

**Identifikation von differentiell exprimierten Genen beim
metastasierenden Melanom im Vergleich zum Primärtumor**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Olga Isabel Fonseca da Cruz Lopes

aus Sindelfingen

2004

Tag der mündlichen Prüfung:	09.08.2004
Dekan:	Herr Prof. Dr. H. O. Schnitzler
1. Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. N. Blin
2. Berichterstatter:	Frau PD Dr. rer. nat. B. Schittek

Abb.	Abbildung
ALM	Akrolentiginöses Melanom
amp.	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
β -Gal	Beta-Galaktosidase
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
bidest.	doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKN	Cyclin dependent kinase inhibitor
Ci	Curie
CTP	Cytosintriphosphat
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dbpB	DNA-bindendes Protein B
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
<i>et al.</i> ,	<i>et aliter</i>
EST	Expressed sequence tag
FAMM	Familial atypical multiple mole melanoma
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
g	Gramm
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLA	Human leucocyte antigen
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	Beta-Galaktosidase
LB	Luria-Broth
LMM	Lentiginöses malignes Melanom
M	Molar
mA	Milliampere
MDR	Multidrug resistance
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min.	Minute(n)
ml	Milliliter

MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
μ	Mikro
NM	Noduläres Melanom
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffered saline
PRAME	Preferentially expressed in melanoma
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
Rb	Retinoblastom
RGP	Radial growth phase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Sek.	Sekunden
SSC	Kochsalz-Natriumcitrat-Puffer
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
TRP	Tyrosinase related protein
U	Einheit(en)
üN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen in der Minute
UTS	Untranslatierte Sequenz
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VGP	Vertical growth phase
Vol.	Volumen
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid
X-Phosphat	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz

Verwendete Anglizismen

Begriffe, die aus dem angelsächsischen stammen, häufig aber im deutschen Sprachgebrauch verwendet werden, sind hier in Kürze beschrieben. In der vorliegenden Arbeit werden sie jedoch in der ursprünglichen Form verwendet.

Blot	Transfer einer bestimmten Substanz auf eine Membran
Enhancer	cis-regulatorische Abschnitte eines Gens, welche die Aktivität des Promotors steuern
Kit	Kommerziell erhältliches Materialienset zur Durchführung eines Versuchsansatzes
Primer	Starter; kurzes synthetisches Oligonukleotid

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
I.1.1	Die Epidemiologie des malignen Melanoms	1
I.1.2	Entstehung und Progression des malignen Melanoms	2
I.1.3	Genetische Grundlagen der Entstehung und Progression des malignen Melanoms	5
I.1.3.1	Nukleäre Proteine	5
I.1.3.1.1	<i>Komponenten von Signaltransduktionswegen</i>	5
I.1.3.1.2	<i>Transkriptionsfaktoren</i>	8
I.1.3.2	Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden	11
I.1.3.2.1	<i>Integrine</i>	11
I.1.3.2.2	<i>Cadherine</i>	12
I.1.3.2.3	<i>Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie</i>	13
I.1.3.3	Matrixmetalloproteinasen	14
I.1.3.4	Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren	15
I.1.3.4.1	<i>Angiogenesefaktoren</i>	15
I.1.3.4.2	<i>Wachstumsfaktoren</i>	17
I.1.3.5	Antiapoptotische und proapoptotische Faktoren	18
I.2	Zielsetzung	21
II	Material und Methoden	22
II.1	Materialien	22
II.1.1	Lösungen	22
II.1.2	Medien und Platten	25
II.1.3	Bakterienstämme	26
II.1.4	Plasmidvektoren	26
II.1.4.1	<i>PCR 2.1</i>	26
II.1.4.2	<i>pBluescript SK</i>	27
II.1.5	Verwendete molekularbiologische Kits	27
II.1.6	Oligonukleotide	28
II.1.7	Antikörper	29
II.1.8	Datenprogramme	29
II.2	Zellbiologische Methoden	30
II.2.1	Kultivierung von Zelllinien	30

II.3	Molekularbiologische Methoden	30
II.3.1	Isolierung reiner Tumorzellen über Laser Capture Mikrodisektion	30
	<i>II.3.1.1 Selektion des Gewebematerials für die Laser</i>	
	<i>Capture Mikrodisektion</i>	31
	<i>II.3.1.2 HE (Hematoxillin & Eosin Y) Färbung</i>	32
	<i>II.3.1.3 RNA-Isolierung aus mikrodisektierten Zellen</i>	32
II.3.2	RNA Isolierung.....	33
	<i>II.3.2.1 RNase freies Arbeiten</i>	33
	<i>II.3.2.2 RNA Isolierung aus Zelllinien</i>	33
	<i>II.3.2.2.1 cDNA Herstellung aus Zelllinien</i>	34
II.3.3	Überblick der SMART TM PCR cDNA Synthese	34
	<i>II.3.3.1 SMART Erststrang cDNA Synthese</i>	36
	<i>II.3.3.2 cDNA Anreicherung über LD PCR Amplifizierung</i>	36
	<i>II.3.3.3 Aufreinigung der PCR Produkte</i>	38
	<i>II.3.3.4 Qualitätskontrolle der über SMART synthetisierten</i>	
	<i>cDNA's (PCR)</i>	38
II.3.4	PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung	38
	<i>II.3.4.1 Doppelsträngige cDNA Synthese der Positiv Kontrolle</i>	41
	<i>II.3.4.2 RsaI Restriktionsverdau</i>	42
	<i>II.3.4.3 Adaptorligation</i>	42
	<i>II.3.4.4 Kontrolle der Adaptorligation mittels PCR</i>	43
	<i>II.3.4.5 Tester-Treiber-Hybridisierung</i>	44
	<i>II.3.4.6 Anreicherung der differentiellen cDNA's</i>	45
	<i>II.3.4.7 Analyse der Subtraktionseffizienz über semiquantitative PCR</i>	46
II.3.5	Klonierung der subtrahierten differentiellen PCR Produkte	47
	<i>II.3.5.1 Herstellung eines T/A Vektors</i>	47
	<i>II.3.5.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen</i>	48
	<i>II.3.5.3 Ligation</i>	48
	<i>II.3.5.4 Transformation in kompetenten Bakterien</i>	48
II.3.6	Kolonie-PCR	49
	<i>II.3.6.1 Anfertigung von Bakterienstocks</i>	49
II.3.7	Screening der klonierten Subtraktionsprodukte	49
	<i>II.3.7.1 Herstellung Digoxigenin markierter Subtraktions- und</i>	
	<i>cDNA Sonden</i>	49

II.3.7.2 Nicht radioaktive Detektion	51
II.3.7.3 Screening von cDNA Arrays	51
II.3.8 Isolierung von Plasmid DNA	52
II.3.8.1 Plasmid Miniprep.....	52
II.3.8.2 Plasmid Midiprep.....	52
II.3.9 Sequenzierung von DNA nach Sanger	53
II.3.9.1 BLAST Search	54
II.3.10 Charakterisierung der isolierten Gene mittels Northern Blot.....	54
II.3.10.1 Herstellung spezifischer DIG markierter Gensonden.....	54
II.3.10.2 Herstellung einer 28S Oligonukleotid-Sonde	55
II.3.10.3 Northern Blot, RNA-Gel.....	55
II.3.10.4 Northern Hybridisierung	56
II.4 Histologische Methoden	56
II.4.1 Immunhistologie	56
II.4.2 <i>In situ</i> Hybridisierung an Paraffinschnitten.....	58
II.4.2.1 Dephosphorylierung des Vektors pBluescript SKII mit CIP.....	58
II.4.2.2 Umklonierung des Laminin Rezeptors 1	58
II.4.2.3 <i>In vitro</i> Transkription.....	59
II.4.2.4 <i>In situ</i> Hybridisierung	59
II.5 Proteinanalytische Methoden	60
II.5.1 FACS-Analysen.....	60
III Ergebnisse	61
III.1 Übersicht	61
III.2 Isolierung reiner Melanomzellen aus dem Gewebeverband über Laser Capture Mikrodissektion	62
III.2.1 Gewebeauswahl für die Laser Capture Mikrodissektion.....	62
III.2.2 Isolierung der Melanomzellen aus Lymphknotenmetastasengewebe	63
III.2.3 Isolierung der Melanomzellen aus Primärmelanomgewebe.....	65
III.2.4 RNA Extraktion aus mikrodissektierten Melanomzellen.....	67
III.3 Herstellung und Amplifikation von cDNA.....	69
III.3.1 Analyse der Quantität/Qualität der über SMART generierten cDNA's.....	71
III.4 PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung	72

III.4.1 Analyse des Restriktionsverdau, der Adaptorligation und der Subtraktionseffizienz	72
III.4.2 Analyse der Subtraktionsbanken mittels Kolonie-PCR.....	78
III.4.3 Screening der Subtraktionsbanken mittels cDNA Arrays	79
<i>III.4.3.1 Hybridisierungen mit den Subtraktionssonden</i>	79
<i>III.4.3.2 Hybridisierungen mit den cDNA Sonden</i>	83
III.5 Sequenzierung der differentiellen Transkripte	86
III.6 Verifizierung der differentiellen Genexpression mittels Northern Blot	97
III.7 Expressionsanalyse des Laminin Rezeptors 1 (67kDa)	104
III.7.1 FACS-Analyse.....	104
III.7.2 Immunhistologie	107
III.7.3 <i>In situ</i> Hybridisierung	109
 IV Diskussion	 113
IV.1 Bewertung der über Laser Capture Mikrodissektion isolierten RNA	113
IV.2 Bewertung der SMART-Methode	116
IV.3 Bewertung der Methode der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung	118
IV.4 Isolierung tumorrelevanter Gene im malignen Melanom	124
IV.4.1 Identifizierung differentiell exprimierter Gene in der Lymphknotenmetastase	124
<i>IV.4.1.1 Bewertung der Bestätigung differentieller Genexpression durch Northern Blots</i>	126
IV.4.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene im Primärmelanom	132
IV.5 Zusammenfassung	133
 V Literatur	 134

I Einleitung

I.1.1 Die Epidemiologie des malignen Melanoms

Das maligne Melanom gehört zu den 12 häufigsten Krebserkrankungen der EU (Esteve *et al.*, 1993, Jemal *et al.*, 2001, Marrett *et al.*, 2001, Manssoon–Brahme *et al.*, 2002). In den vergangenen Jahrzehnten ist weltweit ein kontinuierlicher Anstieg sowohl in der Inzidenz- als auch in der Mortalitätsrate des malignen Melanoms zu beobachten.

Allein in Deutschland treten jährlich 10-12 neue Fälle pro 100.000 Einwohner auf (Garbe *et al.*, 1991). Bei Frauen ist das maligne Melanom neben dem Mamma-Karzinom und dem Lungenkarzinom das zweithäufigste Karzinom (Meurisse *et al.*, 2002; Houghton *et al.*, 1980; Rigel, 1997, Herlyn 1993, Osterlind *et al.*, 1986). Zusätzlich stellte Schaart im Jahre 1993 die Hypothese auf, dass die jährliche prozentuale Ozonminderung eine Zunahme des malignen Melanoms um 0,6-2,0% verursacht (Schaart *et al.*, 1993).

Besonders bei der hellhäutigen Population findet man im Gegensatz zur dunkelhäutigen Bevölkerung eine gravierende Zunahme des malignen Melanoms (Armstrong *et al.*, 2001, Fears *et al.*, 2002). Eine besonders drastische Zunahme des malignen Melanoms findet man bei hellhäutigen Menschen in Ländern mit starker Sonneneinstrahlung wie Australien, Neuseeland und USA. So ist in Australien das maligne Melanom die häufigste Krebsart in der Bevölkerungsgruppe der 15- bis 44-jährigen. Insgesamt ist dort das maligne Melanom die dritthäufigste Karzinomerkrankung bei den Frauen und die vierthäufigste bei den Männern. Allein im Jahre 1997 wurden 8366 Neuerkrankungen diagnostiziert, wohingegen in den USA, nach Schätzung der American Cancer Society, die Zahl der Neuerkrankungen im Jahre 2003 etwa 54 000 betragen wird (Tucker *et al.*, 2002).

Nach epidemiologischen Untersuchungen zeichnen sich bestimmte Risikofaktoren für das maligne Melanom ab. So haben Menschen, welche mehrfache schwerwiegende Sonnenbrände in ihrer Kindheit hatten, ein erhöhtes Risiko an einem Melanom zu erkranken (Bauer *et al.*, 2003, Wiecker *et al.*, 2003, Bauer *et al.*, 2004). Ebenso weisen Menschen mit vielen melanozytären Nävi ein höheres Melanomrisiko auf (Gallagher *et al.*, 1990, Bliss *et al.*, 1995, Bauer *et al.*, 2003, Wiecker *et al.*, 2003, Bauer *et al.*, 2004).

Neben den exogenen Faktoren ist die erbliche Prädisposition für das maligne Melanom zu nennen (Czajkowski *et al.*, 2004). Ein familiäres Melanom geht oft mit dem sogenannten dysplastischen Nävussyndrom einher. Charakteristisch hierfür ist, dass eine Vielzahl von dysplastischen Nävi am ganzen Körper vorhanden sind, die ein hohes Potential haben, maligne zu entarten (Norris *et al.*, 1820, Greene *et al.*, 1985).

Unter allen Melanomen liegt die Häufigkeit des familiären Melanoms zwischen 3-14%, dabei gibt es zum Teil regionale Unterschiede (Greene *et al.*, 1999).

Beim familiären Melanom sind bestimmte Chromosomenbereiche häufig deletiert wie beispielsweise der kurze Arm von Chromosom 9 (9p21-22,) und der kurze Arm von Chromosom 1 (1p36, Bale *et al.*, 1989). Auf dem Chromosomabschnitt 9p21 liegen unter anderem die Gene p15, p16 und p14ARF. Keimbahnmutationen im **p16**-Gen (CDKN2A) treten bei 20-40% der familiären Melanomfamilien mit 3 oder mehr erkrankten Angehörigen auf, während nur 5% der Familien mit 2 erkrankten Angehörigen eine p16 Mutation aufweisen (Kefford *et al.*, 1999, Pollok *et al.*, 1998). In metastatischen Melanomzelllinien ist p16 meist durch Deletion, Mutation, Translokation oder DNA-Methylierung inaktiviert, dabei betreffen diese Deletionen meist nur ein Allel (Cairns *et al.*, 1994, Kamb *et al.*, 1995, Larsen *et al.*, 1996).

I.1.2 Entstehung und Progression des malignen Melanoms

Clark und Elder stellten ein Modell für die stufenweise Progression des Melanoms auf, wobei die Entstehung eines metastasierenden Melanoms wahrscheinlich über fünf Stadien der Tumorprogression abläuft, die sich histologisch voneinander unterscheiden lassen (Clark, Jr. 1991; Elder *et al.*, 1993; siehe Abb.1). Jedes Stadium hat Zelltypen mit einer charakteristischen Morphologie, Wachstumsverhalten, Oberflächenmarkern und Metastasierungsverhalten.

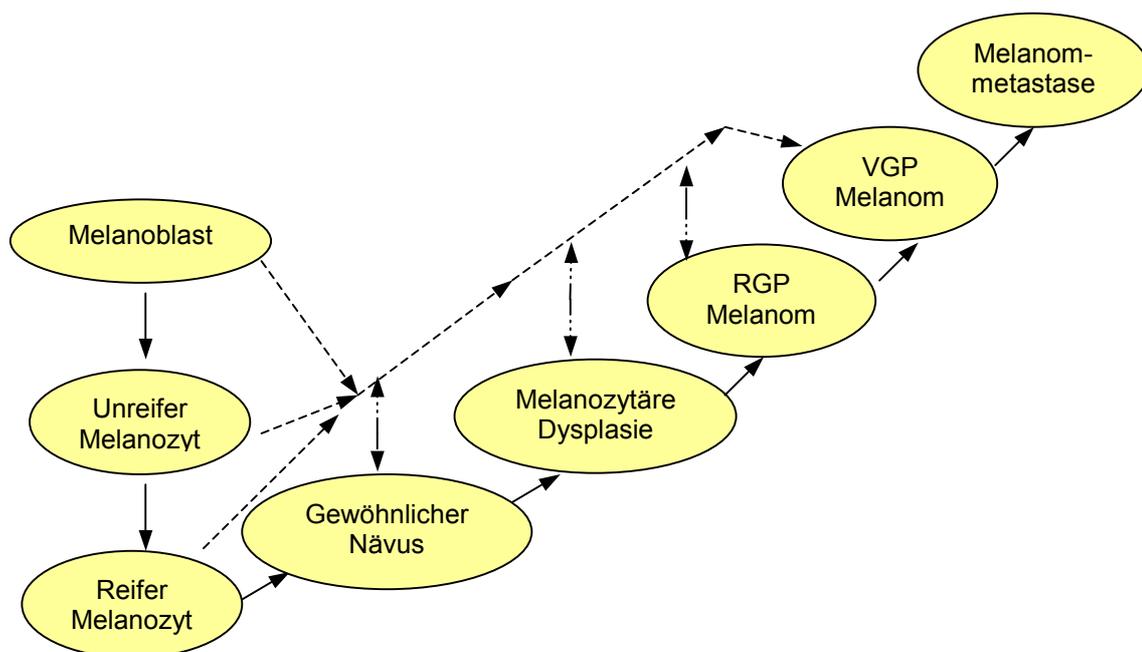


Abb.1 Modell der Progression des malignen Melanoms nach Clark *et al.*, 1991 und Elder *et al.*, 1993. RGP = radial growth phase (radiale Wachstumsphase), VGP = vertical growth phase (vertikale Wachstumsphase).

Ausgangspunkt sind reife gutartige Melanozyten der Haut, die sich über benigne Nävi (Pigmentmale) zu atypischen Nävi entwickeln können. Melanozytäre Nävi werden demnach als gutartige Neoplasien von Melanozyten angesehen. Die nächste Stufe wird von der melanozytären Dysplasie repräsentiert. Ein kritischer Schritt in der Tumorprogression des Melanoms ist die Transition von RGP (*radial growth phase*) zu VGP (*vertical growth phase*), dabei wird die Fähigkeit zur Invasion und/oder Metastasierung erworben. Die RGP-Melanome sind dadurch charakterisiert, dass sie nicht in die Dermis einwandern. Die VGP-Melanome können aggregieren, weisen fokales Wachstum auf, können in die Dermis einwandern und weisen die Fähigkeit zur Metastasierung auf.

Die Progression endet mit einer Metastase, welche entweder aus einem horizontal und später vertikal wachsenden Tumor oder gleich aus einem vertikal wachsenden Tumor entsteht. Anhand des Modells wird deutlich, dass der Progressionsprozess des malignen Melanoms nicht immer kontinuierlich verläuft. Manche Stadien können übersprungen werden oder ein Melanom ohne eine Vorläuferläsion entstehen. So kann sich beispielsweise ein Melanozyt direkt zu einer melanozytären Dysplasie oder zu einem RGP Melanom entwickeln. Umgekehrt ist auch ein Stillstand der Progression möglich, so dass nicht jedes Melanom notwendigerweise die komplette Entwicklung bis hin zur Metastasierung durchlaufen muss.

Melanome lassen sich aufgrund ihrer Morphologie und Lokalisation in vier Typen einteilen: 1) superfiziell spreitende- (SSM), 2) noduläre- (NM), 3) lentiginöse- (LMM) und 4) akrolentiginöse- (ALM) Melanome. Als Parameter für die Prognose gilt die Eindringtiefe nach Clark bzw. die Tumordicke nach Breslow: Clark Level I = nur Epidermis, Clark Level II = Stratum papillare, Clark Level III = angrenzend an Stratum reticulare, Clark Level IV = Stratum reticulare und Clark Level V = subkutanes Fettgewebe.

