI	Probenumfang	p-Wert [†]
PTEN Methylierung				200	0,035*
keine Methylierung	110,15	6,94	96,56 – 123,74		
Methylierung	95,43	6,34	83,01 – 107,85		
gesamt	103,70	4,90	94,09 – 113,31		
basophile Degeneration				222	0,035*
keine oder geringe	109,18	5,04	99,31 – 119,06		
starke Degeneration	84,21	10,74	63,16 – 105,25		
gesamt	104,96	4,69	95,81 – 114,12		
akrale Lokalisierung				230	0,039*
keine akrale Lokalisierung	106,29	4,84	96,80 – 115,77		
akrale Lokalisierung	77,82	13,78	50,82 – 104,83		
gesamt	103,56	4,61	94,53 – 112,59		
Geschlecht				230	0,019*
Mann	92,96	6,61	80,00 – 105,91		
Frau	112,07	6,15	100,01 – 124,13		
gesamt	103,56	4,61	94,53 – 112,59		
Alter				230	<0,001***
<61,9 Jahre	123,62	5,99	111,88 – 135,36		
≥61,9 Jahre	83,56	6,15	71,50 – 95,62		
gesamt	103,56	4,61	94,53 – 112,59		
Tumordurchmesser				218	<0,001***
≤17 mm	126,64	5,63	115,61 – 137,67		
>17 mm	75,53	6,65	62,49 – 88,57		
gesamt	103,81	4,68	94,65 – 112,97		
Mitoseindex				209	0,001***
<0,4 / HPF	118,06	6,63	105,07 – 131,04		
≥0,4 / HPF	86,85	6,47	74,16 – 99,53		
gesamt	102,55	4,82	93,11 – 112,00		
Tumordicke				226	<0,001***
≤1,89 mm	130,96	5,59	120,01 – 141,91		
>1,89 mm	71,92	5,49	61,16 – 82,68		
gesamt	103,50	4,64	94,40 – 112,60		
Ulzeration				227	<0,001***
keine Ulzeration	115,54	5,78	104,20 – 126,87		
Ulzeration	85,93	6,44	73,31 – 98,54		
gesamt	102,61	4,63	93,54 – 111,68		
Tumortyp SSM				230	<0,001***
kein SSM	79,13	7,35	64,73 – 93,53		
SSM	117,86	5,40	107,28 – 128,45		
gesamt	103,56	4,61	94,53 – 112,59		
Tumortyp NMM				230	<0,001***
kein NMM	110,93	4,94	101,24 – 120,62		
NMM	66,87	9,24	48,77 – 84,98		
gesamt	103,56	4,61	94,53 – 112,59		

¹³ **Kaplan-Meier-Schätzwert:** Intervall der Überlebensfunktion in dem immer nur ein Ereignis bzw. Zensierung enthalten ist.

Infiltration Grad 1 oder 2 Grad 3 gesamt	96,45 122,89 103,47	5,31 8,67 4,63	86,05 – 106,85 105,88 – 139,89 94,39 – 112,54	228	0,008**
Rezidiv-freie-Überleben	Schätzwert	Standardfehler	95% KI	Probenumfang	p-Wert[†]
Geschlecht Mann Frau gesamt	99,29 120,45 111,39	7,82 6,69 5,19	83,96 – 114,62 107,34 – 133,57 101,21 – 121,57	230	0,045*
Tumordurchmesser ≤17 mm >17 mm gesamt	128,22 92,88 112,47	6,43 8,28 5,32	115,63 – 140,82 76,64 – 109,11 102,03 – 122,90	218	<0,001***
Mitoseindex <0,4 / HPF ≥0,4 / HPF gesamt	122,55 92,42 107,66	7,27 7,88 5,52	108,31 – 136,79 76,98 – 107,86 96,85 – 118,47	209	0,003**
Tumordicke ≤1,89 mm >1,89 mm gesamt	146,97 63,53 110,30	5,43 6,50 5,26	136,33 – 157,61 50,80 – 76,27 99,98 – 120,62	226	<0,001***
Ulzeration keine Ulzeration Ulzeration gesamt	131,13 81,23 109,65	5,96 7,61 5,27	119,44 – 142,82 66,32 – 96,14 99,32 – 119,99	227	<0,001***
Tumortyp SSM kein SSM SSM gesamt	84,33 123,42 110,53	9,22 6,05 5,22	66,25 – 102,40 111,56 – 135,27 100,30 – 120,77	230	<0,001***
Tumortyp NMM kein NMM NMM gesamt	120,64 54,15 110,53	5,48 10,37 5,22	109,89 – 131,38 33,82 – 74,49 100,30 – 120,77	230	<0,001***
Infiltration Grad 1 oder 2 Grad 3 gesamt	100,96 140,00 111,43	6,18 8,33 5,23	88,85 – 113,06 123,68 – 156,32 101,18 – 121,69	228	0,001***