Die Metastasierung läuft in mehreren verschiedenen Stufen ab (Abb.2), wobei verschiedene Risikofaktoren wie beispielsweise Geschlecht, Invasionslevel, Tumorlokalisation und Tumordicke eine entscheidende Rolle spielen (Meier *et al.*, 2002). Die Metastasierung wird eingeleitet, wenn der Primärtumor eine bestimmte Grösse erreicht hat (ca. 2mm), bei der eine Nährstoffversorgung durch Diffusion nicht mehr gewährleistet ist (1). Ab dieser Grösse müssen zur Tumorversorgung neue Blutgefässe gebildet werden (2), welche durch verschiedene Angiogenesefaktoren induziert werden. Anschliessend erfolgt die Einwanderung (Intravasation) der Melanomzellen in die Blut-/Lymphzirkulation (3).

Durch Interaktionen der Melanomzellen mit den Blutzellen können sie in das umliegende Gewebe bzw. in die einzelnen Organe verteilt werden (4-5). Bevorzugt wandern hierbei die Melanomzellen in Lunge, Gehirn und Leber ein (Meier *et al.*, 2002).

Im Kapillarbett eines Organs (6) verlassen die überlebenden Melanomzellen die Blutzirkulation (Extravasation) (7-8) und proliferieren/migrieren ins Parenchym (9-10). Zu diesem Zweck müssen sie wieder die Bildung neuer Blutgefäße initiieren und dem Angriff des Immunsystems entkommen. Schliesslich kommt es zum Wachstum der Sekundärtumore, den Metastasen (11, Fidler *et al.*, 1998). Nach der Entwicklung von Metastasen sinkt die Überlebensrate bei Melanopatienten drastisch ab, so betragen die 10-Jahres-Überlebensraten bei Lymphknotenmetastasen 18% bzw. bei Fernmetastasen 2% (Schaart *et al.*, 1993). Bei einer frühzeitigen Exzision des Primärtumors (Tumordicke < 1,0mm) zeigen 90% der Patienten eine 10-jährige Überlebensrate (Orfanos *et al.*, 1994).

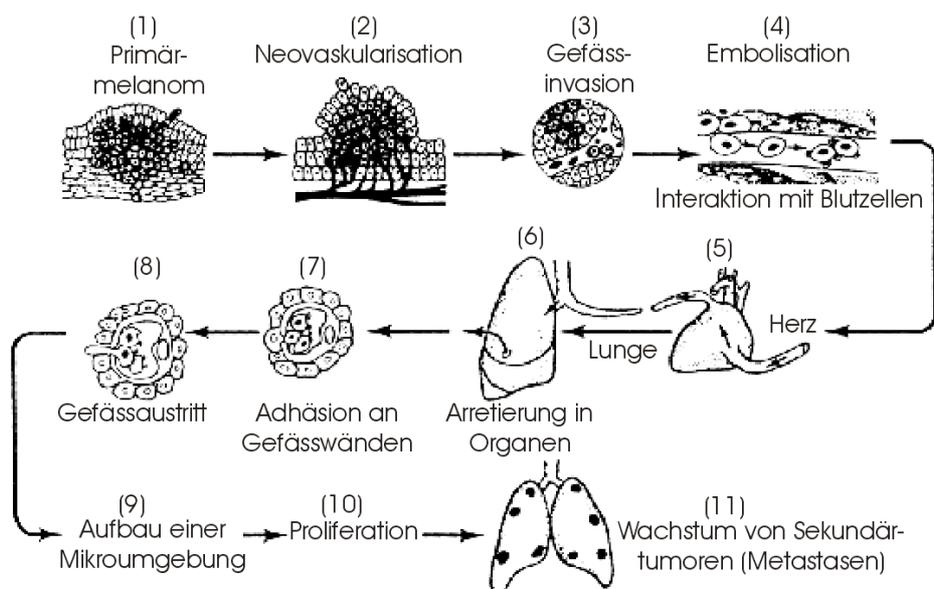


Abb. 2. Der Metastasierungsprozess des malignen Melanoms nach Fidler *et al.*, 1998 (weitere Erklärungen siehe Text).

Das maligne Melanom zeigt kein homogenes Metastasierungsmuster. Patienten mit Primärtumoren entwickeln in 21,7% der Fälle Satellitenmetastasen, wobei 50,2% der Metastasen nur zu regionalen Lymphknoten disseminieren. Nach Befall der nahegelegenen Lymphknoten kommt es anschliessend durch die hämatogene Metastasierung in 59% der Fälle zur Bildung von Fernmetastasen (Meier *et al.*, 2002). Demgegenüber zeigen 28,1% eine hämatogene Metastasierung ohne vorangegangenen Befall des Lymphsystems (Meier *et al.*, 2002). Nach der Bildung von Fernmetastasen kommt es in über der Hälfte der Fälle zum Tod.

I.1.3 Genetische Grundlagen der Entstehung und Progression des malignen Melanoms

I.1.3.1 Nukleäre Proteine

I.1.3.1.1 Komponenten von Signaltransduktionswegen

Beim malignen Melanom gibt es drei wichtige Signalwege: SRC-Kinase, PI3-Kinase und RAS/RAF/MEK/ERK (siehe Abb.3). Der **PI3-Kinase-Weg** (*phosphatidylinositol-3-kinase, lipid kinase*) reguliert die Zellbewegung, -proliferation, das -überleben und den intrazellulären Transport. Dabei spielt die Aktivierung des AKT- (Protein Kinase B) -Signalweges eine entscheidende Rolle (Diehl *et al.*, 1998, Shiojima *et al.*, 2002, Vivanco *et al.*, 2002). Ausserdem ist der **PI3-Kinase-Weg** in vielen transformierten Zellen konstitutiv aktiviert (Bedogni *et al.*, 2004).

Der **Src-Kinase-Weg** (*cytoplasmic tyrosine kinases*) wird in Melanozyten exprimiert (Wellbrock *et al.*, 2002). In transformierten Zellen ist die Src-Kinase durch Punktmutationen konstitutiv aktiviert. Eine src-Kinase Aktivierung ist bei der Adhäsion, Migration, Proliferation und Inhibition der Zelldifferenzierung beteiligt (Niu *et al.*, 2002, Huang *et al.*, 2003).

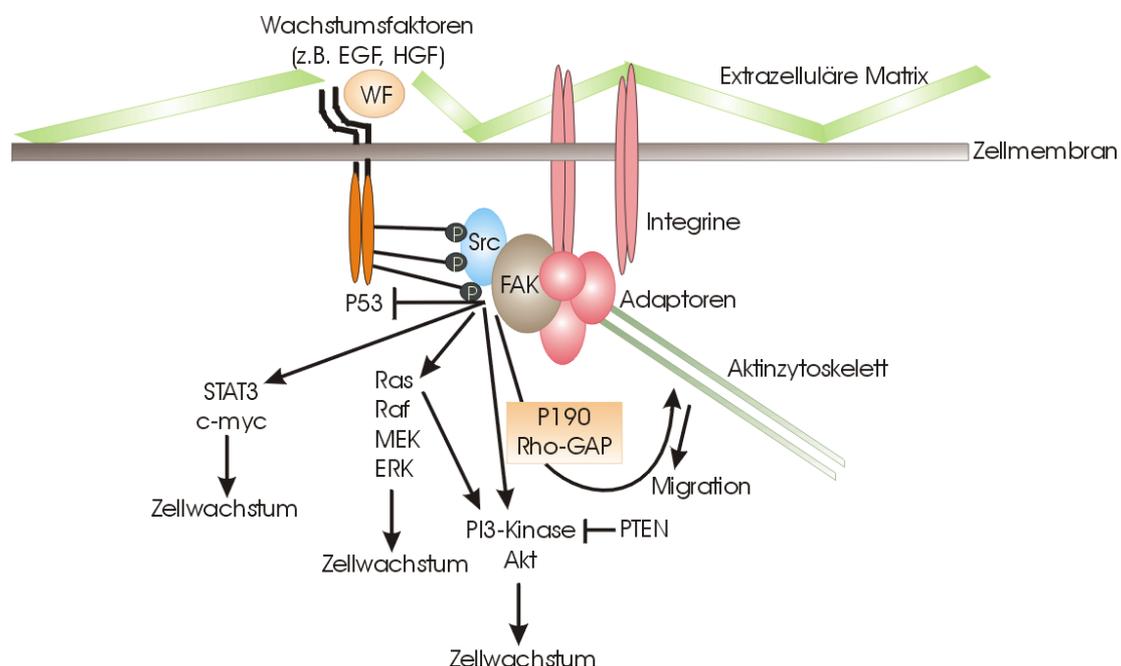


Abb.3 Übersicht der wichtigsten Signalwege beim malignen Melanom. Nach einer Aktivierung (Phosphorylierung) von Src über Wachstumsfaktoren erfolgt die Aktivierung (Phosphorylierung) von FAK (*focal adhesion kinase*). FAK wird hierbei durch Integrine reguliert, diese aktivierte Kinase bindet dann an die SH-2 Domäne des Adaptorproteins Grb2, welches dann an das SOS-Protein bindet. Hierbei benutzt Grb2 seine SH3-Domäne, um mit SOS in Kontakt zu kommen. Dies führt anschliessend zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege wie beispielweise den PI3-Kinaseweg, RAS/RAF/MEK/ERK-, STAT3- und den Rho-GAP-Signalweg (weitere Erklärungen siehe Text).

Der **RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg** wird über Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren bzw. über die Bindung von Integrinen an ihr Substrat aktiviert (siehe Abb.3). Dieser Signalweg spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellüberlebens, -wachstums, des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Angiogenese (Lewis *et al.*, 1998, Adjei *et al.*, 2001, Pearson *et al.*, 2001).

Eine Expression von *N* (neuroblastoma)-*ras*, *K* (Kirsten)-*ras* und *H* (Harvey)-*ras* Onkogene konnte in Melanomzellen nachgewiesen werden (Boss *et al.*, 1989, Adjei *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass N-Ras Mutationen zu 56% in kongenitalen Spitz-Näevi, zu 33% in Primärmelanomen und zu 26% in Melanometastasen vorkommen (Papp *et al.*, 1999, Bastian *et al.*, 2000, Demunter *et al.*, 2001). Die Expression von aktiviertem Ras in transgenen Mäusen zeigte, dass Ras wichtig für die Melanomentstehung und -erhaltung ist (Broome *et al.*, 1999, Chin *et al.*, 1997 und 1999).

Im aktivierten, GTP-gebundenen Zustand interagiert Ras mit verschiedenen Zielproteinen, die das nächste Glied der Ras-Signaltransduktionskette darstellen, wie beispielsweise die Proteinkinase RAF und die PI3-Kinase (Adjei *et al.*, 2001). RAF kann hierbei in drei Isoformen auftreten: A-RAF, B-RAF und C-RAF, die nach ihrer Aktivierung wiederum die MEK-Kinasen (MEK1 und MEK2 = *mitogen activated ERK-activating kinases*) anregen. Diese beiden Kinasen aktivieren dann ERK1 und ERK2 (*extracellular signal-regulated kinases*), welche schliesslich eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktivieren (Smalley *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Aktivierung von ERK als ein frühes Ereignis in der Melanomentstehung betrachtet werden kann. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Brn-2 erhöht sich die Zellproliferation und -transformation und durch die Aktivierung von Osteopontin die Adhäsion und das Zellüberleben (Philip *et al.*, 2001, Goodall *et al.*, 2004).

BRAF ist eine Serin/Threonin-Kinase und ist zu 60-70% im malignen Melanomen und zu 80% im Nävus mutiert (Davies *et al.*, 2002, Pollock *et al.*, 2003). Die meisten Mutationen befinden sich innerhalb der Kinasedomäne des Exons 15, dabei handelt es sich in den meisten Fällen um eine einzelne Punktmutation, welche zu einem Austausch von Valin gegen Glutaminsäure an der Aminosäure-Position 599 führt (V599E, Pollock *et al.*, 2003).

Aktiviertes B-RAF führt zu einer Aktivierung von ERK (Davies *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass die ERK-Aktivität in vielen Melanomzelllinien erhöht ist und für die Melanozytenproliferation *in vitro* essentiell ist (Bohm *et al.*, 1995, Imokova *et al.*, 2000, Wellbrock *et al.*, 2002, Satyamoorthy *et al.*, 2003).

Der hohe Mutationsanteil in Nävi lässt vermuten, dass eine *BRAF*-Aktivierung alleine nicht für eine melanozytäre Transformation ausreicht, aber eventuell ein Initiationschritt in der Kaskade sein könnte.

PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome ten*) ist eine Phosphatase und ein Tumorsuppressor, welches auf Chromosom 10q lokalisiert ist (Fountain *et al.*, 1990, DiCristofano *et al.*, 2000, Penninger *et al.*, 2001, Yamada *et al.*, 2001, Wu *et al.*, 2003). Der Verlust des Chromsoms 10q ist häufig in Melanomen zu beobachten (Parmiter *et al.*, 1988, Fults *et al.*, 1993, Isshiki *et al.*, 1993, Herbst *et al.*, 1994, Healy *et al.*, 1995, Ittmann *et al.*, 1996.). Allein beim malignen Melanom tritt der Verlust des Chromosoms 10q zu 30-40% in Melanomzelllinien und zu etwa 10% in Primärmelanomen auf (Guldberg *et al.*, 1997, Tsao *et al.*, 1998, Birck *et al.*, 2000, Reifenberger *et al.*, 2000). Eine Studie im Jahre 2000 zeigt, dass die ektopische PTEN Expression in PTEN defizienten Melanomzellen die Metastasierung reduzieren konnte (Hwang *et al.*, 2001).

c-kit ist eine Transmembranttyrosinkinase und ein Protoonkogen aus der PDGF- und CSF-1- (*colony stimulating factor-1*) Rezeptorfamilie. Durch die Bindung an seinen Liganden *stem cell factor* (SCF) erfolgt eine Homodimerisierung des Rezeptors, was zu einer erhöhten Autophosphorylierung führt (Vlahovic *et al.*, 2003). *c-kit* spielt eine zentrale Rolle bei der Zelldifferenzierung und –proliferation, und unterstützt das Wachstum und die Differenzierung embryonaler Melanoblasten. Die Progression des malignen Melanoms geht mit dem Verlust der *c-kit*-Protoonkogen-Expression einher (Luca *et al.*, 1998, Natali *et al.*, 1992, Ohashi *et al.*, 1996, Bar-Eli *et al.*, 1997, Bar-Eli *et al.*, 1999).

Die Gene **p16**, **p15** und **p14** liegen gemeinsam auf dem INK4A/ARF Locus und regulieren die Zellproliferation. Für die Melanozytenalterung ist eine p16 Aktivität essentiell (Sviderskaya *et al.*, 2003), während der Verlust der p16-Expression mit der Melanomprogression korreliert (Reed *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 2002 und 2004). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Deletion von p16 und p19 (Homolog zu p14 in der Maus) die Melanomentstehung in RAS-positiven überexprimierenden Mäusen unterdrückt (Sharpless *et al.*, 2003, Chin *et al.*, 1997).

Das **p15**-Tumorsuppressorgen ist auch als CDKN2B bekannt, weist eine bis zu 93%-ige Sequenzhomologie zu p16 auf und liegt ca. 30kb aufwärts des p16-Gens. Es agiert wie p16 als Inhibitor von CDK4 (Walker *et al.*, 1998).

P14ARF (*alternative reading frame*) unterscheidet sich vom p16-Gen im 1. Exon und in der reading frame. P14 aktiviert die Antwort des Tumorsuppressorgens p53, das zu einer Erhöhung von MDM2 und p21 führt. Dies bewirkt einen Zellzyklusarrest in der G₁- und in der G₂-M-Phase (Stott *et al.*, 1998). Ausserdem erfolgt eine negative Rückkoppelung von p53 in Bezug auf die p14ARF Bildung, d.h. grössere Mengen p53 bedeuten eine niedrigeren p14ARF-Expressionslevel.

CDK4 (Zyclin-abhängige Kinase 4) befindet sich auf Chromosom 12q14 und wird von p16 inhibiert (Demetrick *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 1996). Mutationen im CDK4-Gen, die die Bindung von p16 und damit die Inhibition der Zellproliferation erhöhen, sind in etwa 5% der untersuchten Melanomen gefunden worden (Wölfel *et al.*, 1995, Tsao *et al.*, 1998, Sharpless *et al.* 2003).

MC1R (*melanocortin-1 receptor*) ist für die Determinierung des Hauttypes essentiell (Valverde *et al.*, 1995). Genetische Variationen im MC1R-Gen sind häufig bei Menschen mit rotem Haar und/oder heller Hautfarbe vertreten (Busca *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass bei Menschen mit rotem Haar das Phäomelanin im Gegensatz zu Eumelanin vermehrt vorhanden ist. Das Phäomelanin ist in der Lage, nach UV-Exposition freie Radikale freizusetzen und kann auf diese Weise sonnenbedingte Hautschäden verursachen. Zwei Studien belegen, dass das Risiko, an einem Melanom zu erkranken, mit den MC1R Variationen assoziiert ist (Palmer *et al.*, 2000, Kennedy *et al.*, 2001).

I.1.3.1.2 Transkriptionsfaktoren

In der Karzinogenese des malignen Melanoms spielen eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise AP-1, AP-2, Brn-2, CREB, CtBP, ETS-1, HMGB1, LEF/TCF/ β -Catenin, MITF, NF κ B, PAX3, SKI, Snail und STAT eine entscheidende Rolle (Poser *et al.*, 2004). Auf die Transkriptionsfaktoren ATF-1, AP-2, MITF, Snail, Ski und LEF/TCF/ β -Catenine wird dabei im folgenden näher eingegangen.

Die Progression des malignen Melanoms hängt mit einer Überexpression der beiden Transkriptionsfaktoren (TF) **ATF-1** (*activating transcription factor-1*) und **CREB** (*CRE-binding protein*) zusammen (Poser *et al.*, 2004). Jedoch ist der genaue Mechanismus, der zur **ATF-1**/**CREB**- Überexpression führt, noch unklar (Jean *et al.*, 2001). Eine Inaktivierung von ATF-1 in metastatischen Melanomzellen führte zur Inhibition bzw. Reduzierung des Tumorwachstums und des Metastasierungspotentials in Nacktmäusen, wobei die Tumorzellen der Apoptose unterlagen (Jean *et al.*, 2001).

Zwei verschiedene Mechanismen wurden postuliert, um die Metastasierung als Folge der Überexpression der Transkriptionsfaktoren *CREB/ATF-1* zu erklären. *CREB/ATF-1* könnte entweder eine essentielle Rolle in der Invasion einnehmen, indem sie die CRE-abhängige Expression von *MMP-2* und *MelCAM/MUC18* reguliert, oder *CREB/ATF-1* könnten als Überlebensfaktoren für die Melanomzellen fungieren (Jean *et al.*, 2001).

Für *ATF-2* (*activating transcription factor-2*) wurde in einer Studie gezeigt, dass es in Melanomzellen Apoptose induzieren kann, und somit eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Tumorentstehung, -wachstum und der Metastasierung im Mausmodell spielt (Bhoumik *et al.*, 2002, Bhoumik *et al.*, 2004). Eine Inaktivierung von *ATF-2* in Melanomzellen führte zu einer Sensibilisierung gegen Chemotherapeutika *in vitro* (Ronai *et al.*, 1998).