KI: Konfidenzintervall (95%); †: Log Rank/Mantel-Cox Test; *: $p \leq 0,05$ signifikant; **: $p \leq 0,01$ hoch signifikant; ***: $p \leq 0,001$ höchst signifikant; SSM: *superficial spreading melanoma* (oberflächlich spreitendes Melanom); NMM: *nodular malignant melanoma* (noduläres malignes Melanom).

7 Literaturverzeichnis

Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y (1999). Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* **399**: 809-13.

Akslen LA, Angelini S, Straume O, Bachmann IM, Molven A, Hemminki K *et al* (2005). BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol* **125**: 312-7.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA *et al* (2007). Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* **81**: 4130-6.

Autier P, Dore JF (1998). Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Int J Cancer* **77**: 533-7.

Aviel S, Winberg G, Massucci M, Ciechanover A (2000). Degradation of the epstein-barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem* **275**: 23491-9.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG *et al* (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **19**: 3635-48.

Bartsch D, Shevlin DW, Tung WS, Kisker O, Wells SA, Jr., Goodfellow PJ (1995). Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **14**: 189-95.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG (2001). Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* **10**: 687-92.

Beasley MB, Brambilla E, Travis WD (2005). The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* **40**: 90-7.

Becker J, Mauch C, Kortmann RD, Keilholz U, Bootz F, Garbe C *et al* (2008). Short German guidelines: Merkel cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges* **6 Suppl 1**: S15-6.

Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pfohler C, Schrama D (2009). MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol* **129**: 248-50.

Berking C (2005). [The role of ultraviolet irradiation in malignant melanoma]. *Hautarzt* **56**: 687-96; quiz 697.

- Besaratinia A, Pfeifer GP (2008). Sunlight ultraviolet irradiation and BRAF V600 mutagenesis in human melanoma. *Hum Mutat* **29**: 983-91.
- Bestor TH (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**: 2395-402.
- Brambilla E (1999). [WHO 1999 classification of lung cancers: a guided tour]. *Ann Pathol* **19**: S47-9.
- Breathnach AS (1971). The Herman Beerman lecture: embryology of human skin, a review of ultrastructural studies. *J Invest Dermatol* **57**: 133-43.
- Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG *et al* (1997). Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* **57**: 4997-5000.
- Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB *et al* (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* **8**: 27-32.
- Carnero A (2010). The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des* **16**: 34-44.
- Castell JV, Geiger T, Gross V, Andus T, Walter E, Hirano T *et al* (1988). Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *Eur J Biochem* **177**: 357-61.
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE *et al* (2003). Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* **95**: 399-409.
- Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* **127**: 1550-7.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* **22**: 2990-7.
- Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* **29**: 705-27.
- Cox DR (1972). Regression Models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*: 187-220.
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* **25**: 315-9.
- Dammann R, Takahashi T, Pfeifer GP (2001). The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* **20**: 3563-7.
- de Braud F, Khayat D, Kroon BB, Valdagni R, Bruzzi P, Cascinelli N (2003). Malignant melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* **47**: 35-63.

- de Vos S, Brach M, Budnik A, Grewe M, Herrmann F, Krutmann J (1994). Post-transcriptional regulation of interleukin-6 gene expression in human keratinocytes by ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol* **103**: 92-6.
- Deng T, Kuang Y, Wang L, Li J, Wang Z, Fei J (2009). An essential role for DNA methyltransferase 3a in melanoma tumorigenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **387**: 611-6.
- Di Cristofano A, Pandolfi PP (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* **100**: 387-90.
- Dirmeier U, Hoffmann R, Kilger E, Schultheiss U, Briseno C, Gires O *et al* (2005). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* **24**: 1711-7.
- Doll R, Hill AB (1952). A study of the aetiology of carcinoma of the lung. *Br Med J* **2**: 1271-86.
- Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I (1994). Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ* **309**: 901-11.
- Eftekhari F, Wallace S, Silva EG, Lenzi R (1996). Merkel cell carcinoma of the skin: imaging and clinical features in 93 cases. *Br J Radiol* **69**: 226-33.
- Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Blake SM, Dawson CW, Young LS (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* **274**: 16085-96.
- Eliopoulos AG, Young LS (2001). LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* **11**: 435-44.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**: 1096-100.
- Floettmann JE, Rowe M (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation. *Oncogene* **15**: 1851-8.
- Furuta J, Nobeyama Y, Umabayashi Y, Otsuka F, Kikuchi K, Ushijima T (2006). Silencing of Peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. *Cancer Res* **66**: 6080-6.
- Garbe C, Blum A (2001). Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14**: 280-90.
- Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H *et al* (1995). Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* **75**: 2492-8.
- Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G *et al* (2007). Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* **3**: e64.

Gires O, Zimber-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R *et al* (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* **16**: 6131-40.

Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* **126**: 154-60.

Goepfert H, Remmler D, Silva E, Wheeler B (1984). Merkel cell carcinoma (endocrine carcinoma of the skin) of the head and neck. *Arch Otolaryngol* **110**: 707-12.

Gould VE, Moll R, Moll I, Lee I, Franke WW (1985). Neuroendocrine (Merkel) cells of the skin: hyperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab Invest* **52**: 334-53.

Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, Bocking A, Kappes R, Gabbert HE *et al* (2006). Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer. *Cancer* **108**: 129-34.

Hachana M, Trimeche M, Ziadi S, Amara K, Korbi S (2009). Evidence for a role of the Simian Virus 40 in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **113**: 43-58.

Hagiwara K, McMenamin MG, Miura K, Harris CC (1999). Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res* **59**: 4165-9.

Hall HI, May DS, Lew RA, Koh HK, Nadel M (1997). Sun protection behaviors of the U.S. white population. *Prev Med* **26**: 401-7.

Hammerschmidt W, Sugden B, Baichwal VR (1989). The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J Virol* **63**: 2469-75.

Hammond EC (1966). Smoking in relation to the death rates of one million men and women. *Natl Cancer Inst Monogr* **19**: 127-204.

Hartschuh W, Grube D (1979). The Merkel cell--a member of the APUD cell system. Fluorescence and electron microscopic contribution to the neurotransmitter function of the Merkel cell granules. *Arch Dermatol Res* **265**: 115-22.

Hartschuh W, Weihe E, Yanaihara N, Reinecke M (1983). Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the Merkel cell. *J Invest Dermatol* **81**: 361-4.

Hashimoto K (1972). The ultrastructure of the skin of human embryos. X. Merkel tactile cells in the finger and nail. *J Anat* **111**: 99-120.

Helmbold P, Lautenschlager C, Marsch W, Nayak RC (2006). Detection of a physiological juvenile phase and the central role of pericytes in human dermal microvascular aging. *J Invest Dermatol* **126**: 1419-21.