AP-2 reguliert unterschiedliche Gene, welche an Wachstum, Apoptose, Zelladhäsion und Proliferation des malignen Melanoms beteiligt sind, so z.B. *c-kit*, *E-Cadherin*, *p21/WAF-1*, *MMP-2*, *IGF*, *HER-2*, *BCL-2*, *FAS/APO-1*, *MelCAM/MUC18*, *p53* und *PAR-1* (Bar-Eli *et al.*, 1999 und 2001, Nyormoi *et al.*, 2003, Tellez *et al.*, 2003). Der Verlust der *AP-2* Expression korreliert mit der Progression des malignen Melanoms (Bar-Eli *et al.*, 1999). Studien belegen, dass *in vivo* *AP-2* durch eine Deregulation der *MMP-2* Gene die Melanomprogression fördert (Gershenwald *et al.*, 2001). Ausserdem führte *AP-2* Reexpression in Nacktmäuse zur Inhibition des Metastasierungspotential einer hochaggressiven Melanomzelllinie (Bar-Eli *et al.*, 2001). In einer immunhistologischen Analyse konnte gezeigt werden, dass eine *AP-2*-Expression in Primärmelanomen das Risiko der Metastasierung vermindert.

Das **MITF**-Protein (*microphthalmia associated transcription factor*) wird im malignen Melanom überexprimiert, ist entscheidend für das Zellschicksal und ein kritischer Regulator für die Entwicklung und das Überleben von Melanozyten. Hierbei spielt die Verbindung von *MITF* zum *WNT*-Signalweg eine entscheidende Rolle (Widlund *et al.*, 2003, Poser *et al.*, 2004). Mäuse mit Mutationen im *MITF*-Gen zeigen einen weissen Phänotyp (Tachibana *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass *MITF* die *Bcl-2* Expression reguliert und somit das Zellüberleben moduliert (McGill *et al.*, 2002).

Die Zinkfingerproteine der **SNAIL**-Familie gehören zur *bHLH*-Familie (*basic helix loop helix*), welche essentiell für die Mesodermbildung während der Gastrulation und der Entwicklung der Neuralleiste sind (Erives *et al.*, 1998, Paznekas *et al.*, 1999).

Einige Mitglieder der *SNAIL*-Familie interagieren mit Hilfe ihrer SNAG-Domäne mit dem E-pal-Element, und üben somit ihre repressive Eigenschaft auf E-Cadherin aus (Battle *et al.*, 2000). Wird *SNAIL* überexprimiert, kommt es zu einem Verlust der E-cadherin-Expression, und die Zellen erlangen die Fähigkeit zur Invasion und Migration (Cano *et al.*, 2000, Poser *et al.*, 2001).

SKI wird beim malignen Melanom überexprimiert (Fumagalli *et al.*, 1993). Diese konstante Überexpression von c-Ski in Melanomzelllinien im Vergleich zu Melanozyten führte zu der Vermutung, dass Ski als Protoonkogen bei der Melanozyten-Transformation eine Rolle spielt (Poser *et al.*, 2004). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die SKI Überexpression den Zellen eine Resistenz gegenüber dem wachstumsinhibitorischen Effekt von TGF- β verleiht (Poser *et al.*, 2004). Die repressive Eigenschaft von Ski auf den TGF- β Signalweg erfolgt durch die Bindung an die Smad-Proteine d.h. die nukleäre Translokation von Smad wird in Antwort auf TGF- β verhindert (Nicol *et al.*, 1998, Akiyoshi *et al.*, 1999, Luo *et al.*, 1999, Sun *et al.*, 1999, Xu *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2003). Diese Inaktivierung konnte in einer Reihe von Tumoren, inklusive des malignen Melanoms, beobachtet werden (Massague *et al.*, 2000). Reed *et al.*, konnte in einer immunhistologischen Analyse zeigen, dass ein SKI Protein in Primärmelanomen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vorkommt, während in Melanommetastasen eine SKI Retention im Zytoplasma zu beobachten ist (Reed *et al.*, 2001).

Brn-2 gehört zu der POU-Familie von Transkriptionsfaktoren und wird stark in Melanomzelllinien exprimiert, während in Melanozyten keine Expression zu detektieren ist (Sturm *et al.*, 1994, Eisen *et al.*, 1995, Thomson *et al.*, 1995, Ryan *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Brn2 Expression durch Ras und den MAP-Kinase-Signalweg hochreguliert und durch wnt/ β -Catenin kontrolliert wird (Goodall *et al.*, 2004). Somit ist Brn-2 das Zielgen dieser beiden Signalwege. In Melanomzellen, welche β -Catenin überexprimierten, führte eine über siRNA's vermittelte Inhibition der Brn-2 Expression zu einer signifikanten Reduzierung der Proliferation (Goodall *et al.*, 2004).

LEF/TCF/ β -Catenin

In der Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion spielt β -Catenin eine tragende Rolle, indem es die Signaltransduktion zwischen E-Cadherin und dem Aktinzytoskelett bzw. den Tyrosinkinase der Wachstumsfaktoren und der Wnt-Signalkaskade vermittelt (Kemler *et al.*, 1993, Gumbiner *et al.*, 1995, Mareel *et al.*, 1997, Yap *et al.*, 1997, Brown *et al.*, 1998, Bittner *et al.*, 2001, Worm *et al.*, 2004).

β -Catenin bindet an die Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef, was zu deren Aktivierung führt. Das APC Gen, das häufig mutiert ist in adenomatöser Polyposis, kodiert für ein Protein, das ein negativer Regulator des β -Catenin Signalwegs ist (Korinek *et al.*, 1997). Durch Bindung von APC an β -Catenin kommt es zu einer intrazellulären Abnahme der β -Catenin Konzentration, dadurch werden die Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef freigesetzt und damit inaktiviert. Ebenso können Mutationen im β -Catenin Gen die Funktion soweit verändern, dass es nicht mehr inhibierbar ist. Aufgrund von Mutationen im β -Catenin Gen wurden in 7 von 26 humanen Melanomzelllinien abnormal hohe Mengen an β -Catenin detektiert (Rubinfeld *et al.*, 1997). Diese Veränderungen führten zu einer Stabilisierung des Proteins, das wiederum zu einem konstitutiv aktiven β -Catenin/Lef Komplex führte und somit zum Tumorwachstum (Nelson *et al.*, 2004). Worm *et al.*, konnte durch die Expression von kurzen Haarnadelförmigen RNA's zeigen, dass die APC Expression in Melanomzellen unterdrückt wird, was dann zu einer Erhöhung der wnt-abhängigen Zellproliferation führte (Worm *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass Rho im wnt Signalweg eine essentielle Rolle einnimmt und, dass eine Überexpression von RhoC die Metastasierung des malignen Melanoms verstärkt, da RhoC die Zellmigration kontrolliert (Clark *et al.*, 2000, Kishida *et al.*, 2003, Nelson *et al.*, 2004). Als Schlussfolgerung lässt sich sagen, dass sowohl Veränderungen im APC Gen als auch im β -Catenin- Gen die Entstehung und/oder Progression beim Melanom unterstützen.

I.1.3.2 Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden

I.1.3.2.1 Integrine

Integrine sind heterodimere Transmembran-Adhäsionsmoleküle, bestehend aus einer α - und einer β - Untereinheit (Hemler *et al.*, 1990, Hynes *et al.*, 1992). Über 24 Integrin-Untereinheiten sind identifiziert worden, diese binden spezifisch an ein oder mehrere extrazelluläre Matrix (ECM)-Moleküle (Arnaout *et al.*, 2002).

Integrine vermitteln die Adhäsion zwischen Zelle und ECM oder zwischen Zellen. In Melanomen steigt *in vivo* die Expression der β_3 -Integrine mit zunehmender Progression an, und dies korreliert mit der Tumordicke, der Fähigkeit zur Invasion und zur Metastasierung (BurrIDGE *et al.*, 1988 und 1990, Felding-Habermann *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2002, Meier *et al.*, 2000, 2003). Hierbei ist der kritische Schritt in der Melanomprogression die Transformation von RGP zu VGP, welcher durch die zunehmende β_3 -Integrin Expression gekennzeichnet ist.

I.1.3.2.2 Cadherine

Cadherine sind Transmembranglykoproteine, welche an der Kalzium-abhängigen Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind. Ausserdem sind sie an der Zellerkennung, Motilität, Gewebsintegrität und Homöostase der gesunden Haut beteiligt.

Der Verlust der Kommunikation zwischen Keratinozyten und Melanozyten spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung des malignen Melanoms, da unter anderem die Tumordinvasion dadurch erleichtert wird (Tamura *et al.*, 1997, Hsu *et al.*, 2000). Daher spielen die Adhäsionsmoleküle **E-Cadherin** und **N-Cadherin** eine entscheidende Rolle. In der Haut wird E-Cadherin auf Keratinozyten, Melanozyten und Langerhanszellen exprimiert (Hsu *et al.*, 2000).

Der Verlust der Kontrolle der Melanozyten durch Keratinozyten geht mit der Herunterregulation der E-Cadherin Expression einher, und korreliert mit der Zunahme der N-Cadherin-Expression (Li *et al.*, 2000, McGary *et al.*, 2002). N-Cadherin erleichtert die Klusterbildung und die Invasion in die Dermis, da N-Cadherin die Adhäsion der Melanomzellen untereinander, zu Fibroblasten und zu vaskulären Endothelzellen vermittelt. E-Cadherin Reexpression in Melanomzellen und funktionelle Untersuchungen mit Hilfe eines Hautrekonstruktmodells führten zu einer Verlangsamung des Zellwachstums, Inhibition der Invasion und zur Apoptoseinduktion (Hsu *et al.*, 2000).

Poser *et al.*, untersuchte die Ursachen des Verlustes der E-Cadherin Expression bei der malignen Transformation der Melanozyten (Poser *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass weder Mutationen im E-Cadherin Gen noch Methylierungen im Promotor für den Verlust der Expression verantwortlich sind. Ausserdem konnte beobachtet werden, dass in einer Reihe von Melanomzelllinien die E-Cadherin Expression durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Snail* negativ reguliert wurde (Poser *et al.*, 2001).

Snail-Antisense Konstrukte führten zu einer E-Cadherin-Reexpression in metastatischen Melanomzelllinien. Somit spielt *Snail* eine tragende Rolle bei der Herunterregulation der E-Cadherin Expression und bei der Tumorgenese des malignen Melanoms. Jedoch ist der genaue Mechanismus noch unbekannt.

Studien belegten, dass E-Cadherin über autokrines TFG- β (*tumour growth factor*) herunterreguliert werden kann (Janji *et al.*, 1999). Als Schlussfolgerung lässt sich sagen, dass die Cadherinumwandlung die interzellulären Interaktionen verändert und somit geeignete Bedingungen für Tumorwachstum und –invasion erreicht werden.

I.1.3.2.3 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie

Für das Melanom sind **MelCAM**, **ALCAM** und **L1-CAM** von Bedeutung. **MelCAM/MUC18** (CD146) ist ein heterophiles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül (Shih *et al.*, 1994). Seine Expression wird bei der Progression vom Melanozyt über melanozytären Nävus in einen Tumor der RGP- und VGP-Wachstumsphase bis in die Melanommetastase hochreguliert (Meier *et al.*, 1998). MUC18 –Expression findet man nicht nur auf Melanomzellen, sondern auch auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen und auf aktivierten T-Lymphozyten (Shih *et al.*, 1994, Li *et al.*, 2000).

MelCAM agiert bei Zell-Zellinteraktionen, vermittelt die Interaktionen von Melanomzellen untereinander durch Adhäsion an einen bislang unbekanntem Liganden und wird proportional zur vertikalen Tumordicke hochreguliert (Johnson *et al.*, 1992, Shih *et al.*, 1994 und 1997). MelCAM ist inzwischen ein etablierter Indikator für das metastatische Potential eines Melanoms. Es scheint, dass MelCAM gemeinsam mit β_3 -Integrin den Metastasierungsprozess fördert. Ausserdem wurde gezeigt, dass aktiviertes AKT die MelCAM Expression verstärkt. Die Expression von MelCAM wird somit über den AKT Signalweg reguliert (Woods *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2002). Neuste Studien belegten, dass blockierende Antikörper gegen MelCAM Tumorwachstum und Metastasierung in Nacktmäusen inhibieren können (Mills *et al.*, 2002).

ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*) ist ein Transmembranprotein, welches an homotypischen und heterotypischen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt ist (Van Kempen *et al.*, 2004, Degen *et al.*, 1998). Die ALCAM Expression korreliert *in vitro* mit der Fähigkeit von Zellen Nester zu bilden und mit dem metastatischen Potential von Melanomzelllinien (Degen *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Zellnestern durch ALCAM die Zellbewegung *in vitro* fördert und die Umwandlung in ein VGP-Melanom im Hautrekonstruktmodell unterstützt (Van Kempen *et al.*, 2004).

In vivo korreliert die ALCAM Expression mit der Progression des malignen Melanoms, da die meisten Nävi und RGP Melanome kein ALCAM exprimieren, während in 50% der VGP Melanome eine starke ALCAM-Expression zu detektieren ist (van Kempen *et al.*, 2000).

Das Adhäsionsmolekül **L1-CAM** ist ein Transmembranglykoprotein mit 6 immunglobulinähnlichen und 5 fibronectinähnlichen Abschnitten in der extrazellulären Domäne und wird in einigen Tumorzellen überexprimiert (Katayama *et al.*, 1997, Pancook *et al.*, 1997, Kobayashi *et al.*, 1991). Als Bindungspartner für L1-CAM wurde unter anderen das Integrin $\alpha_v\beta_3$ identifiziert. L1-CAM beeinflusst das Wachstum und die Migration von Zellen durch die Bindung an extrazelluläre Liganden.

Ausserdem wird L1-CAM auf neuronalen Zellen exprimiert und mediiert neuronale Adhäsion und Zellmigration (Hortsch *et al.*, 1996). Daneben wird es auch von hämatopoetischen Zellen, einigen epithelialen Zellen und von einer Reihe von Tumorzelllinien wie beispielsweise Lungenkarzinomen und Melanomen exprimiert (Fogel *et al.*, 2003). Hierbei ist eine verstärkte Expression von L1-CAM auf einer metastatischen Variante einer Melanomzelllinie gefunden worden (Linnemann *et al.*, 1989). Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass eine erhöhte L1-CAM Expression in Primärmelanomen und Hautmetastasen zu beobachten ist, während in Lymphknotenmetastasen die L1-CAM Expression herunterreguliert ist (Fogel *et al.*, 2003). Die genaue Funktion des L1-CAM Moleküls bei der Invasion, Metastasierung und der melanozytären Transformation ist noch unbekannt.

I.1.3.3 Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gehören zu den zinkabhängigen Endopeptidasen, welche Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) degradieren können (Curran *et al.*, 1999). Ihre Aktivität kann spezifisch durch TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) inhibiert werden (Kahari *et al.*, 1997, Raza *et al.*, 2000). Dabei stehen die TIMPs und die MMPs im Gleichgewicht, wird diese Balance zu Gunsten der MMP's zerstört, wird die Degradation extrazellulärer Matrixproteine der Basalmembran initiiert (Henriet *et al.*, 1999). Im allgemeinen werden MMPs nicht konstitutiv in der Haut exprimiert, sondern als Antwort auf Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zell-ECM-Interaktionen, verstärkte Zell-Zellkontakte, Hormone und Onkogene aktiviert (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993, Westermarck *et al.*, 1999).

MMP-2 auch bekannt als Kollagenase Typ IV oder 72kDa-Gelatinase A, wird in Melanomzellen exprimiert und durch MT-MMPs (*membrane type matrix metalloproteinases*) aktiviert (Wollina *et al.*, 2001, Ohnishi *et al.*, 2001). Die Kollokalisierung von MMP-2 und MT1-MMP in Melanomen führt zu der Vermutung, dass beide im Invasions- und Metastasierungsprozess kooperieren (Ohnishi *et al.*, 2001, Kurschat *et al.*, 2002).

MMP-9 ist auch bekannt unter dem Namen 92kDa-Gelatinase B, und wird mit MMP-2 in invasiven Melanomen koexprimiert (Simonetti *et al.*, 2002). TNF- α (*tumour necrosis factor - α*), Interleukin-1 β und TGF- β (*transforming growth factor- β*) können gemeinsam pro-MMP-9 in Fibroblasten und Keratinozyten induzieren und regulieren. Sowohl MMP-2 als auch MMP-9 erleichtern durch ihre degradierenden Eigenschaften die Migration der Tumorzellen ins benachbarte Gewebe (Murphy *et al.*, 1989, Karelina *et al.*, 2000).

I.1.3.4 Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

I.1.3.4.1 Angiogenesefaktoren

Die Angiogeneseinduktion, d.h. die Bildung neuer Blutkapillaren ist ein kritischer Schritt im Tumorwachstum und Metastasierungsprozess. Dadurch werden die Tumore mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, die dann das Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung fördern. Im Primärmelanom wird die Angiogenese hauptsächlich über **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) vermittelt. Aber auch **bFGF** (*basic fibroblast growth factor*), **PDGF** (*platelet-derived growth factor*), **IL-8** (Interleukin 8) und **Angiopoeitin 2** (Ang-2) spielen dabei eine tragende Rolle (Streit *et al.*, 2003, Velasco *et al.*, 2002).

VEGF ist ein Heparin-bindendes Polypeptid, und kann aufgrund von differentiellem Spleissen in verschiedenen Isoformen vorliegen (Neufeld *et al.*, 1999, Velasco *et al.*, 2002, Yu *et al.*, 2002). VEGF ist spezifisch für Endothelzellen und wird in einer Reihe von Tumoren und im Rahmen entzündlicher Prozesse exprimiert (Ferrara *et al.*, 2000).

Die VEGF Expression ist im invasiven malignen Melanom stärker als im Melanom *in situ* (Gitay-Goren *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Transition eines RGP-Melanoms in ein VGP-Melanom mit einer erhöhten VEGF Expression einhergeht (Erhard *et al.*, 1997). Dies legt eine Korrelation zwischen der VEGF induzierten Angiogenese und der Malignität der invasiven Melanome nahe (Simonetti *et al.*, 2002).

Im Einklang damit zeigten VEGF-Blockierungsstudien, dass die Blockade der VEGF-Funktion die Angiogenese inhibiert und das Tumorwachstum *in vivo* unterdrückt (Detmar *et al.*, 2000). Es gibt eine Reihe von Faktoren, die die VEGF-Expression regulieren: Zyklooxygenase 2, Heregulin β -1, Insulin, Östrogen, EGF, bFGF, und N-Acetylcystein (Gately *et al.*, 2000, Xiong *et al.*, 2001, Bermont *et al.*, 2001, Mueller *et al.*, 2000, Hyder *et al.*, 2000, Maity *et al.*, 2000, Danielsen *et al.*, 1998, Claffey *et al.*, 2001 und Redondo *et al.*, 2000).

Die Familie der Angiopoeitinwachstumsfaktoren spielt eine entscheidende Rolle bei der Vaskularisierung und beim Wachstum des Melanoms (Pomyje *et al.*, 2001). **Ang-2** ist der Antagonist zu Angiopoeitin 1 (Ang-1) und wird bereits in frühen Tumorwachstumsstadien überexprimiert (Vajkoczy *et al.*, 2002).

Ang-1 wird in Perizyten exprimiert und durch seine Bindung an den Tyrosin Kinase Rezeptor (Tie)-2 stabilisiert es die einzelnen Blutgefäße (Velasco *et al.*, 2002). Studien belegen, dass der Tie-2 Signalweg als ein wichtiger Modulator der Angiogenese beim malignen Melanom agieren kann (Siemeister *et al.*, 1999).

Der **bFGF/FGF-2** (*basic fibroblast growth factor*) agiert als Überlebensfaktor, Mitogen und Transformationsfaktor. Es konnte gezeigt werden, dass bFGF ein potentieller Angiogenesefaktor ist (Streit *et al.*, 2003).

bFGF wird von Fibroblasten, Keratinozyten und in fast allen Melanomzellen, nicht aber von Melanozyten exprimiert, und die Expression steigt mit zunehmender Tumorprogression an (Wang *et al.*, 1997, Meier *et al.*, 2000). Eine autokrine Stimulation von Melanomzellen durch bFGF wurde klar nachgewiesen, wodurch Melanomzellen in der Lage sind, aufgrund der eigenen Produktion von bFGF, auch ohne exogen zugeführte Wachstumsfaktoren, zu proliferieren. Zusätzlich weist bFGF parakrine Funktionen bei der Angiogenese und Stromabildung auf und aktiviert degradierend wirkende extrazelluläre Enzyme (Shih *et al.*, 1994, Nesbit *et al.*, 1999). Inhibition von bFGF mit Antisense- Oligonukleotiden führte zu einer Inhibition des Tumorwachstums *in vivo* (Wang *et al.*, 1997). Es ist bekannt, dass Sonnenexposition die Melanomentstehung begünstigen kann. Berking *et al.*, konnte zeigen, dass bFGF alleine eine Hyperpigmentierung der Haut und eine Melanozytenproliferation induziert, während die Kombination aus bFGF-Expression und UV-B-Strahlung zu einer Transformation der Melanozyten führt (Berking *et al.*, 2001).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass *in vivo* neben der bFGF-Expression zwei weitere Wachstumsfaktoren, SCF (*stem cell factor*) und ET-3 (*endothelin-3*) für die Transformation von Melanozyten zu Melanomzellen unter UV-B-Belastung wichtig sind (Berking *et al.*, 2004).

PDGF (*platelet-derived growth factor*) kommt in zwei Formen vor, PDGF-A und PDGF-B, beide fördern die Bildung von Tumorstroma und Blutgefäßen und wird von Melanomzellen und anderen Tumorzellen produziert. Dabei wird nur der α -Typ, nicht aber der β -Typ, in primären sowie metastatischen Melanomen exprimiert. Durch den α -Rezeptor ist eine autokrine Stimulation der Melanomzellen möglich (Barnhill *et al.*, 1996). PDGF spielt eine Rolle beim Tumorwachstum, bei der Angiogenese und der Metastasierung (Rofstad *et al.*, 2000).

Das Zytokin **IL-8** (Interleukin 8) gilt als chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten und wurde als autokriner Wachstumsfaktor für Melanomzelllinien beschrieben (Scheibenbogen *et al.*, 1995, Muller *et al.*, 2001 Gutman *et al.*, 2002). Ausserdem moduliert IL-8 neben der Melanomzellproliferation die Migration der Zellen durch Stimulation von proteolytischen Enzymen und induziert die Neovaskularisierung (Singh *et al.*, 2000, Rofstad *et al.*, 2000).

Dabei führt die Aktivierung von MMP-2 durch IL-8 zu einer verstärkten Invasion der Tumorzellen in das Stroma, dadurch wird die Angiogenese und die Metastasierung eingeleitet (Bar-Eli *et al.*, 1999).

I.1.3.4.2 Wachstumsfaktoren

Zu den wichtigsten Peptidwachstumsfaktoren gehören neben **VEGF**, **bFGF/FGF-2** und **PDGF**, **IGF-1** (*insulin-like growth factor-1*), und **TGF- β** (*transforming growth factor- β*). Alle agieren als parakrine Faktoren, in Gemeinschaft oder allein zur Stimulation der Fibroblasten und Endothelzellen.

Weitere Faktoren, die mitogene Wirkung auf Melanozyten zeigen, sind **K-FGF**, **FGF-6**, **SCF** (*stem cell factor*) und **HGF** (*hepatocyte growth factor* oder *scatter factor* (SF)). HGF kann die Melanomentstehung, das Zellwachstum, die Zellbewegung und die Invasion einer Vielzahl von Zellen, unter anderen auch von Melanozyten stimulieren. Durch Etablierung transgener Mäuse anhand einer neonatalen UV-Bestrahlung kann eventuell der genaue Melanominitiationsmechanismus des UV-Lichts aufgedeckt werden, um neue therapeutische Ansätze zu bilden. Das Besondere an diesen Mäusen ist, dass die Melanozyten wie beim Menschen in der Epidermis vorhanden sind (Noonan *et al.*, 2003).

IGF-1 und Insulin binden an denselben Rezeptor wie die Mitglieder der FGF-Familie und fördern die Proliferation von Melanozyten und Melanomzellen.

Der **EGF**-Rezeptor ist mit einer Tyrosinkinase gekoppelt und wird vom *erbB*-Gen kodiert. EGF fördert die Zellproliferation und spielt eine entscheidende Rolle bei der Mitose und der Wundheilung. Ausserdem scheint es, dass eine erhöhte EGF Expression mit der Melanom-Prädisposition assoziiert ist (Shahbazi *et al.*, 2002).

TGF-Proteine bestehen aus einer TGF- α , - β_1 , - β_2 und - β_3 Untereinheit. **TGF- α** wird von den meisten Melanomzellen und von Keratinozyten produziert, ist aber in Melanozyten nicht nachzuweisen. TGF- α weist eine grosse Homologie zu EGF auf, beide binden an denselben Rezeptor und fördern die Zellproliferation (Shih *et al.*, 1994). **TGF- β** hat auf das Wachstum von Melanozyten eine inhibitorische Wirkung. Melanomzellen dagegen werden durch TGF- β nicht inhibiert, viele Tumorzellen produzieren ihn selbst. Es ist wahrscheinlich, dass die Expression von TGF- β mit der Invasion und Metastasierung des Melanoms zusammenhängt (Berking *et al.*, 2001).

In situ zeigen sowohl Melanozyten und Nävi als auch Melanomzellen eine Expression von TGF- β_1 . Mit zunehmender Tumorprogression korreliert die Expression der beiden Isoformen TGF- β_2 und - β_3 , wobei in primären und metastatischen Melanomen ein heterogenes Expressionsmuster von TGF- β_2 vorliegen kann (Schmid *et al.*, 1995, Van Belle *et al.*, 1996).

Das **MIA** Protein wird im Primärmelanom und Melanommetastasen exprimiert, wobei es mit der Tumorprogression *in vivo* korreliert (Bosserhoff *et al.*, 1997a, Golob *et al.*, 2000, Guba *et al.*, 2000). MIA ist 11kDA gross und auf Chromosom 19q13.32-19q13.33 lokalisiert (Blesh *et al.*, 1994). Die erste beschriebene Funktion von MIA besteht in der Proliferationshemmung von Melanomzellen *in vitro*. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass MIA die spezifische Bindung von Melanomzellen an Fibronectin und Laminin *in vitro* inhibiert. Weitere Analysen konnten eine direkte Bindung zwischen Matrixproteinen und MIA nachweisen (Bosserhoff *et al.*, 1998). Die Transkriptionsfaktoren HMG1 (*high mobility group*), MATF (*melanoma associated transcription factor*) und p65 regulieren die MIA Expression im Verlauf der Melanomprogression, indem sie an eine bestimmte Promotorregion (HCR = *highly conserved region*) binden (Poser *et al.*, 2003).

I.1.3.5 Antiapoptotische und proapoptotische Faktoren

Die Regulation der Apoptose ist ein wichtiger Schritt in der Krebstherapie. In der Tumorentstehung spielt dabei die Störung des Gleichgewicht zwischen proapoptotischen und antiapoptotischen Proteinen eine entscheidende Rolle. Diese Störung führt meist bei Melanomen zu einer Chemotherapeutika-Resistenz (Tang *et al.*, 1998, Helmbach *et al.*, 2001, Röckmann und Schadendorf *et al.*, 2003). Zu den proapoptotischen Genen gehören Bax, APAF1, Fas (CD95) und TRAIL-R, während zu den antiapoptotischen Genen Bcl-2, Bcl-xL, FLIP, lösliches Fas (CD95) und Survivin (IAP) gehören (Ivanov *et al.*, 2003).

Das **Bcl-2** Onkogen wurde als erstes in B-Zell-Lymphomen beschrieben, in welchem es die Apoptose unterbindet (Tsujimoto *et al.*, 1985). In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass hohe Level an Bcl-2 mit einer schlechten Prognose einhergehen (Gradilone *et al.*, 2003). Beim malignen Melanom ist im Primärmelanom und in den Metastasen eine reduzierte Bcl-2 Expression zu beobachten, während in benignen Nävi eine hohe Expression zu sehen ist (Tang *et al.*, 1998). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 über eine Stabilisierung der VEGF mRNA in der Angiogenese eine Rolle spielt (Iervolino *et al.*, 2002).

Die Expression des proapoptotischen Proteins **Bax** nimmt im Verlauf der Progression des malignen Melanoms ab (Gradilone *et al.*, 2003). Es scheint, dass die Bax Expression die Bcl-2 Funktion durch die Bildung von Bcl-2/Bax Heterodimeren inhibiert (Oltvai *et al.*, 1993).

Bcl-x kommt in zwei Formen vor: Bcl-xL (*long*) und Bcl-xS (*short*). Bcl-xL blockiert die Apoptose, während Bcl-xS als dominanter Inhibitor von Bcl-2 agiert, aber proapoptotisch wirkt (Gradilone *et al.*, 2003). Bcl-xL ist unter anderem für die Chemoresistenz in Melanomzellen verantwortlich, und kann durch Antisense-Therapien inhibiert werden (Heere-Ress *et al.*, 2002, Olie *et al.*, 2002). Leiter *et al.*, zeigte, dass beim malignen Melanom die Bcl-2 und Bcl-xL Überexpression mit der Progression korreliert (Leiter *et al.*, 2000). Dies führte zur Vermutung, dass die Überexpression dieser beiden Genen das Malignitätspotential durch die Inhibition der Apoptose und des Tumorwachstums verringert.

Survivin gehört zu den IAP's (*inhibitors apoptosis*). Survivin ist ein antiapoptotisches Gen, welches das Tumorwachstum *in vivo* inhibieren kann (Grossman *et al.*, 1999). Eine Deregulation von Survivin beeinflusst sowohl die epidermale Homöostase als auch die Entwicklung des malignen Melanoms (Chiodino *et al.*, 1999, Grossman *et al.*, 1999). Ausserdem führt eine Unterdrückung der Survivin Expression zu einer erhöhten Sensibilisierung der Melanomzellen auf chemotherapeutische Agenzien (Ambrosini *et al.*, 1998, Grossman *et al.*, 1999, Mesri *et al.*, 2001, Pennati *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass die Survivin Expression zellzyklusabhängig ist (Soengas *et al.*, 2003).

FLIP gehört zu den antiapoptotischen Faktoren, und seine Expression korreliert beim malignen Melanom mit der Tumorprogression (Grossman *et al.*, 2001). Jedoch ist der Einfluss von FLIP bei der Chemoresistenz umstritten. FLIP wird beim malignen Melanom überexprimiert, somit könnten hohen FLIP Konzentrationen für die Chemoresistenz *in vivo* verantwortlich sein (Irmeler *et al.*, 1997, Bullani *et al.*, 2001).

APAF-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*) bindet an Cytochrom C und Caspase-9 und erleichtert somit die p53-abhängige Apoptose (Soengas *et al.*, 2001, Baldi *et al.*, 2004). In einer Vielzahl metastatischer Melanomzelllinien konnte eine Mutation des APAF-1 Gens gefunden werden. Ausserdem besteht eine negative Korrelation zwischen der APAF-1 Expression und der Tumordicke. Dies führte zu der Vermutung, dass APAF-1 als Indikator für die maligne Transformation im Melanom agieren kann (Baldi *et al.*, 2004).

Bei malignen Melanomen, welche eine schwache APAF-1 Expression aufzeigten, konnte eine Chemoresistenz beobachtet werden (Soengas *et al.*, 2001).

Die **Fas** (Apo-1/CD95) Expression ist beim malignen Melanom herunterreguliert, somit kann über den Fas-Rezeptor keine Apoptose mehr ausgelöst werden (Bullani *et al.*, 2002, Ivanov *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass Melanomzellen das Apoptosemolekül **FasL** (Fas-Ligand, CD95L), aber nicht Fas selbst exprimieren, eröffnete die Möglichkeit eines neuen „Immune-escape“-Mechanismus. Dies konnte dadurch belegt werden, dass Melanomzellen in der Lage sind, die infiltrierenden Fas-positiven T-Zellen über eine Apoptoseinduktion zu eliminieren (Hahne *et al.*, 1996). Ausserdem konnte eine starke Fas-L Expression in Primärtumoren und Metastasen des malignen Melanoms beobachtet werden. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen der Fas- bzw. Fas-L Expression und der Tumordicke beobachtet werden (Terheyden *et al.*, 1999, Soubrane *et al.*, 2000).

I.2 Zielsetzung

Da Tumore in ihrer Entstehung und Progression komplex und heterogen sind, ist es nötig, Gene zu identifizieren, die im Melanom bzw. in der Metastase spezifisch exprimiert bzw. reprimiert werden. Bei der Transformation zu malignen Zellen werden die biologischen Prozesse der Zellen verändert. Dies erfolgt primär über Unterschiede in der Regulation der Genexpression. Als Folge tritt eine Veränderung der von der Zelle gebildeten Proteine auf. Um die Fähigkeit der Tumorentstehung und die Eigenschaft zur Metastasierung zu erlangen, müssen die Zellen mit neuen Adhäsionsmolekülen, Proteinase, Wachstumsfaktoren etc. ausgestattet werden. Anhand von Genen, die dem Tumor unkontrolliertes Wachstum, Invasion, Migration und Metastasierung ermöglichen, können Modelle für die Entwicklung der Tumorentstehung und dessen Progression entwickelt werden. Jedoch sind die Gendefekte, die zur Metastasierung des Melanoms führen, weiterhin unbekannt.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Identifizierung differentiell regulierter Gene im Primärtumor im Vergleich zur Metastase des malignen Melanoms. Dazu werden die Methoden der Laser Capture Microdissection zur Isolierung reiner Tumorzellen, die Amplifikation der cDNA über die SMART-Methode und die PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung angewendet. Basierend darauf sollen interessante Kandidatengene funktionell auf ihre Rolle in der Invasion und Metastasierung des malignen Melanoms untersucht werden. Diese neuen Informationen werden in bestehende Modelle der Tumorprogression eingegliedert. Die Isolierung differentiell exprimierte Gene spielt vor allem deshalb eine große Rolle, da mit ihrer Hilfe die Entstehungs- und Progressionsmechanismen eines Tumors verständlicher gemacht werden können. Ausserdem können neu gefundene beteiligte Gene zu einer besseren Klassifizierung der heterogenen Gruppe der Melanome führen und prognostische Aussagen erleichtern, woraus sich die Möglichkeit der Entwicklung neuer und spezifischer Therapieansätze ergeben könnte.

II Material und Methoden

II.1 Materialien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), und Roth (Karlsruhe) bezogen. Enzyme und Feinchemikalien wurden von Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biolabs (Schwalbach), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Promega (Heidelberg), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen. Das Fotomaterial war von Fuji und Kodak.

II.1.1 Lösungen

Citratpuffer

9ml 0,1M Zitronensäure (Stammlösung I)

41ml 0,1M Natriumcitrat (Stammlösung II) in 500ml dest. H₂O

DEPC-H₂O

0,1 % Diethylpyrocarbonat (Sigma, München) in 1000ml dest. H₂O mit
anschliessendem Autoklavieren

50x Denhards

1% BSA

1% Ficoll

1% Polyvinylpyrrolidin in 100ml autoklav. H₂O lösen und
sterilfiltrieren

Ethidiumbromid

500ml 1x TBE

50µl Ethidiumbromid (10mg/ml)

6x Agarosegel-Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol

30% Glycerin

Lösung I (für Plasmid-Präparation)

50mM Glukose

25mM Tris pH 8,0,

10mM EDTA pH 8,0

Lösung II (für Plasmid-Präparation)

0,2N NaOH

1% SDS

Lösung III (für Plasmid-Präparation)

3M Kaliumacetat

11,5% Essigsäure

Maleinsäure-Lösung

0,1M Maleinsäure

0,15M NaCl

pH 7,5

Protein K Puffer (*in situ* Hybridisierung)

100mM Tris HCl (pH 7,5)

50mM EDTA

Puffer I (*in situ* Hybridisierung)

100mM Tris HCl

150mM NaCl

pH 7,5

Puffer III (*in situ* Hybridisierung)

100mM Tris

100mM NaCl

50mM MgCl₂

pH 9,5

Puffer IV (*in situ* Hybridisierung)

10mM Tris

1mM EDTA

pH 8,0

P 60 Elutions-Puffer

10mM Tris HCl pH 8,0
1mM EDTA
50mM NaCl

Stammlösung A (Immunhistochemie)

0,1M Zitronensäure

Stammlösung B (Immunhistochemie)

0,1M Natriumcitrat

20X SSC

3M NaCl
0,3M Tri Natrium Citrat Dihydrat pH 7,0
H₂O ad 1000ml

50x TAE Puffer

242g Tris base
57,1ml Essigsäure
37,2g Na₂EDTA · 2H₂O
H₂O ad 1000ml

10x TBE Puffer

0,45M Tris
0,45M Borsäure
0,01 M EDTA

TE Puffer

10mM Tris pH 7,6
1mM EDTA

1x TNE Puffer

10mM Tris-HCl pH 8,0
10mM NaCl
0,1mM EDTA

10x PBS

1,3M NaCl
70mM Na₂HPO₄
30mM NaH₂PO₄
pH 7,4

II.1.2 Medien und Platten

LB-Medium

10g NaCl
10g Trypton
5g Hefeextrakt
H₂O ad 1000ml und anschliessendem Autoklavieren

SOC Medium

2% Bactotrypton (Pepton 140)
0,5% Hefeextrakt
10mM NaCl
2,5mM KCl
10mM MgCl₂
10mM MgSO₄
20mM Glukose
H₂O ad 1000ml, pH 7,5

Ampicillinhaltige Medien

Ampicillin (100µg/ml) wird erst nach Erkalten des Flüssigmediums auf ca. 56°C zugegeben.