- Hendrich B, Bird A (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**: 6538-47.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE *et al* (1995). Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* **55**: 4525-30.
- Herold G, Beckers H, Braun RP, Deuss U, Drexler H, Germing U *et al* (2006). Pneumologie, Bronchialkarzinom. *Innere Medizin Kapitel III*: 311-315.
- Hitchcock CL, Bland KI, Laney RG, 3rd, Franzini D, Harris B, Copeland EM, 3rd (1988). Neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin. Its natural history, diagnosis, and treatment. *Ann Surg* **207**: 201-7.
- Hodge DR, Peng B, Cherry JC, Hurt EM, Fox SD, Kelley JA *et al* (2005). Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res* **65**: 4673-82.
- Hodge DR, Xiao W, Clausen PA, Heidecker G, Szyf M, Farrar WL (2001). Interleukin-6 regulation of the human DNA methyltransferase (HDNMT) gene in human erythroleukemia cells. *J Biol Chem* **276**: 39508-11.
- Hodgson NC (2005). Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol* **89**: 1-4.
- Hong TM, Yang PC, Peck K, Chen JJ, Yang SC, Chen YC *et al* (2000). Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**: 355-63.
- Hou J, Jensen P, Major E, zur Hausen H, Almeida J, van der Noordaa D *et al* (2005). Polyomaviridae. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.: 231-238.
- Hyde L, Yee J, Wilson R, Patno ME (1965). Cell Type and the Natural History of Lung Cancer. *JAMA* **193**: 52-4.
- Iannuzzi MC, Scoggin CH (1986). Small cell lung cancer. *Am Rev Respir Dis* **134**: 593-608.
- Ittmann M (1996). Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* **56**: 2143-7.
- Jaenisch R, Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**: 245-54.
- Jakobovits EB, Bratosin S, Aloni Y (1980). A nucleosome-free region in SV40 minichromosomes. *Nature* **285**: 263-5.
- Jeltsch A (2002). Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* **3**: 274-93.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C *et al* (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* **56**: 106-30.

- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M (2002). Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **52**: 23-47.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E *et al* (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* **54**: 8-29.
- Jin B, Yao B, Li JL, Fields CR, Delmas AL, Liu C *et al* (2009). DNMT1 and DNMT3B modulate distinct polycomb-mediated histone modifications in colon cancer. *Cancer Res* **69**: 7412-21.
- Jost CA, Marin MC, Kaelin WG, Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* **389**: 191-4.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A *et al* (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**: 809-19.
- Kaplan EL, Meier P (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* **53**: 457-481.
- Kassem A, Schopflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M *et al* (2008). Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res* **68**: 5009-13.
- Kirnbauer R, Kock A, Neuner P, Forster E, Krutmann J, Urbanski A *et al* (1991). Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J Invest Dermatol* **96**: 484-9.
- Knippers R (1990). Molekulare Genetik. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*.
- Knudson AG, Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 820-3.
- Koriyama C, Kitajima S, Nomoto M, Sueyoshi K, Itoh T, Eizuru Y *et al* (2004). Loss of p16/CDKN2A protein in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Oncology* **67**: 81-7.
- Krasagakis K, Tosca AD (2003). Overview of Merkel cell carcinoma and recent advances in research. *Int J Dermatol* **42**: 669-76.
- Lahtz C, Helmbold P, Enk A, Herrmann-Trost P, Marsch W, Kutzner H *et al* (2009a). Frequent occurrence of RASSF1A promoter hypermethylation and Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Mol Carcinog* **48**: 903-9.
- Lahtz C, Helmbold P, Herpel E, Schnabel PA, Dammann RH (2009b). Frequent hypermethylation of RASSF1A tumour suppressor gene promoter and presence of Merkel cell polyomavirus in small cell lung cancer. *Eur J Cancer* **45**: 2207-11.
- Lahtz C, Stranzenbach R, Fiedler E, Helmbold P, Dammann RH (2010). Methylation of PTEN as a prognostic factor in malignant melanoma of the skin. *J Invest Dermatol* **130**: 620-2.