LB-Agarplatten

LB Medium
1,5% Agar-Agar
H₂O ad 1000ml

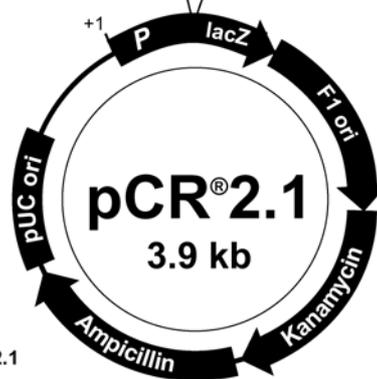
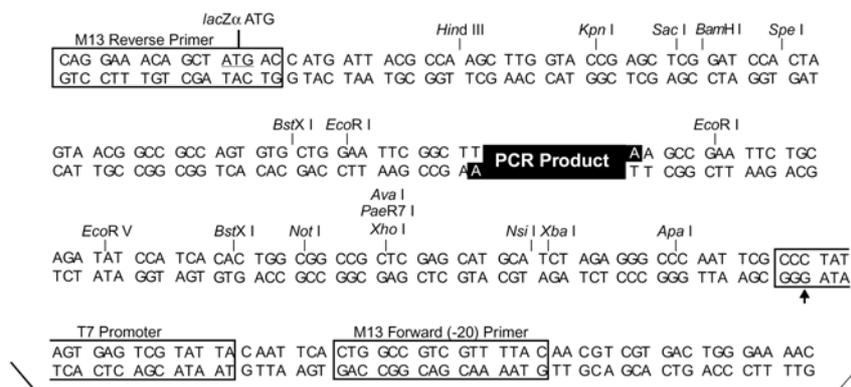
II.1.3 Bakterienstämme

- **TOP 10F'** [F' [*lacI^q*, Tn10(Tet^R)], *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139* Δ (*ara-leu*)7679, *galU galK rpsL*(StrR), *endA1*, *nupG* (Grant *et al.*, 1990).
- **InV-αF'** F' *endA1*, *recA1*, *hsdR17*(r_k⁻,m_k⁺), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, F80*lacZ*Δ M15, Δ(*lacZYA-argF*) U169

II.1.4 Plasmidvektoren

II.1.4.1 PCR 2.1 (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)

Bakterieller Klonierungsvektor von PCR-Produkten (mit A-Überhang) mit einer Ampicillin- und Kanamycinresistenz und dem α-Peptid des *lacZ*-Gens für eine mögliche "Blau-Weiss-Selektion".

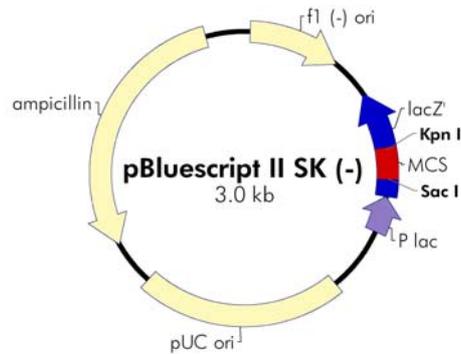


Comments for pCR[®]2.1
3929 nucleotides

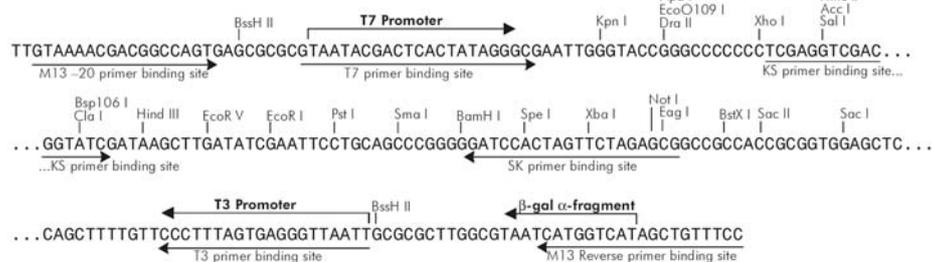
II.1.4.2 pBluescript SK (Stratagene, Heidelberg)

Bakterieller Klonierungsvektor mit einer Ampicillinresistenz und dem α -Peptid des lacZ Gens, zur Blau-Weiss Selektion.

f1 (-) origin 21-327
 β -galactosidase α -fragment 460-816
 multiple cloning site 653-760
 lac promoter 817-938
 pUC origin 1158-1825
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976-2833



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826)



II.1.5 Verwendete molekularbiologische Kits

- Advantage[®] 2 Polymerase Mix BD Biosciences Clontech (Heidelberg)
- DIG Oligonukleotide 3' End labeling Roche (Mannheim)
- Gel Extraction Qiagen (Hilden)
- Original TA Cloning[®] Invitrogen (NV Leek, Niederlande)
- PCR Purification Qiagen (Hilden)
- PCR-Select[™] cDNA Subtraction BD Biosciences Clontech (Heidelberg)
- Purescript[™] RNA Purification Gentra (Minneapolis, USA)
- Quickprep[®] Micro mRNA Purification Amersham-Pharmacia (Freiburg)
- SMART[™] PCR cDNA Synthesis BD Biosciences Clontech (Heidelberg)
- Vectastain ABC Kit Vector (Linaris GmbH, Wertheim)

II.1.6 Oligonukleotide

SMART Primer (BD Biosciences Clontech; Heidelberg)

Name	Sequenz (5' → 3')
BD SMART II™ A Oligonukleotid	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG RsaI
3' BD SMART™ CDS Primer II A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT ₍₃₀₎ VN RsaI N = A,C,G oder T; V = A,G oder C
5' PCR Primer II A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung Primer (BD Biosciences Clontech; Heidelberg)

Name	Sequenz (5' → 3')
cDNA Synthesis Primer	TTTTGTAC AAGCTT ₃₀ N ₁ N RsaI HindIII
Adaptor 1	_____ T7 Promotor _____ NotI _____ RsaI 1/2 CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT SfiI/SmaI
Adaptor 2R	_____ T7 Promotor _____ EagI/EaeI _____ RsaI 1/2 CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
PCR Primer 1	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Nested PCR Primer 1	TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT
Nested PCR Primer 2R	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
G3PDH 5' Primer	ACCACAGTCCATGCCATCAC
G3PDH 3' Primer	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

PCR Primer (Invitrogen NV Leek, Niederlande)

Name	Sequenz (5' → 3')
Tyrosinase 1-FO	TTGGCAGATTGTCTGTAGCC
Tyrosinase 2-RE	AGGCATTGTGCATGCTGCTT
Nested Tyrosinase 3-FO	GTCTTTATGCAATGGAACGC
Nested Tyrosinase 4-RE	GCTATCCCAGTAAGTGGACT
GAPDH 1-FO	GACAACAGCCTCAAGATCATC
GAPDH 2-RE	GACGGCAGGTCAGGTCCACCA
Nested GAPDH 3-FO	AATGCCTCCTGCACCACC
Nested GAPDH 4-RE	ATGCCAGTGAGCTTCCCG
MelanA 1-FO	CTGACCCTACAAGATGCCAAG
MelanA 2-RE	GATTAGTACTGCTAGCGGACC
Nested MelanA 3-FO	ACTGCTCATCGGCTGTTGGT
Nested MelanA 4-RE	TCAGCATGTCTCAGGTGTCT

Sequenzierungsprimer (BD Biosciences Clontech, Heidelberg und Roth, Karlsruhe)

Name	Sequenz (5' → 3')
Nested PCR Primer 1	TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT
Nested PCR Primer 2	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
SK Vektor Primer	CGCTCTAGAACTAGTGGATC
KS Vektor Primer	TGCGAGGTCGACGGTATC

II.1.7 Antikörper

Spezifischer Erstantikörper

- Anti-67kDa Laminin receptor IgM (Maus, monoklonal, Ab-1) Dianova (Hamburg)

Speziesspezifischer Zweitantikörper

- Anti Maus IgM, FITC Konjugat (FACS Analyse) Sigma (München)
- Biotinlierter anti Maus IgM Antikörper (Immunhistochemie) Vector (USA)

II.1.8 Datenbankprogramme

Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST Programms (Altschul *et al.*, 1997) auf Homologien mit bekannten Genen in der GenBank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA DataBank of Japan) PDB (Brookhaven Protein Databank) und SWISS Datenbank untersucht. Folgende Internetseiten führen zu den wichtigsten, in dieser Arbeit benutzten Datenbankprogrammen:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.expasy.org>
- <http://www.hprd.org>
- <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

II.2 Zellbiologische Methoden

II.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Für die Kultivierung von verschiedenen Melanomzelllinien wurde RPMI 1640 Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 10% fetalem Kälberserum, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Die unterschiedlichen WM-Melanomzelllinien sind freundlicherweise von Prof. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia USA) und die Zelllinien M5, Mewo, SKMel 19, SKMel 28 und IGR 39 von Prof. Garbe (Hautklinik Tübingen) zur Verfügung gestellt worden (siehe Tabelle 1). Ausserdem wurden aus humaner Vorhaut Primärkulturen von Fibroblasten, Melanozyten und Keratinozyten gewonnen. Diese wurden freundlicherweise von PD Dr. Friedegund Meier zur Verfügung gestellt worden.

Tabelle 1: Verwendete Melanomzelllinien.

Ursprung	Zellkultur	Referenz
RGP Melanome	WM 35	Andalib <i>et al.</i> , 1997
	WM 1552	Andalib <i>et al.</i> , 1997
	IGR 39	Aubert <i>et al.</i> , 1980
VGP Melanome	WM 115	Andalib <i>et al.</i> , 1997
	WM 793	Andalib <i>et al.</i> , 1997
Melanommetastasen	WM 451 LU	Andalib <i>et al.</i> , 1997
	WM 1205 LU	Andalib <i>et al.</i> , 1997
	MeWo	Carey <i>et al.</i> , 1976
	M5	Leyva <i>et al.</i> , 1983
	SK-Mel 19	Carey <i>et al.</i> , 1976
	SK-Mel 28	Carey <i>et al.</i> , 1976

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 Isolierung reiner Tumorzellen über Laser Capture Mikrodissektion

Die Zellen können anhand des PixCell II[®] Systems (Arcturus, Mountain View, CA, USA) durch das Mikroskop als auch durch den Videomonitor direkt visualisiert und bestimmt werden. Bei der Laser Capture Microdissection (LCM) werden die Zellen des Interesses auf einem Polymerfilm (Cap; Ø 5mm) transferiert. Das Cap besteht aus einem transparenten thermostabilen Polymerfilm (Ethylenvinylacetat). Nach der Aktivierung des Caps durch einen Infrarotlaser (Ø 7,5µm–30µm) wird der Polymerfilm leicht erwärmt und die gewünschten Zellen werden auf das Cap überführt. 800-1200 Laserimpulse erwiesen sich als ausreichend, um mit Hilfe des SMART-Kits eine gute cDNA Qualität zu erreichen. Hierfür wurden ca. 5 Objektträger mit je 2 Gewebsschnitten benötigt.

Bei der Übertragung der Melanomzellen auf das Cap bleibt sowohl die Morphologie der Zellen als auch die vorhandene DNA, RNA und Proteine weitgehend intakt (siehe Abb.1).

Die einzelnen Caps (CapSure™, Arcturus, Mountain View, CA, USA) wurden sofort in 500µl Reaktionsgefäße überführt. In jedem 500µl Eppendorfgefäß wurden 15µl Lysepuffer (Gentra, Minneapolis, USA) und 0,3µl RNase Inhibitor (10U/µl, Roche, Mannheim) vorgelegt. Die Reaktionsgefäße wurden dann auf den Kopf gestellt, so dass die Caps vollständig mit dem Lysepuffer bedeckt werden. Nach einer Inkubationszeit von 5 Min. bei Raumtemperatur wurden die Melanomzellen des Primärtumors bzw. Lymphknotenmetastase vom Cap abzentrifugiert (1 Min. bei 13.000 Upm). Das Cap kann nun aus dem Eppendorfgefäß entfernt werden. Die Proben wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren, damit keine Degradation der RNA erfolgt. Die einzelnen Reaktionsgefäße können anschliessend bei -80°C aufbewahrt werden.

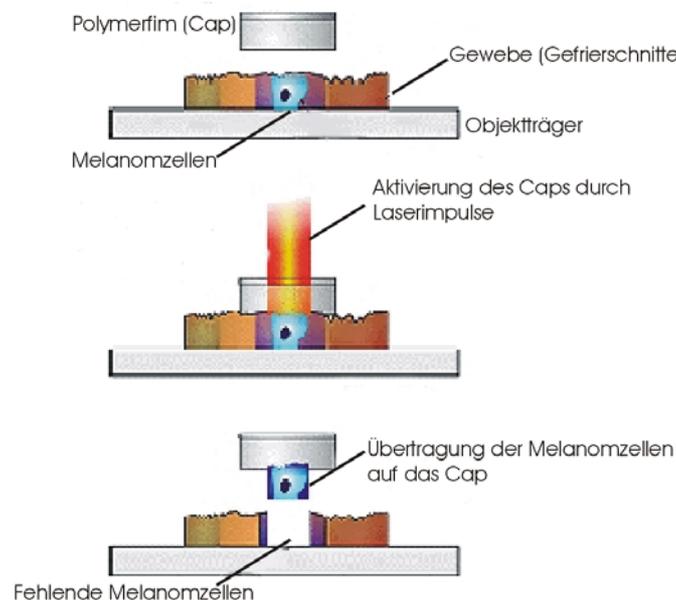


Abb. 1: Übersicht der Cap Aktivierung nach Emmert-Buck *et al.*, 1996. Das Cap wird über einem Laserimpuls aktiviert. Die Polymeroberfläche vom Cap wird dabei leicht erwärmt und die erwünschten Melanomzellen können nun aus dem Gewebe auf das Cap überführt werden.

II.3.1.1 Selektion des Gewebematerials für die Laser Capture Mikrodissektion

Aus Gewebeschnitten wurden reine Melanomzellen von je 2 superfiziell spreitenden (Clark Level IV) und 2 nodulären Melanomen (Clark Level V) und je 4 Lymphknotenmetastasen über LCM isoliert und gepoolt. Durch das Poolen wird ein repräsentativer Querschnitt der Genexpression der Melanomzellen erreicht. Dabei basiert die Auswahl der Schnitte auf histologischen Befunden. Zur Kontrolle vor der LCM wurden freundlicherweise von der histologischen Abteilung der Hautklinik maschinell (DAKOautostain, Hamburg) Hematoxyllin & Eosin (HE)- und HMB 45 -Färbungen an Gefrierschnitten angefertigt, um bestimmen zu können, in welchem Areal sich die Melanomzellen im Gewebe befinden.

II.3.1.2 HE (Hematoxillin & Eosin Y) Färbung

Anhand einer HE Färbung werden die Zellen im Primärtumor bzw. in den Lymphknotenmetastasen im Gewebe angefärbt. Die Objektträger (50SuperFrost, R. Langenbrinck, Emmendingen) wurden zuerst mit 100% Ethanol gesäubert. Die 5µm dicken Kryostatschnitte wurden dann auf Objektträger überführt. Für 30 Sek. wurden die Kryostatschnitte in 70% Ethanol fixiert (Goldsworthy *et al.*, 1999). Dann wurden die Schnitte in Hematoxillin (Merck, Darmstadt) für 1,5 Min. überführt. Nach einer Waschung in Ampuva-H₂O (Fresenius, Homburg) für 5 Sek. wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% Ethanol, 95% Ethanol) für je 1 Min. überführt. Anschliessend erfolgte die Eosin Y Färbung für 30 Sek. (1,5g Eosin Y (Merck, Darmstadt) auf 150ml 70% Ethanol lösen und mit 500µl Eisessig versetzen). Nach einer weiteren Ethanolreihe (2 Min. 95% -, 2 Min. 95% - und 2 Min. absoluten Ethanol) wurden die Proben zweimal mit Xylol für 2,5 Min. behandelt. Das Xylol dient dazu, das Wasser aus den Zellen zu ziehen.

Die Objektträger wurden nach der Lufttrocknung (10 Min.) mit einem fuselfreien Tuch von den letzten Tropfen gesäubert und ohne Deckglas sofort für die anschliessende Laser Capture Microdissection eingesetzt.

II.3.1.3 RNA Extraktion aus mikrodisektierten Zellen

Zur Zelllyse wurden die Proben schnell bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 100µl Gentrallysepuffer (Minneapolis, USA) aufgefüllt. Mit einer Spritze (100 Sterican Gr.1, Ø 90 x 40, Braun, Melsungen) wurden die Zellen zur vollständigen Lyse nochmals homogenisiert. Für die RNA-Präzipitation wurden 100µl Isopropanol und 1µl tRNA als Carrier (20mg/ml; Merck, Schwalbach) hinzugegeben und gründlich durch Invertieren des Eppendorfgefässes gemischt. Nach Zentrifugation (3 Min. bei 13.000 Upm) wird der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 100µl 70% Ethanol gründlich gewaschen und für 1Min. bei 13.000 Upm zentrifugiert. Nachdem das Ethanol abgenommen ist, wurde das Pellet luftgetrocknet (ca. 10 Min.). Für eine komplette Rehydrierung erfolgte die Zugabe von 20µl Rehydrierungslösung (Gentra, Minneapolis, USA) mit einer anschliessenden Inkubation für 30 Min. auf Eis. Die gelöste RNA kann daraufhin bei -80° gelagert werden.

Parallel hierzu wurde die RNA aus den mikrodisektierten Melanomzellen der Lymphknotenmetastasen bzw. Primärmelanomen über das RNA CleanTM System extrahiert (siehe II.2.2.2.2). Somit konnte beide Methoden miteinander verglichen werden. Die Analyse der RNA-Qualität und/oder Quantität aus den mikrodisektierten Melanomzellen der Primärmelanom bzw. Lymphknotenmetastasen erfolgte über spektrometrische Messungen.

Die RNA Konzentration wurden hierbei nach einer OD Messung bei 260nm mit Hilfe folgender Formel errechnet: RNA Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) = $\text{OD}_{260/280} \times 40 \times \text{Verdünnung}$.

II.3.2 RNA Isolierung

II.3.2.1 RNase freies Arbeiten

Aufgrund der schnellen Degradierung von RNA ist es wichtig, alle angewandten Arbeitsflächen und Materialien von RNasen zu befreien. Alle verwendeten Lösungen wurden mit 0,1% DEPC-H₂O angesetzt und anschliessend autoklaviert. DEPC zerstört die RNasen, wirkt aber auch nukleinsäureschädigend. Daher müssen die Lösungen, die mit DEPC-H₂O angesetzt worden sind, anschliessend autoklaviert werden, da DEPC dann in CO₂ und Ethanol zerfällt und somit nicht mehr nukleinsäureschädigend wirken kann. Materialien, die nicht autoklaviert werden können, werden vor Gebrauch mit einer 0,1% SDS Lösung in DEPC-H₂O behandelt.

II.3.2.2 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Für die RNA-Isolierung wurde sowohl Gesamt-RNA als auch polyA⁺mRNA aus den unterschiedlichen Zelllinien (siehe Tabelle 1) verwendet. Für die Gesamt-RNA Extraktion wurde das RNA CleanTM System (Guanidiniumisothiocyanat- β -Mercaptoethanol- Phenol Mix, AGS, Heidelberg) eingesetzt. Das vorhandene Guanidiniumisothiocyanat lysiert die Zellwände und inhibiert die RNasen, während das β -Mercaptoethanol die Proteine denaturiert. Für die RNA-Elution von 10⁶ Zellen wurde 1,8ml RNA Clean und 180 μ l Chloroform eingesetzt. Die RNA wurde dann 5 Min. auf Eis gehalten und anschliessend bei 4°C für 15 Min. und 13.000 Upm zentrifugiert. Nach einer Chloroform Aufreinigung erfolgte eine 5minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C. Die RNA wurde mit Isopropanol auf Eis für 15 Min. gefällt. Anschliessend wurde durch Zentrifugation (5 Min. bei 13.000 Upm und 4°C) die RNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50 μ l TE Puffer aufgenommen und bei -70°C gelagert.

Für die polyA⁺mRNA Gewinnung wurde das Quickprep[®] Micro mRNA Purification Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg) angewandt. Die Isolierung der RNA aus 10⁷ Zellen der einzelnen Zelllinien wurde genau nach Anleitung des Kits durchgeführt. Die Extraktion erfolgte nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Die polyadenylierte RNA bindet an Oligo (dT) Zellulose. Diese wurde mit zwei verschiedenenhaltigen Salzpuffern gewaschen und auf Microspinsäulen aufgetragen.

Hier erfolgte die Trennung der gebundenen polyA⁺mRNA an die Oligo (dT) Zellulose von der im Überstand nicht gebundenen RNA, Proteinerückständen und DNA. Daraufhin wurde die polyA⁺mRNA mit 0,2ml Elutionspuffer für 5 Sek. bei 13.000 Upm zentrifugiert. Daraufhin erfolgte eine Fällung über Nacht mit je 50µg des Carriers Glykogen, 1/10 Vol. Kaliumacetat und 2,5 Vol. absolutem Ethanol. Die RNA wurde in DEPC-H₂O resuspendiert und bei -70°C aufbewahrt. Die polyA⁺mRNA wurde daraufhin spektrometrisch gemessen. Die RNA Konzentration wurde nach einer OD Messung bei 260nm mit Hilfe folgender Formel errechnet: RNA Konzentration (µg/ml) = OD_{260/280} x 40 x Verdünnung

II.3.2.2.1 cDNA Herstellung aus Zelllinien

Für die Überprüfung der GAPDH-, MelanA- und Tyrosinase- Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) wurde cDNA von der metastatischen Zelllinie SK-Mel 28 hergestellt. Zu den 3µg SK-Mel 28 Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial wurde 8µl 5x RT-Puffer (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, Invitrogen, Niederlande), 0,2µg Hexamerprimer (Amersham-Pharmacia, Freiburg), 2mM dNTP's (Amersham-Pharmacia, Freiburg) und 1µl Dithiothreitol (DTT, 20mM, Invitrogen, Niederlande) hinzugefügt. Nach einer 10minütigen Inkubation bei 70°C wurde die Probe herunterzentrifugiert (1 Min. bei 13.000Upm) und für 3Min. auf Eis stehen gelassen. Anschliessend wurde 0,5µl SuperScriptTM Reverse Transkriptase Enzym (200U/µl, Invitrogen, Niederlande) hinzupipettiert und bei 42°C für 1Std. inkubiert. Danach wird zur Inaktivierung des Enzyms die cDNA für 15Min. bei 70°C gehalten und kann anschliessend bei -20°C aufbewahrt werden.

II.3.3 Überblick der SMARTTM PCR cDNA Synthese (Switch Mechanism at the 5' end of RNA Templates)

Über die SMART-Methode wird die cDNA über eine PCR Amplifikation angereichert (Chenchik *et al.*, 1998; Herrler *et al.*, 2001). Für die SMART cDNA Synthese kann sowohl PolyA⁺ RNA als auch Gesamt-RNA verwendet werden, wobei ein Minimum von 25ng PolyA⁺ RNA und 50ng Gesamt-RNA eingesetzt werden muss. Die Methode der SMART cDNA Synthese beinhaltet mehrere Schritte: die Erstrang cDNA Synthese, die Zweitstrang cDNA Synthese über eine LD (*long distance*) PCR Amplifizierung und die Aufreinigung der PCR Proben. Danach werden die aufgereinigten Proben einem RsaI-Restriktionsverdau unterzogen, damit bei der anschliessenden PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung Adaptoren ligiert werden können.

Nach erfolgreichem RsaI-Verdau werden die Proben einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und gefällt.

Die SMART Synthese beginnt mit der Gesamt-RNA aus den mikrodisektierten Melanomzellen aus Primärtumor- und Lymphknotenmetastasengewebe als Ausgangsmaterial. Sobald die Reverse Transkriptase (RT) nach der Einleitung der Erstrangssynthese das 5' Ende der RNA erreicht, führt die Aktivität der terminalen Transferase, einer Untereinheit der RT, zu einer Anheftung von Desoxycytidine am 3' Ende der cDNA durch die BD SMARTTM CDS Primer IIA (siehe II.1.6). Die BD SMARTTM IIA Oligonukleotide (siehe II.1.6), die an ihren 3' Enden eine Oligo(G)-Sequenz aufweisen, können nun Basenpaarbindungen mit den Desoxycytidine eingehen. Danach wechselt die RT die Matrize und beendet die Auffüllreaktion. Bei langen mRNA's bzw. bei mRNA's mit einer komplexen Sekundärstruktur kann oft die Reverse Transkriptase (RT) nicht die gesamte mRNA Sequenz transkribieren. Somit sind meist die 5' Enden der Gene in den entsprechenden cDNA's unterrepräsentiert. Mit der Hilfe der modifizierten SMART Oligonukleotide können durch den Matrizenwechsel und der abschliessenden Auffüllreaktion der Matrize komplette cDNA's hergestellt werden (Chenchik *et al.*, 1998; Zhu Y.Y *et al.*, 2001). Die resultierende Einzelstrang cDNA enthält nun das komplette 5' Ende der entsprechenden mRNA (Chenchik *et al.*, 1998). Anschliessend kann anhand einer LD PCR Doppelstrang cDNA hergestellt und angereichert werden (siehe Abb.2).

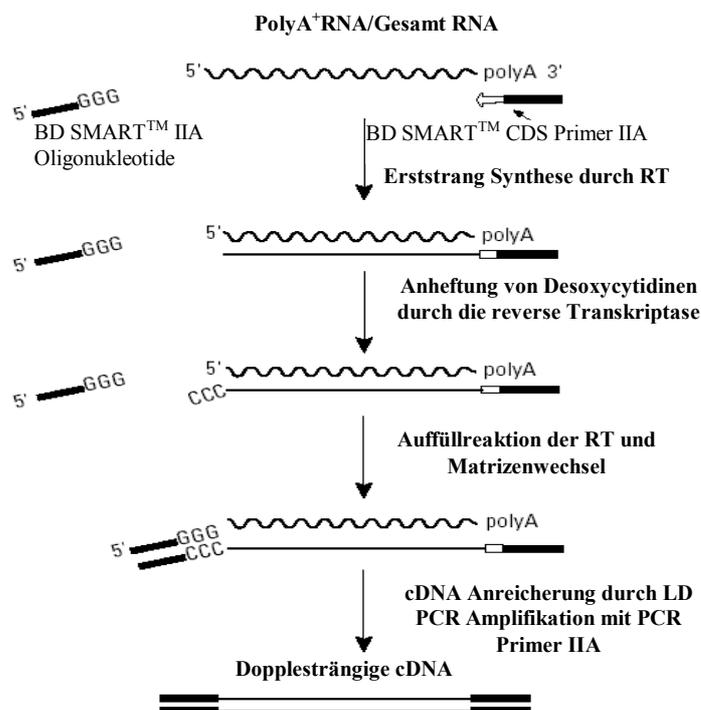


Abb. 2: Schematische Darstellung der SMART Methode. Nach der Anleitung für den Clontech SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (Erklärungen siehe Text).

II.3.3.1 SMART Erststrang cDNA Synthese

Die Methode wurde nach der Anleitung des SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo Alto, USA) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente hierfür die extrahierte Gesamt-RNA aus den mikrodisezierten Melanomzellen aus Primärtumor und Lymphknotenmetastase und die im Kit vorhandene Positiv Kontrolle (Gesamt-RNA von humane Plazenta). Für die Erststrang cDNA's Synthese wurden je 3µl Gesamt RNA für die Primärmelanom Proben eingesetzt, von der Positiv Kontrolle wurde hingegen nur 1µl (1µg) verwendet. Zu den RNA's wurden 1µl SMART CDS Primer IIA (CDS, 12µM, siehe II.1.1.6) und 1µl BD SMART™ IIA Oligonukleotide (12µM, siehe II.1.6) hinzugegeben. Das Endvolumen bei allen Proben betrug 5µl. Die Substanzen wurden gemischt und für 2 Min. bei 70°C im PCR Zyklus (Biozym, Oldendorf) inkubiert. Danach wurden die Proben kurz bei Raumtemperatur gehalten, und folgende Reagenzien hinzugefügt: 2µl 5x First strand Puffer (250mM Tris HCl pH 8,0, 375mM KCl, 30mM MgCl₂), 1 µl Dithiothreitol (DTT, 20mM), 1 µl dNTP (je 10mM) und 1µl BD Power Script™ Reverse Transcriptase (200 Units/µl). Die Ansätze wurden dann für 1 Std. bei 42°C im PCR Zyklus (Biozym, Oldendorf) inkubiert. Im folgenden wurden die Erststrang Reaktionen mit 40µl TE Puffer verdünnt. Zur Inaktivierung des BD Power Script Enzyms wurden die Proben für 7 Min. bei 72°C inkubiert und wurden anschliessend bis zu 3 Monate bei -20°C aufbewahrt.

II.3.3.2 cDNA Anreicherung über LD PCR Amplifizierung

Die Methode wurde nach der Anleitung des SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo Alto, USA) durchgeführt. Für die Zweitstrang cDNA Synthese wurde für jede Probe 7µl Einzelstrang cDNA aus II.3.3.1 eingesetzt (Chenchik *et al.*, 1998). Zu den 7µl Einzelstrang cDNA wurde jeweils 10µl 10x Advantage 2 PCR Puffer, 2µl dNTP's (je 10mM), 2µl 5' PCR Primer IIA (12µM, siehe II.1.6) und 74µl deionisiertes H₂O hinzugefügt. Als erstes wurde die ideale Zyklenzahl für das Primärmelanom, Lymphknotenmetastase und der Positiv-Kontrolle humane Plazenta bestimmt. Somit kann der repräsentativer Querschnitt der Genexpressionen in den unterschiedlichen Geweben erhalten werden.

Für die Optimierung der PCR Zyklenzahl wurde für jede Tester oder Treiber cDNA 3 Eppendorfgefässe verwendet, um für die anschliessende PCR Select cDNA subtraktiven Hybridisierung eine suffiziente cDNA Quantität zu erreichen (Chenchik *et al.*, 1998). Nach 15 Zyklen wurden zwei der PCR Tubes bei 4°C aufbewahrt.

Aus dem dritten („extra“) Tube wurde in regelmässigen Zyklenzahlen (18-, 21- und 24) je 15µl Aliquots entnommen und auf Eis aufbewahrt. Je 5µl der einzelnen Aliquots wurden auf einem 1,2% 1x TAE Agarose Gel getestet. Abschliessend wurden die zwei aufbewahrten PCR Tubes den restlichen PCR Zyklen unterzogen. Zum Abstoppen der PCR Reaktionen wurden 2µl 0,5M EDTA zugegeben. Die ideale PCR Zyklenzahl variierte bei den mikrodisektierten Zellen und der Positiv-Kontrolle (humane Plazenta) zwischen 17-20. Die Proben können darauf bei -20°C aufbewahrt werden (siehe Abb.3). Die PCR Reaktionen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Vorheizen	1 Min. bei 95°C	
Denaturierung	15 Sek. bei 95°C	} 17-20x
Annealing	30 Sek. bei 65°C	
Polymerisation	6 Min. bei 68°C	

Die PCR Produkte wurden anschliessend über den QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt:

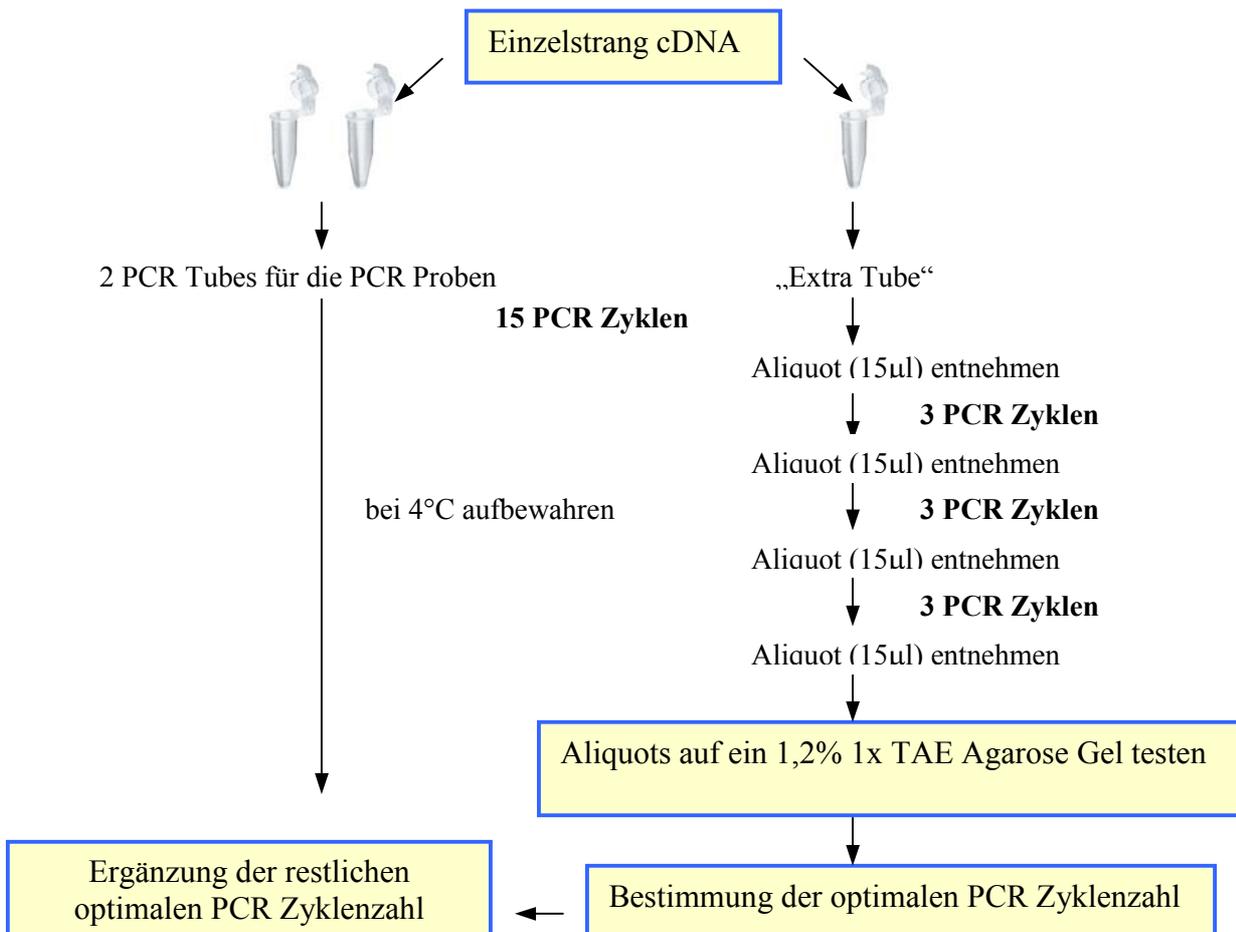


Abb. 3: Schematische Darstellung der PCR Zyklenzahl Optimierung. Nach der Anleitung für den Clontech SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (siehe Erklärung im Text).

II.3.3.3 Aufreinigung der PCR Produkte

Die PCR Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen siehe II.1.5) von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt. Zum PCR Produkt wurde 450µl Puffer PB zugegeben und gemischt. Eine QIAquick Säule wurde auf ein 2ml Eppendorfgefäß gestellt, die Probe auf die Säule gegeben und für 1 Min. bei 13.000Upm zentrifugiert. Dadurch wurde die DNA an die Säule gebunden. Die Säule wurde nun in ein neues Eppendorfgefäß gestellt, mit 0,75ml Puffer PE gewaschen und 1 Min. bei 13.000Upm zentrifugiert. Abschliessend wurde die DNA mit 50µl EB Puffer (10mM Tris HCl, pH 8,5) zentrifugiert und eluiert. Die Proben können bei -20°C aufbewahrt werden.

II.3.3.4 Qualitätskontrolle der über SMART synthetisierten cDNAs (PCR)

Die Qualität der über SMART hergestellten cDNA's wurde über eine GAPDH PCR analysiert. Das Haushaltsgen GAPDH ist ein ubiquitär exprimiertes Transkript. Die GAPDH-PCR läuft für 39 Zyklen nach folgendem Prinzip: 94°C für 1 Min. denaturieren, 56°C für 1,05 Min. Annealing und bei 72°C für 1,05 Min. erfolgt die Elongation (GAPDH Primer 1 und 2 bzw. nested GAPDH 3 und 4 siehe II.1.6) Zusätzlich wurden PCR's mit den beiden Melanommarkern: Tyrosinase und MelanA durchgeführt. Die MelanA-PCR verläuft für 35 Zyklen nach folgendem Muster: 94°C für 1 Min., 54°C für 1,05 Min. und bei 72°C für 1,05 Min. erfolgte die Elongation (MelanA Primer 1 und 2 bzw. nested MelanA 3 und 4 siehe II.1.6). Die Tyrosinase PCR verläuft für 35 Zyklen mit 1 Min. bei 94°C, 1,05 Min. bei 56°C und 1,05 Min. bei 72°C (Tyrosinase Primer 1 und 2 bzw. nested Tyrosinase 3 und 4 siehe II.1.6).

Die PCR Reaktionen wurde nach folgendem Muster durchgeführt: Pro Reaktionsansatz in einem 500µl Reaktionsgefäß: 2µg Template DNA, HPLC-H₂O, 5µl 10x Taq Puffer (0,1M Tris HCl, 15mM MgCl₂, 0,5M KCl) 1µl dNTP (20mM), 50pmol Primer 1, 50pmol Primer 2 und 0,5µl Taq Polymerase (Amersham-Pharmacia, Freiburg). Abschliessend wurden 10µl des PCR Produkts auf einen 1%igem TBE Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

II.3.4 PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung

Das Grundprinzip der subtraktiven Hybridisierung besteht darin, dass die cDNA's zweier zu vergleichender Zellpopulationen hybridisiert werden, wobei die sogenannte Treiber cDNA im Vergleich zur Tester cDNA im vielfachen Überschuss vorliegt. Dabei kann die cDNA, die nur im Tester vertreten ist, aus kinetischen Gründen nur Mischhybride (Tester-Treiber) bilden.

Aus den zu vergleichenden Geweben wurden zuerst Melanomzellen aus Lymphknotenmetastasen (LKM) und Primärmelanomen (PM) mikrodisektiert. Die RNA's wurden isoliert und um einen repräsentativer Querschnitt der Genexpression der Melanomzellen zu erreichen, wurden 15µl der entsprechenden RNA's gepoolt. Die cDNA's wurden über den SMART Kit synthetisiert und anhand einer LD PCR angereichert. Parallel hierzu wurde aus der RNA der Positiv-Kontrolle (Skelettmuskel) des PCR SelectTM cDNA Subtraktionskit die Erst- und Zweitstrang cDNA Synthese eingeleitet. Die cDNA Synthese Primer (siehe II.1.6) enthalten in ihrer Sequenz RsaI Schnittstellen. Die cDNA's wurden mit dem Restriktionsenzym RsaI verdaut, so dass Produkte mit glatten Enden erzeugt wurden, die für die Adaptorenligation essentiell sind.

Bei den späteren PCR Amplifizierungen fungieren diese Adaptoren als Primeransatzstellen. Der Restriktionsverdau wurde auf einem Agarosegel überprüft. Ebenfalls wurde die Adaptorenligation über ein Ligationseffizienztest verifiziert. Um Lymphknotenmetastasen spezifische cDNA's anzureichern wurden mikrodisektierte Lymphknotenmetastasenzellen als Tester und mikrodisektierte Primärmelanomzellen als Treiber benutzt. Um Primärmelanomspezifische cDNA's anzureichern müssen Treiber und Tester in einem zweiten Ansatz ausgetauscht werden. Die Tester cDNA wurde in zwei Fraktionen eingeteilt, an denen die Adaptoren (Adaptor 1 bzw. Adaptor 2R; siehe II.1.6) ligiert wurden.