- Laird PW (2005). Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**: R65-76.
- Lassacher A, Heitzer E, Kerl H, Wolf P (2008). p14ARF hypermethylation is common but INK4a-ARF locus or p53 mutations are rare in Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol* **128**: 1788-96.
- Lemos B, Nghiem P (2007). Merkel cell carcinoma: more deaths but still no pathway to blame. *J Invest Dermatol* **127**: 2100-3.
- Li HP, Chang YS (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci* **10**: 490-504.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI *et al* (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**: 1943-7.
- Liggett WH, Jr., Sidransky D (1998). Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* **16**: 1197-206.
- Liu L, Zhang J, Bates S, Li JJ, Peehl DM, Rhim JS *et al* (2005). A methylation profile of in vitro immortalized human cell lines. *Int J Oncol* **26**: 275-85.
- Lo AK, Liu Y, Wang XH, Huang DP, Yuen PW, Wong YC *et al* (2003). Alterations of biologic properties and gene expression in nasopharyngeal epithelial cells by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Lab Invest* **83**: 697-709.
- Lomas J, Aminoso C, Gonzalez-Gomez P, Eva Alonso M, Arjona D, Lopez-Marin I *et al* (2004). Methylation status of TP73 in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* **148**: 148-51.
- Lorenz J (1994). Neue zellbiologische Erkenntnisse zur Entstehung des Bronchialkarzinoms. *Der Internist* **35. Auflage**: 692-699.
- Man C, Rosa J, Lee LT, Lee VH, Chow BK, Lo KW *et al* (2007). Latent membrane protein 1 suppresses RASSF1A expression, disrupts microtubule structures and induces chromosomal aberrations in human epithelial cells. *Oncogene* **26**: 3069-80.
- Mansson-Brahme E, Carstensen J, Erhardt K, Lagerlof B, Ringborg U, Rutqvist LE (1994). Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. *Cancer* **73**: 2324-32.
- Mantel N (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* **50**: 163-70.
- Martin RG (1981). The transformation of cell growth and transmutation of DNA synthesis by simian virus 40. *Adv Cancer Res* **34**: 1-68.
- Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M, Jose Garcia M, Nomdedeu J, Rivas C *et al* (2002). Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or LOH in non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer* **102**: 15-9.

- McCarthy EM, Ethridge KP, Wagner RF, Jr. (1999). Beach holiday sunburn: the sunscreen paradox and gender differences. *Cutis* **64**: 37-42.
- McLaughlin JK, Hrubec Z, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. (1995). Smoking and cancer mortality among U.S. veterans: a 26-year follow-up. *Int J Cancer* **60**: 190-3.
- Medina-Franco H, Urist MM, Fiveash J, Heslin MJ, Bland KI, Beenken SW (2001). Multimodality treatment of Merkel cell carcinoma: case series and literature review of 1024 cases. *Ann Surg Oncol* **8**: 204-8.
- Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH (2002). p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **2**: 605-15.
- Merkel F (1875). Tastzellen und Tastkörperchen bei den Haustieren und beim Menschen. *Arch. Mikrosk. Anat.* **11**: 636-652.
- Mikhail M, Velazquez E, Shapiro R, Berman R, Pavlick A, Sorhaindo L *et al* (2005). PTEN expression in melanoma: relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation. *Clin Cancer Res* **11**: 5153-7.
- Miller RW, Rabkin CS (1999). Merkel cell carcinoma and melanoma: etiological similarities and differences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**: 153-8.
- Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T *et al* (2006). Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res* **66**: 6546-52.
- Moll I (1994). Die Merkelzelle. *Hautarzt* **45**: 352-358.
- Moll R, Moll I, Franke WW (1984). Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. *Differentiation* **28**: 136-54.
- Montero-Julian FA, Klein B, Gautherot E, Brailly H (1995). Pharmacokinetic study of anti-interleukin-6 (IL-6) therapy with monoclonal antibodies: enhancement of IL-6 clearance by cocktails of anti-IL-6 antibodies. *Blood* **85**: 917-24.
- Mountain CF (1997). Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* **111**: 1710-7.
- Mukai F, Hawryluk I, Shapiro R (1970). The mutagenic specificity of sodium bisulfite. *Biochem Biophys Res Commun* **39**: 983-8.
- Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH *et al* (1997). P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9052-7.
- Narisawa Y, Hashimoto K (1991). Immunohistochemical demonstration of nerve-Merkel cell complex in fetal human skin. *J Dermatol Sci* **2**: 361-70.
- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368**: 753-6.

- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-57.
- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA (1997). Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* **47**: 5-27.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**: 153-6.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108.
- Pearse AG (1968). Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial C cells and calcitonin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **170**: 71-80.
- Pearse AG (1980). The neuroendocrine (APUD) cells of the skin. *Am J Dermatopathol* **2**: 121-3.
- Peltecu G, Bari M, Lancu G, Popa F (2009). Human papilloma virus and cervical preinvasive disease. *J Med Life* **2**: 373-7.
- Perniciaro C (1997). Dermatopathologic variants of malignant melanoma. *Mayo Clin Proc* **72**: 273-9.
- Pfeifer GP, Dammann R (2005). Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)* **70**: 576-83.
- Popp S, Waltering S, Herbst C, Moll I, Boukamp P (2002). UV-B-type mutations and chromosomal imbalances indicate common pathways for the development of Merkel and skin squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* **99**: 352-60.
- Poste G, Fidler IJ (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* **283**: 139-46.
- Pschyrembel (2007). Klinisches Wörterbuch. *De Gruyter, Berlin* **261. Auflage**.
- Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW (2005). Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. *Am Fam Physician* **72**: 269-76.
- Reifenberger J, Knobbe CB, Sterzinger AA, Blaschke B, Schulte KW, Ruzicka T *et al* (2004). Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *Int J Cancer* **109**: 377-84.
- Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH (2009). The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta* **1796**: 114-28.
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA *et al* (1999). The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* **27**: 2291-8.

- Robertson KD, Wolffe AP (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* **1**: 11-9.
- Rocco JW, Sidransky D (2001). p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* **264**: 42-55.
- Rodriguez C, Borgel J, Court F, Cathala G, Forne T, Piette J (2010). CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the INK/ARF locus. *Biochem Biophys Res Commun* **392**: 129-34.
- Roll JD, Rivenbark AG, Jones WD, Coleman WB (2008). DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer* **7**: 15.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA *et al* (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-4.
- Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S (2002). Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10060-5.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Shah KV (2007). SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int J Cancer* **120**: 215-23.
- Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE (1973). Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem* **248**: 4060-4.
- Sherr CJ (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-7.
- Shimosato Y (2002). [Histological Typing of Lung and Pleural Tumors (3rd edition, 1999): Malignant epithelial tumors]. *Nippon Rinsho* **60 Suppl 5**: 123-31.
- Silva EG, Mackay B, Goepfert H, Burgess MA, Fields RS (1984). Endocrine carcinoma of the skin (Merkel cell carcinoma). *Pathol Annu* **19 Pt 2**: 1-30.
- Sogo JM, Stahl H, Koller T, Knippers R (1986). Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J Mol Biol* **189**: 189-204.
- Sozzi G, Alder H, Tornielli S, Corletto V, Baffa R, Veronese ML *et al* (1996). Aberrant FHIT transcripts in Merkel cell carcinoma. *Cancer Res* **56**: 2472-4.
- Spugnardi M, Tommasi S, Dammann R, Pfeifer GP, Hoon DS (2003). Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma. *Cancer Res* **63**: 1639-43.