In der ersten Hybridisierung wurde ein Überschuss an Treiber cDNA jeweils mit der Tester cDNA hybridisiert. Somit entstehen, wenn die cDNA in Tester und Treiber vorkommen aus kinetischen Gründen Mischhybride (1). Hingegen differentielle Transkripte, die nur im Tester vorkommen, einzelsträngig verbleiben (2). Nur diese können bei der anschliessenden zweiten Hybridisierung bei der Vermischung beider Tester Fraktionen Doppelstranghybride mit unterschiedlichen Adaptoren bilden. Sie weisen die unterschiedlichen Adaptoren an ihren cDNA Enden auf und können über PCR exponentiell amplifiziert werden (4). Alle andere cDNA's werden nicht oder nur linear amplifiziert. Zusätzlich können häufig auftretende cDNA's zum Teil mit sich selbst hybridisieren (3). Jedoch wird eine Amplifikation mit identischen Primern an beiden Enden der cDNA supprimiert (Abb.5). Somit sind am Ende der subtraktiven Hybridisierung cDNA's, die gemeinsam im Tester und Treiber vorkommen effektiv eliminiert worden. Gleichzeitig wird das Vorkommen seltener und häufig vorkommender differentiellen Transkripte mengenmässig angeglichen:

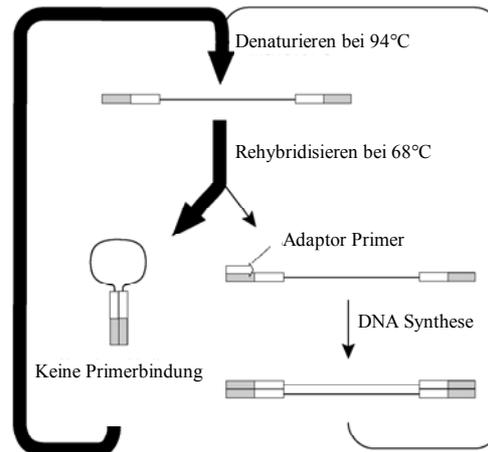


Abb. 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Suppressions-PCR (Aus der Anleitung für Clontech PCR Select™ Subtraction Kit). Aus kinetischen Gründen rehybridieren häufig vorkommende differentielle Transkripte mit sich selbst. Dadurch entstehen zwei identische Adapter an den cDNA Enden. Als Folge tritt eine sogenannte Schlaufenbildung ein, die eine Primer Anlagerung und somit die Amplifizierung der cDNA Fragmente verhindert. Auf diese Weise kommt es zu einer Anreicherung von seltenen Transkripten, da ihre Anreicherung exponentiell erfolgt. Hingegen die Anreicherung des häufig vorkommenden Transkripten supprimiert wird.

II.3.4.1 Doppelsträngige cDNA Synthese der Positiv Kontrolle (Skelettmuskel)

Die Methode ist nach der Anleitung des PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, USA) durchgeführt worden. Für die Erststrang cDNA Synthese der Positiv Kontrolle (Skelettmuskel) wurde 2µg (2µl) PolyA⁺ mRNA eingesetzt. Zusätzlich wurde 1µl cDNA Synthese Primer (II.1.6) und 2µl H₂O hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 2 Min. bei 70°C inkubiert und darauf für 2 Min. auf Eis gehalten. Für die anschließende Inkubation bei 42°C für 1,5 Std. im PCR Zyklus (Biozym, Oldendorf) wurden folgende Reagenzien hinzugefügt: 2µl 5x Erststrang Puffer (250mM Tris HCl, pH 8,5; 40mM MgCl₂; 150mM KCl; 5mM Dithiothreitol), 1µl dNTPs (je 10mM), 1µl H₂O und 1µl AMV Reverse Transkriptase (20U/µl). Darauf wurde die Probe auf Eis gehalten und die Zweitstrang Synthese sofort eingeleitet.

Die Zweitstrang Synthese wurde durch die Zugabe von: 48,4µl H₂O, 16µl 5x Zweitstrang Puffer (500mM KCl, 50mM Ammoniumsulfat, 25mM MgCl₂, 0,75mM β-NAD, 100mM Tris HCL pH 7,5; 0,25mg/ml BSA), 1,6µl dNTPs (je 10mM) und 4µl 20x Zweitstrang Enzym Cocktail (6U/µl DNA-Polymerase I, 0,25U/µl RNaseH, 1,2U/µl *E.coli* DNA-Ligase) mit anschließender Inkubation bei 16°C für 2 Std. im PCR Zyklus (Biozym, Oldendorf) eingeleitet. Darauf wurde 2µl T4 DNA Polymerase (3U/µl) hinzugegeben und für weitere 30 Min. bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 4µl 20x EDTA/Glykogen abgestoppt und die cDNA zweimal mit 100µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit 100µl Chloroform extrahiert.

Nach der Zugabe von 40µl 4M NH₄OAc und 300µl absoluten Ethanol wurde die cDNA sofort präzipitiert. Die cDNA wurde durch Zentrifugation (20Min. bei 13.000 Upm) pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird für 10 Min. luftgetrocknet und in 50µl H₂O resuspendiert. Die Probe kann nun bei -20°C aufbewahrt werden.

II.3.4.2 RsaI Restriktionsverdau

Die doppelsträngige Skelettmuskel cDNA und die über den SMART-Kit hergestellte und amplifizierte Primärmelanom- und Lymphknotenmetastasen cDNA's, wurden einem RsaI Restriktionsverdau unterzogen. Anhand des RsaI Restriktionsverdaus werden glatte Enden in der cDNA erzeugt, die die Ansatzstellen für die spätere Adaptorligation sind. Dazu wurde zu den 43,5µl cDNA, 5µl 10x RsaI Restriktionspuffer (100mM Bis-tris-Propan-HCl pH 7,0; 100mM MgCl₂, 1mM DTT) und 1,5µl RsaI (10U/µl) hinzugegeben und für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Vor Abbruch der Reaktion mit 2,5µl 20x EDTA/Glykogen wurde 5µl Probe entnommen und auf einem 1%igen TAE Agarosegel aufgetragen. Die Proben wurden wie oben beschrieben extrahiert und gefällt und in 5,5µl H₂O resuspendiert.

II.3.4.3 Adaptorligation

Zur Gewinnung des Testers wurden die verdaute cDNA's mit Adaptoren ligiert. Jede Tester cDNA wurde in zwei Aliquots unterteilt. Zuerst wurden 1µl jeder Tester cDNA (Skelettmuskel-, SMART Primärmelanom-, SMART Lymphknotenmetastasen und SMART humane Plazenta cDNA) mit 5µl H₂O verdünnt. Dann wurde ein Aliquot mit Adaptor 1 (Tester 1-1 2-1, 3-1, siehe II.1.6) und das Andere mit Adaptor 2R (Tester 1-2, 2-2, 3-2 siehe II.1.6) ligiert. Davon wurden je 2µl für die beiden Ligationen eingesetzt. Die Skelettmuskel Kontrolltester cDNA wurde separat vorbereitet. Zuerst wurden 2µl einer HaeIII verdaute φX174 DNA (3ng/µl) mit 38µl sterilem H₂O verdünnt. Dann wurde 1µl Skelettmuskel cDNA mit 5µl verdünnte φX174 DNA (150ng/ml) gemischt. Diese cDNA beinhaltet nun 0,2% HaeIII verdaute φX174 DNA. Zusätzlich wurden zu allen Tester cDNA's 3µl H₂O, 2µl 5x Ligationpuffer (250mM Tris-HCl pH 7,8, 50mM MgCl₂, 10mM DTT, 0,25mg/ml BSA), 1µl T4 DNA Ligase (400U/µl) und 2µl Adaptor 1 (10µM) bzw. Adaptor 2R (10µM) zugemischt. Die unsubtrahierte Testerkontrolle entsteht durch Mischung von 2µl beider Ansätze. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 16°C über Nacht. Anschliessend wurde die Reaktion mit 1µl EDTA/Glykogen abgestoppt und zur Inaktivierung der Ligase wurde der Reaktionsansatz bei 72°C für 5 Min. erhitzt.

Aus dem unsubtrahierten Tester Kontrollansatz wurde 1µl entnommen und mit 1ml H₂O für die darauffolgende PCR Amplifizierung verdünnt. Die Proben können nun bei -20°C aufbewahrt werden.

II.3.4.4 Kontrolle der Adaptorligation mittels PCR

Der Effizienz der Ligation wurde mit Hilfe einer GAPDH PCR überprüft. Hierzu wurden die beiden Tester cDNA's (Adaptor 1 bzw. Adaptor 2R, siehe II.1.6) in 200µl H₂O verdünnt und nachfolgende Reaktionen angesetzt:

Reaktionsansätze	1	2	3	4
Tester 1-1 (ligiert mit Adaptor 1)	1µl	1µl	-	-
Tester 1-2 (ligiert mit Adaptor 2R)	-	-	1µl	1µl
G3PDH 3' Primer	1µl	1µl	1µl	1µl
G3PDH 5' Primer	-	1µl	-	1µl
PCR Primer 1	1µl	-	1µl	-
Gesamtvolumen	3µl	3µl	3µl	3µl

Als Tester wurden die über den SMART Kit hergestellten Primärmelanom-, Lymphknotenmetastasen- und humane Plazenta cDNA's und die separat generierte Skelettmuskel cDNA verwendet. Die Primerkonzentrationen betragen jeweils 10µM (siehe II.1.6). Zu den 3µl Gesamtvolumen wurden jeweils 18,5µl H₂O, 2,5µl 10x PCR Reaktionspuffer, 0,5µl dNTPs (je 10mM) und 0,5µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech) hinzugefügt und für 5 Min. bei 72°C im PCR Zykler (Biozym, Oldendorf) inkubiert. Die PCR Reaktion wurde für 25 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	30 Sek. bei 94°C
Annealing	30 Sek. bei 65°C
Elongation	2,5 Min. bei 68°C

Dabei wird einerseits als Kontrolle GAPDH mit den zwei spezifischen Primer (G3PDH 3' und G3PDH 5', siehe II.1.6) und andererseits GAPDH gemeinsam mit einem Adaptor spezifisch Primer (Adaptor 1 bzw. Adaptor 2R, siehe II.1.6) amplifiziert (siehe Abb.6). Eine gute Ligationseffizienz ist gegeben, wenn beide PCR Produkte ähnliche Bandenintensitäten zeigen. PCR Produkte, die mit den internen spezifischen GAPDH Primer amplifiziert werden, weisen auf einem 2%igen TAE Agarosegel eine 500bp Bande auf.

PCR Produkte, die aus der Amplifizierung mit einem GAPDH spezifischen und einem Adaptor spezifischen Primer entstehen, zeigen sich als 750bp Bande. Falls kein PCR Produkt mit den Adaptoren Primern zu detektieren ist, sind keine Adaptoren an die unterschiedlichen cDNA's ligiert worden und die Ligation wurde wiederholt. Das Gelingen der Adaptorligation ist für die abschliessende Suppressions-PCR essentiell, da die hierfür verwendeten Primer an die Adaptoren ansetzen.

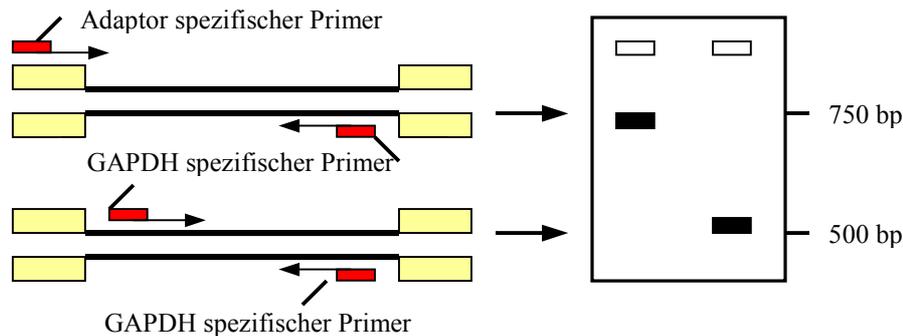


Abb. 6: Prinzip des Ligationseffizienztest. Die cDNA wird einerseits mit einem GAPDH spezifischen und einem Adaptor spezifischen Primer amplifiziert (Bande oben in schwarz angedeutet bei 750 bp). Ausserdem entsteht ein kleineres Produkt (Bande unten bei 500 bp) wenn die cDNA mit beiden GAPDH internen spezifischen Primer amplifiziert wurde.

II.3.4.5 Tester-Treiber-Hybridisierung

Ist die Adaptorligation erfolgreich gewesen, erfolgt die erste Tester-Treiber-cDNA Hybridisierung. Zu den zwei Tester cDNA's (mit Adaptor 1 bzw. Adaptor 2R, siehe II.1.6) wird die Treiber cDNA im Überschuss gegeben. 1,5µl Treiber, 1,5µl Tester und 1µl 4x Hybridisierungspuffer wurden für 1,5 Min bei 98°C denaturiert und darauf für 8 Std. bei 68°C im PCR Zykler (Biozym, Oldendorf) inkubiert, um die Möglichkeit des Annealings zu geben. Anschliessend erfolgte sofort die zweite Hybridisierung. 1µl eines Gemisches aus 1µl Treiber, 1µl 4x Hybridisierungspuffer und 2µl H₂O wurde mit einem Tropfen Öl (flüssiges Paraffin) beschichtet und für 1,5 Min. bei 98°C im PCR Zykler (Biozym, Oldendorf) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die frisch denaturierte Treiber cDNA zusammen mit den beiden Ansätzen der ersten Hybridisierung vermischt.

Als erstes wurde die Hybridisierungsprobe 2, dann etwas Luft und zuletzt die denaturierte Treiber cDNA in die Pipette aufgesogen. Somit sind die Proben voneinander getrennt und können nicht miteinander hybridisieren. Anschliessend wurden die getrennten Proben in die Hybridisierungsprobe 1 vermischt und für 18 Std. bei 68°C im PCR Zykler (Biozym, Oldendorf) inkubiert.

Wichtig ist, dass diese beiden Ansätze der ersten Hybridisierung nur in Anwesenheit eines Überschusses an frisch denaturiertem Treiber vermischt werden, da sonst nicht differentielle cDNA nicht vom Treiber abgedeckt werden kann.

Nach der Inkubation wird der Reaktionsansatz mit 200µl Dilutionspuffer (20mM HEPES HCl pH 8,3, 50mM NaCl, 0,2mM EDTA pH 8,0) versetzt und gemischt und für 7 Min. bei 68°C im PCR Zyklus (Biozym, Oldendorf) inkubiert. Dieses Hybridisierungsprodukt diente als Ausgangsmaterial für die Amplifizierung der differentiellen Transkripte. Die Proben können anschliessend bei -20°C aufbewahrt werden.

II.3.4.6 Anreicherung der differentiellen cDNA's

Die erste PCR-Amplifikation verlief in einem 25µl Ansatz: 1µl verdünntes Hybridisierungsprodukt, 19,5µl steriles H₂O, 2,5µl 10x PCR Puffer, 0,5µl dNTPs (je 10mM), 1µl PCR Primer 1 (siehe II.1.6) und 0,5µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech) wurden gemischt. Zudem werden zur Kontrolle die entsprechenden verdünnten unsubtrahierten Proben gleichermassen amplifiziert. Die Proben wurden anschliessend mit 50µl Öl (flüssiges Paraffin) beschichtet. Die PCR Reaktionen wurde für 27 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	30 Sek. bei 94°C
Annealing	30 Sek. bei 66°C
Elongation	1,5 Min. bei 72°C

In der zweiten nested PCR wurden 3µl jedes ersten PCR Produktes mit 27µl H₂O verdünnt. Daraus wurden 1µl Aliquots in ein 0,5ml Eppendorf Tube für die Reaktion überführt. 18,5 µl H₂O, 2,5µl 10x PCR Puffer, 0,5µl dNTPs (je 10mM), 0,5µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech), 1,0µl nested Primer1 und 1,0µl nested Primer 2 (siehe II.1.6) wurden hinzugegeben. Diese nested Primer binden weiter innen an die Adaptoren an und erhöhen somit die PCR Spezifität. Die Proben wurden anschliessend mit einem Tropfen Öl (flüssiges Paraffin) beschichtet und die nested PCR Reaktionen wurden für 10-12 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	30 Sek. bei 94°C
Annealing	30 Sek. bei 68°C
Elongation	1,5 Min. bei 72°C

Von den PCR Produkten wurden je 8µl auf einem 2%igen TAE Agarosegel aufgetragen, um die Reaktion zu überprüfen.

II.3.4.7 Analyse der Subtraktionseffizienz über semiquantitative PCR

Eine Überprüfung der Effizienz der Subtraktion erfolgt, indem die Häufigkeit spezifischer cDNA's vor und nach der Subtraktion ermittelt wird. Hierzu wurden spezifische semiquantitative PCR's für GAPDH und Tyrosinase mit subtrahierter und unsubtrahierter cDNA durchgeführt. Dabei sollte GAPDH als ubiquitär exprimiertes Transkript nach einer erfolgreichen Subtraktion vermindert vorliegen.

Für die PCR's wurden unsubtrahierte und subtrahierte nested PCR Produkte 1:10 in H₂O verdünnt. Zu 1µl verdünntes PCR Produkt wurde 1,2µl G3PDH 5' - und G3PDH 3' Primer (je 10 µM, siehe II.1.6), 0,3µl dNTPs (je 20mM), 22,4µl H₂O, 3,0µl 10x PCR Puffer und 0,6µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech) gegeben. Die PCR Reaktionen wurde für 18,- 23-, 28- und 33 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	30 Sek. bei 94°C
Annealing	30 Sek. bei 60°C
Elongation	2 Min. bei 68°C

Nach der PCR wurden je 5µl Probe entnommen und auf einem 2%igen TAE Agarosegel aufgetragen.

Bei der Tyrosinase PCR handelt es sich um eine nested PCR. Beide PCR's wurden in 50µl Ansätzen durchgeführt. In die PCR wurde 1µl dNTPs (20mM), 5µl 10x Taq PCR Puffer, je 1µl Tyrosinase Primer 1 und 2 (siehe II.1.6), 0,5µl Taq Polymerase (Amersham-Pharmacia) und 5µl cDNA gemischt. Aus der ersten PCR wurde nach 35 Zyklen 1µl PCR Produkt für die nested PCR verwendet. Die eingesetzten Primer für die nested PCR sind Tyrosinase 3 und Tyrosinase 4 (siehe II.1.6), sonst wurden dieselben Reagenzien wie für die erste PCR eingesetzt. Von der ersten PCR wurden 5µl und von der zweiten PCR wurden 5µl nach 20, 25, 30 und 35 Zyklen für ein 2%iges TAE Agarosegel entnommen.

Die PCR Reaktion erfolgte nach folgendem Muster:

Denaturierung	1 Min. bei 94°C
Annealing	1,05 Min bei 56°C
Elongation	1,05 Min. bei 72°C

II.3.5 Klonierung der subtrahierten differentiellen PCR Produkte

Damit die unterschiedlichen Transkripte einem Screening-Verfahren unterzogen werden können, wurden die nested PCR Produkte in einen selbst hergestellten T/A Vektor (pBluescript SK II; siehe II.1.4.2) und in den Vektor pCR 2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen, Leek, Niederlande; siehe II.1.4.1) kloniert. An die PCR Produkte müssen zuerst Adenin Überhänge an die 3' Enden angehängt werden. Dazu wurden 18µl PCR Produkt mit 67µl H₂O, 10µl 10x PCR Puffer, 1µl Taq Polymerase Mix (Amersham-Pharmacia) und 2µl dATP (100mM, Amersham-Pharmacia) gemischt und für 2 Std. bei 72°C im PCR Zyklus (Biozym, Oldendorf) inkubiert. Anschliessend wurden die PCR Proben über eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und präzipitiert und in 10µl H₂O resuspendiert. Der so hergestellte Adenin Überhang pro 3' Ende kann effizient an Thymidinüberhänge eines hergestellten linearisierten Vektors binden.