- Stahl H, Bauer M, Knippers R (1983). The simian-virus-40 large-tumor antigen in replicating viral chromatin. A salt-resistant protein-DNA interaction. *Eur J Biochem* **134**: 55-61.
- Stahl H, Knippers R (1983). Simian virus 40 large tumor antigen on replicating viral chromatin: tight binding and localization on the viral genome. *J Virol* **47**: 65-76.
- Stiewe T (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **7**: 165-8.
- Stillman B (1989). Initiation of eukaryotic DNA replication in vitro. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 197-245.
- Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D *et al* (1995). Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* **55**: 2988-94.
- Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA (2002). Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* **161**: 229-37.
- Sunahara M, Shishikura T, Takahashi M, Todo S, Yamamoto N, Kimura H *et al* (1999). Mutational analysis of p51A/TAp63gamma, a p53 homolog, in non-small cell lung cancer and breast cancer. *Oncogene* **18**: 3761-5.
- Surani MA (1998). Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell* **93**: 309-12.
- Suzuki M, Toyooka S, Shivapurkar N, Shigematsu H, Miyajima K, Takahashi T *et al* (2005). Aberrant methylation profile of human malignant mesotheliomas and its relationship to SV40 infection. *Oncogene* **24**: 1302-8.
- Thomas-Ahner JM, Wulff BC, Tober KL, Kusewitt DF, Riggenbach JA, Oberyszyn TM (2007). Gender differences in UVB-induced skin carcinogenesis, inflammation, and DNA damage. *Cancer Res* **67**: 3468-74.
- Titcomb CP, Jr. (2001). High incidence of nasopharyngeal carcinoma in Asia. *J Insur Med* **33**: 235-8.
- Toyooka S, Pass HI, Shivapurkar N, Fukuyama Y, Maruyama R, Toyooka KO *et al* (2001a). Aberrant methylation and simian virus 40 tag sequences in malignant mesothelioma. *Cancer Res* **61**: 5727-30.
- Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, Virmani AK, Girard L, Miyajima K *et al* (2001b). DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther* **1**: 61-7.
- Tsai CN, Tsai CL, Tse KP, Chang HY, Chang YS (2002). The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10084-9.

Tsao SW, Wang X, Liu Y, Cheung YC, Feng H, Zheng Z *et al* (2002). Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes. *Biochim Biophys Acta* **1590**: 150-8.

van Doorn R, Zoutman WH, Dijkman R, de Menezes RX, Commandeur S, Mulder AA *et al* (2005). Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma: promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including BCL7a, PTPRG, and p73. *J Clin Oncol* **23**: 3886-96.

Van Gele M, Boyle GM, Cook AL, Vandesompele J, Boonefaes T, Rottiers P *et al* (2004). Gene-expression profiling reveals distinct expression patterns for Classic versus Variant Merkel cell phenotypes and new classifier genes to distinguish Merkel cell from small-cell lung carcinoma. *Oncogene* **23**: 2732-42.

Van Gele M, Kaghad M, Leonard JH, Van Roy N, Naeyaert JM, Geerts ML *et al* (2000). Mutation analysis of P73 and TP53 in Merkel cell carcinoma. *Br J Cancer* **82**: 823-6.

Van Gele M, Speleman F, Vandesompele J, Van Roy N, Leonard JH (1998). Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in Merkel cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* **58**: 1503-8.

Varshavsky AJ, Sundin O, Bohn M (1979). A stretch of "late" SV40 viral DNA about 400 bp long which includes the origin of replication is specifically exposed in SV40 minichromosomes. *Cell* **16**: 453-66.

Vasef MA, Ferlito A, Weiss LM (1997). Nasopharyngeal carcinoma, with emphasis on its relationship to Epstein-Barr virus. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **106**: 348-56.

Veness MJ, Harris D (2007). Role of radiotherapy in the management of organ transplant recipients diagnosed with non-melanoma skin cancers. *Australas Radiol* **51**: 12-20.

Vokes EE, Liebowitz DN, Weichselbaum RR (1997). Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* **350**: 1087-91.

von Figura G, Lenhard Rudolph K (2009). Krebs und Alter - biologische Grundlagen. *Onkologie* **32**: 34-38.

Wang J, Bhutani M, Pathak AK, Lang W, Ren H, Jelinek J *et al* (2007a). Delta DNMT3B variants regulate DNA methylation in a promoter-specific manner. *Cancer Res* **67**: 10647-52.

Wang L, Wang J, Sun S, Rodriguez M, Yue P, Jang SJ *et al* (2006). A novel DNMT3B subfamily, DeltaDNMT3B, is the predominant form of DNMT3B in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* **29**: 201-7.

Wang Y, Yu Z, Wang T, Zhang J, Hong L, Chen L (2007b). Identification of epigenetic aberrant promoter methylation of RASSF1A in serum DNA and its clinicopathological significance in lung cancer. *Lung Cancer* **56**: 289-94.

Winkelman RK (1977). The Merkel cell system and a comparison between it and the neurosecretory or APUD cell system. *J Invest Dermatol* **69**: 41-6.

- Winkelman RK, Breathnach AS (1973). The Merkel cell. *J Invest Dermatol* **60**: 2-15.
- Witcher M, Emerson BM (2009). Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell* **34**: 271-84.
- Yang J, Deng X, Deng L, Gu H, Fan W, Cao Y (2004). Telomerase activation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is associated with c-Myc expression in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Exp Clin Cancer Res* **23**: 495-506.
- Yang X, He Z, Xin B, Cao L (2000). LMP1 of Epstein-Barr virus suppresses cellular senescence associated with the inhibition of p16INK4a expression. *Oncogene* **19**: 2002-13.
- Zaika A, Irwin M, Sansome C, Moll UM (2001). Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem* **276**: 11310-6.
- Zhou L, Jiang W, Ren C, Yin Z, Feng X, Liu W *et al* (2005). Frequent hypermethylation of RASSF1A and TSLC1, and high viral load of Epstein-Barr Virus DNA in nasopharyngeal carcinoma and matched tumor-adjacent tissues. *Neoplasia* **7**: 809-15.
- Zhou XP, Gimm O, Hampel H, Niemann T, Walker MJ, Eng C (2000). Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am J Pathol* **157**: 1123-8.
- Zhu J, Jiang J, Zhou W, Chen X (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* **58**: 5061-5.
- Zhu WG, Otterson GA (2003). The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **3**: 187-99.
- zur Hausen H (2008). Novel human polyomaviruses--re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int J Cancer* **123**: 247-50.
- zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I (1975). Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol*: 569-71.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die trotz Ihrer Erkrankung zustimmten, dass an Ihrer Erkrankung Erkenntnisse gewonnen werden dürfen, die eventuell zukünftigen Generationen helfen können. Ich finde, dass es oft vergessen wird für was wir eigentlich forschen, dass wir eigentlich für das Wohl der Menschen forschen, die uns umgeben, und für das Wissen um das „Wie und Warum“ und nicht für Publikationen. Wenn man ab und an einen Schritt zurück macht, um das große Ganze besser zu sehen, wird man manchmal mit einer größeren Sichtweise der Welt belohnt. Ich bedanke mich bei den Menschen, die unweigerlich hinter dieser Arbeit stehen, aber nur selten Erwähnung finden. Danke!

Natürlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dammann für die unglaublich, sowohl wissenschaftlich als auch menschlich, lehrreiche und schöne Zeit, die ich unter seiner Leitung wissenschaftlich tätig sein durfte, bedanken.

Ich bedanke mich ebenso bei Herrn Prof. Dr. Renkawitz und dem ganzen Institut für Genetik, für die herzliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit.

Dann ist da natürlich noch unser magisches Quintett Antje die Flitzige, Conny die Schlaflose, Jule die Strebsame und natürlich Johannes der Ausdauernde. Danke für die schönste Zeit meines Lebens und die schönen Abende in der Labor-WG beim Gläschen Wein. Ihr konntet mich nicht bekehren ;-) Und Ihr werdet mir alle sehr fehlen.

Tja Antje an dich ein Besonderer Dank für die tiefgründigen Gespräche und Erkenntnisse auf den verschiedensten Gebieten des Lebens.

Weiter möchte ich den Musikern, die mir doch so manche Abende im Labor verschönerten und bei der dritten Etage, mit Ihrem wundervollen Ausblick über Gießens Natur, danken

Ich bedanke mich ebenfalls bei Frau Iwan für die große Hilfsbereitschaft und die überaus schnellen Korrekturen dieser Arbeit.

Am Schluss möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Freundin Inga und Freunden dafür bedanken, dass sie während der Zeit meiner Arbeit immer ein offenes Ohr für mich hatten und grade am Schluss in der Lage waren mich aufzubauen und meine Launen zu ertragen.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Christoph Lahtz