II.3.5.1 Herstellung eines T/A Vektors (Hadjeb und Berkowitz, 1996)

Zuerst wurden 10µg Vektor pBluescript[®] SKII (Stratagene, Heidelberg) für 2 Std. bei 37°C mit dem Restriktionsenzym Eco RV (10U/µl, MBI, Fermentas, St. Leon-Rot) in Puffer R (MBI, Fermentas, St. Leon-Rot) linearisiert. Der komplette Verdauansatz wurde auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen.

Linearisierte Vektoren mit Überhängen (2,9kb) können von den zirkularisierten Vektoren (laufen im Gel langsamer) und dem restlichen unverdauten Vektor (supercoiled läuft sehr schnell im Gel bei ca. 2kb) ausgeschnitten werden. Der linearisierte Vektor pBluescript wurde anhand des QIA quick Gel Extraction Kit (siehe II.1.5) isoliert. In einem 100µl Ansatz zusammen mit 2mM dTTP und 1µl Taq Polymerase (5 U/µl, Amersham-Pharmacia), in 10x Taq PCR Puffer erfolgte die Inkubation für 2 Std. bei 72°C.

Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion und einer Ethanol-fällung mit 3M NaAcetat wurde die aufgefüllte Vektor DNA in 44 µl H₂O resuspendiert und einer Eigenligation unterworfen. Damit werden Vektoren ohne Überhänge ausselektiert, da Vektoren mit Überhängen nicht mit sich selbst ligieren können. Dazu wurde die Vektor DNA mit 1µl T4 DNA Ligase (4U/µl, Invitrogen) und 5µl Ligationspuffer (6mM Tris HCl pH 7,5, 6mM MgCl₂, 5mM NaCl, 100µg/ml BSA, 7mM β-Mercaptoethanol, 100µM ATP, 2mM DTT und 1mM Spermidin) über Nacht bei 14°C inkubiert. Anschliessend wurde die Probe auf ein 1%iges TBE Agarosegel aufgetragen. Der Vektor wird bei -20°C aufbewahrt.

II.3.5.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA Fragmente wurden mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen isoliert. Die einzelnen Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht (366nm) wurde die gewünschte DNA Bande herausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen und in Eppendorf Reaktionsgefäß mit 3-facher Menge QG Puffer (300µl Puffer/100mg Gel) überführt. Die Proben wurden dann für 10 Min. bei 50°C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Suspension alle 2 Min. gemischt. Daraufhin wurde 1 Vol. Isopropanol zugegeben. Die Proben wurden in die vorbereiteten Säulen gegeben und für 1Min. bei 13.000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und auf die Säule wurden 500µl QG Puffer pipettiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die gebundene DNA in der Säule wurde mit 750µl PE Puffer gewaschen und der Puffer herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule wurde noch mal trocken zentrifugiert. Die Säule wurde darauf in ein neues Eppendorf Tube gesetzt, und mit 30µl H₂O_{bid.} oder TE Puffer (pH 8,0) wurde die DNA eluiert. Die DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

II.3.5.3 Ligation

Die Ligation der nested PCR Produkte aus der subtraktiven Hybridisierung mit Plasmid Vektoren wurde in einem möglichst geringen Reaktionsvolumen (10µl) durchgeführt. Die verwendete Menge an Vektor-DNA zu nested PCR Produkt wird im Verhältnis 1:4 eingesetzt. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden gemischt: 20-50ng Vektor, 80-200ng PCR Produkt, 1µl 10x Ligase Puffer (6mM Tris HCl pH 7,5, 6mM MgCl₂, 5mM NaCl, 100µg/ml BSA, 7mM β-Mercaptoethanol, 100µM ATP, 2mM DTT und 1mM Spermidin) und 1µl T4 DNA Ligase (4U/µl, Invitrogen). Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

II.3.5.4 Transformation von kompetenten Bakterien

Bei -80°C gelagerte, kompetente Bakterien (200µl; INVαF' *E.coli* Zellen; Invitrogen, Niederlande) wurde auf Eis aufgetaut. 2µl des Ligationsansatzes wurde hinzugegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien 30 Sek. einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschliessend 2 Min. auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250µl SOC Medium (siehe II.1.2) wurden die Zellen 1 Std. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 50µl bzw. 200µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten (siehe II.1.2) ausplattiert. Zur Blauselektion wurden X-Gal Platten (25µl X-Gal; 2% in DMSO und 25µl IPTG; 100mM) benutzt, ansonsten LB Platten mit Ampicillin.

Kolonien mit Inserts sind weiss, da das Gen für die β -Galaktosidase bei der Einklonierung unterbrochen wird und dadurch das Umsetzen des Substrates IPTG zu einem blauen Farbstoff nicht mehr ermöglicht wird. Die Platten wurden invertiert über Nacht bei 37°C inkubiert und darauffolgend bei 4°C gelagert.

II.3.6 Kolonie-PCR

Die Kolonie PCR dient der Anreicherung der klonierten cDNA's über die an den Adaptoren ansetzenden Primer. Für die PCR wurden einzelne weisse Klone mit Hilfe eines Zahnstochers gepickt und in 100 μ l LB Medium + 50 μ g/ml Ampicillin überführt. Der Ansatz wird für mindestens 4 Std. bei 37°C unter Schütteln angezüchtet. Daraus wurde 1 μ l in einem 20 μ l PCR Ansatz (0,5 μ M Primer: Nested Primer 1 und Nested Primer 2 (siehe II.1.6), 1-2Units Taq Polymerase (Amersham Pharmacia), 2 μ l 10x PCR Puffer, 0,2mM dNTPs) überführt. Zunächst wurden die Proben bei 94°C für 30 Sek. inkubiert, um die Bakterien aufzuschliessen. Die PCR Reaktion wurde für 30 Zyklen nach folgendem Muster durchgeführt:

Denaturieren	30 Sek. bei 95°C
Annealing	30 Sek. bei 68°C
Elongation	3 Min. bei 72°C

Abschliessend wurden 8 μ l des PCR Produkts auf einem 2%igen TBE Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

II.3.6.1 Anfertigung von Bakterienstocks

Zunächst wurde 1ml LB Medium + 1 μ l Ampicillin mit der gewünschten Kolonie mit Hilfe eines Zahnstochers angeimpft. Über Nacht erfolgt unter Schütteln die Inkubation bei 37°C. Anschliessend wurden 750 μ l der Übernachtskultur zu 500 μ l 50% Glycerol gegeben. Darauf wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

II.3.7 Screening der klonierten Subtraktionsprodukte

II.3.7.1 Herstellung Digoxigenin (DIG) markierter Subtraktions- und cDNA Sonden

Die Subtraktionssonden wurden aus den nested PCR Produkten der subtraktiven Hybridisierungen (Melanomsonde aus der Hybridisierung mit Melanom cDNA als Tester bzw.

Lymphknotenmetastasesonde aus der Hybridisierung mit Lymphknotenmetastase cDNA als Tester) hergestellt.

Als erstes wurden die Adaptoren entfernt, da die zu screenenden Produkte ebenfalls Adaptoren an ihren Enden tragen und hybridisieren können. Je 100µl PCR Produkt (gepoolt aus 4 PCR Reaktionen) wurden zunächst über einen PCR Purification Kit gereinigt (siehe II.3.3.3). Der Ansatz wurde in 15µl H₂O resuspendiert und anschliessend in einen 20µl Ansatz für 2,5 Std. bei 37°C mit RsaI (10U/µl, MBI Fermentas) verdaut. Darauf wurde der Ansatz nochmals mit dem Restriktionsenzym SmaI (10U/µl, MBI Fermentas) für 2,5 Std. bei 30°C verdaut. Die somit abgetrennten Adaptoren wurden mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit (siehe II.1.5) entfernt. Die cDNA wurde nun einer DIG Markierung unterworfen. Hierzu werden 15µl gereinigtes Produkt in 10mM Tris HCl pH 8,5 für 10 Min. bei 97°C denaturiert und zusammen mit von 0,3µg Hexamerprimer, je 100µM dATP, dCTP, dGTP, sowie 65µM dTTP, 35µM DIGdUTP (Roche, Mannheim), 5 Units Klenow Enzym (MBI Fermentas) und 5µl 10x Klenow Enzym Puffer (50mM Tris HCl pH 8,0, 5mM MgCl₂ und 1mM DTT) bei 37°C für 1,5 bis 20 Std. inkubiert.

Die Melanom cDNA- bzw. Lymphknotenmetastasen cDNA Sonden wurden aus den LD PCR Produkten des SMARTTM Kits (Clontech; siehe II.3.3) hergestellt. Die 100µl SMART PCR Proben (gepoolt aus 4 PCR Reaktionen) wurden darauf über den PCR Purification Kit (Qiagen) von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt (siehe II.3.3.3). Die cDNA's wurden nun einer DIG Markierung wie bereits oben beschrieben unterworfen.

Sowohl die DIG markierten Subtraktionssonden als auch die cDNA Sonden wurden abschliessend über eine P60 Elution gereinigt. Zur Herstellung einer Säule wurde ein 1ml Safeseal Tip (Biozym, Oldendorf) genommen. Die untere Spitze der 1ml Safeseal Tip wurde mit einer Schere abgeschnitten und die Säule wurde mit einem kleinen Stück Gazenetz (Hartmann, Heidenheim) bestückt. Mit SephadexTM G 50 (Amersham-Pharmacia, Freiburg) wurde die Säule gefüllt und 3x mit 1ml P60 Elutions Puffer gewaschen. Die Säule wurde dann in ein 1,5ml Eppendorfgefäss überführt. 20µl DIG markierte Sonde wurde mit 20µl P60 Puffer gemischt und auf die Säule gegeben. Anschliessend wurden 100µl P60 Puffer in die Säule pipettiert. Der Überstand wird als Fraktion 1 aufbewahrt. Für die folgenden 10 Fraktionen in weiteren 1,5 ml Eppendorfgefässe wurden stets 133µl P60 Puffer in die Säule gegeben. Die unterschiedlichen Fraktionen können bei -20°C aufbewahrt werden. Die Proben werden vor Gebrauch auf ihre DIG Markierung überprüft. Die Fraktionen, die ein sehr starkes Signal bei der Detektion aufzeigen, wurden abschliessend gepoolt und bei -20°C gelagert. In der Regel sind es die Fraktionen 3-5, die gesammelt werden können.

Vor der Hybridisierung wurden alle Sonden auf ihre DIG Markierung überprüft. Dazu wird von den gewonnenen 10 Fraktionen jeder Sonde 3µl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) getropft und fixiert (120mJ, UV Stratalinker, Stratagene; Zhang *et al.*, 1996).

II.3.7.2 Nicht radioaktive Detektion

Verwendet wird ein Detektionsverfahren, dass immunologisch über Chemilumineszenz erfolgt. Die positive geladene Nylonmembran wurde mit den Proben kurz in 1x Maleinsäure gewaschen und 2x 15 Min. mit 2x Blockierungspuffer in 1x Maleinsäure (Roche, Mannheim) blockiert. Anschliessend erfolgte eine 45 minütige Blockierung in 2x Blockierungspuffer in 1x Maleinsäure mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti DIG Antikörper (10µl Anti DIG Antikörper in 100ml 2x Blockierungspuffer verdünnt).

Danach wurde die Membran 2mal für 15 Min. mit 1x Maleinsäure gewaschen und für 2 Min. in Äquilibriumspuffer (100mM Tris HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ pH 9,5) inkubiert. Zuletzt wurde die Membran in 7ml Äquilibriumspuffer mit 70µl CDP StarTM für 10 Min. inkubiert. Das Substrat CPD StarTM (Roche, Mannheim) wird durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert und das metastabile Dioxetanion entsteht. Während seines Zerfalls emittiert dieses Anion Licht (bei ca. 466nm) und schwärzt einen aufgelegten Film (Kodak X-OMAT chemiluminescent film).

II.3.7.3 Screening von cDNA Arrays

Die unterschiedlichen klonierten cDNA's aus der subtraktiven Hybridisierung wurden einem doppelten Screening Verfahren (Subtraktionssonde und cDNA Sonde) unterzogen. Somit kann festgestellt werden, welche der klonierten Transkripte differentiell exprimiert werden. Die Hybridisierung mit der Subtraktionssonde diente als Vorscreening. Hier werden falsch positive Klone aussortiert. Auch der Hintergrund wird mit dem Vorscreening minimiert.

Bei der Hybridisierung mit der entsprechenden cDNA Sonde wurden nur noch die bestätigten differentiellen Klone aus dem Vorscreening hybridisiert. Die amplifizierten Inserts wurden als erstes auf einem 1%igen TBE Agarosegel auf ihre Grösse überprüft und je 50 davon auf doppelte Filter (je 8x8cm grosse positiv geladene Nylonmembran, Roche, Mannheim) übertragen (cDNA Arrays). Hierzu wurden jeweils 3µl PCR Produkt mit 2µl 0,3N NaOH/15% Ficoll vermischt und denaturiert. Aus diesem Gemisch wurden je 1,5µl auf die beiden Filter getropft (Dot Blot).

Nach dem Fixieren über Crosslinking bei 120 mJ (UV, Stratalinker, Stratagene; Zhang *et al.*, 1996) erfolgte die Array Hybridisierung mit einer DIG markierten Sonde. Bei der Array Hybridisierung wurden als erstes die doppelten Membranen in 6x SSC mit 50µg/ml denaturierter Lachssperm DNA (Sigma), 5x Denhardt Lösung (0,2% Ficoll 400, 0,2% Polyvinylpyrrolidone, 0,2% BSA) für 2-3 Std. bei 65°C prähybridisiert. Die Subtraktions- bzw. cDNA Sonden wurden für 7 Min. bei 100°C denaturiert und in Hybridisierungslösung (wie die Prähybridisierungs-Lösung mit Ausnahme von Lachssperm DNA) mit den Filtern über Nacht bei 65°C hybridisiert. Für die Minimierung des Hintergrunds und um restliche Adaptoresequenzen abzufangen, wird bei den Hybridisierungen mit den Subtraktionssonden 10µl Nested Primer 1 und Nested Primer 2 (10µM, siehe II.1.6) zugegeben. Anschliessend wurden die Filter in 2x SSC/0,5% SDS und 1x SSC/0,5% SDS je zweimal für 10 Min. gewaschen und dem DIG Detektionsverfahren unterzogen (siehe II.3.7.2).

II.3.8 Isolierung von Plasmid DNA

II.3.8.1 Plasmid Miniprep

Zur näheren molekularen Charakterisierung rekombinanter Kolonien wurde aus diesen Kolonien in einem kleinem Massstab Plasmid DNA isoliert und einem Testverdau unterzogen. In 1,5ml Medium (LB + 50µg Ampicillin) wurde ein Klon mit Hilfe eines Zahnstochers überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Diese Übernachtskultur wird für 3 Min. bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und das Bakteriensediment in 150µl Lösung I (siehe II.1.1) suspendiert und gemischt. Danach wurde 300 µl Lösung II dazupipettiert (siehe II.1.1) und 5 Min. auf Eis inkubiert. Zuletzt wurde 225µl Lösung III (siehe II.1.1) dazugegeben, gemischt und die Proben für 15 Min. auf Eis stehen gelassen, um die Proteine zu denaturieren. Nach einem Zentrifugationsschritt für 3 Min. bei 13.000Upm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäss überführt. Nach Zugabe von 400µl Isopropanol wurde nach einer weiteren Zentrifugation der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 40µl TE Puffer resuspendiert.

II.3.8.2 Plasmid Midiprep

Zur Gewinnung grösserer Mengen Plasmid DNA wurde eine Plasmid Isolierung im grösseren Massstab nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Als erstes wurden 5ml LB Medium + Ampicillin mit der gewünschten Kolonie angeimpft und für ca. 6 Std. bei 37°C inkubiert. Darauf wurde die 5ml Kultur in ein mit 200ml LB Medium + 20µl Ampicillin vorbereitetes Erlenmeyergefäss überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Anschliessend wird die Übernachtskultur bei 6.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 4,5ml Lösung I (siehe II.1.1) resuspendiert. Nach Zugabe von 10ml Lösung II (siehe II.1.1) wurde die Suspension für 5 Min. auf Eis gehalten. Bei diesem Vorgang werden die Bakterien lysiert. Dann wurden 7,5ml Lösung III hinzupipettiert und nochmals 15 Min. auf Eis gestellt. Dieser Schritt dient der Denaturierung der Proteine. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt für 6000rpm (4°C) wurde der Überstand durch ein GazeNetz (Hartmann, Heidenheim) filtriert, um nicht pelletierte Proteine und Zellbestandteile zu entfernen. Danach erfolgte die DNA Fällung durch die Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 5 Min. stehen gelassen. Nach erneuter Zentrifugation (5 Min, 6000rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 10 Min. bei Raumtemperatur getrocknet. Anschliessend wurde das Pellet in 2ml TE Puffer und 2ml 4M LiCl resuspendiert und für 5 Min. auf Eis gestellt. Hierbei wird genomische DNA und hochmolekulare RNA von der Plasmid DNA abgetrennt. Nach der Zentrifugation erfolgte die Zugabe von 10ml absolutem Alkohol. Die Fällung erfolgte für 15 Min. bei – 20°C. Das Pellet wurde mit 5ml 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen und die DNA luftgetrocknet. Darauf wurde das Pellet mit 500µl TE Puffer gelöst und in ein Eppendorf Tube überführt. 5µl RNase (10mg/ml, Merck, Darmstadt) wurde hinzugegeben und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Anschliessend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine DNA Präzipitation. Das Pellet wurde in 100µl TE Puffer gelöst und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die DNA Konzentration wird nach der OD Messung bei 260nm mit Hilfe folgender Formel errechnet: DNA Konzentration (µg/ml) = $OD_{260/280} \times 50 \times \text{Verdünnung}$

II.3.9 Sequenzierung von DNA nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Alle durch das Screeningverfahren differentiell bestätigte Klone wurden anhand des BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) zur Ermittlung der Basenfolge der vorliegenden Nukleinsäuren sequenziert. Neu amplifizierte Inserts (siehe II.3.6) wurden über ein 2%igen TBE Agarosegel aufgetrennt und über QIAquick Gel Extraction Kit (siehe II.3.5.2) ausgeschnitten und gereinigt. Nach einer DNA Mengenschätzung über ein weiteres Agarosegel werden ca. 30-90ng DNA für die Sequenzierung eingesetzt. Zusätzlich wurden ca. 100-200ng DNA aus Plasmid Miniprep's der einzelnen Klone (siehe II.3.3.1) nach Überprüfung der Inserts (Restriktionsverdau) für die Sequenzierung eingesetzt.

In einem 20µl Ansatz (Strangbruchverfahren nach Sanger) wurden zusätzlich 3µl Sequenzreaktion (ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix) 3,2µl Nested Primer 1 oder nested Primer 2 hinzugegeben. Der ABI Sequencing Mix beinhaltet das Enzym AmpliTaq® und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide. Insgesamt wurden 25 Zyklen vollzogen und das PCR Programm läuft nach folgendem Prinzip: 30 Sek. bei 96°C, 15 Sek. bei 50°C und 4 Min. bei 60°C, wobei die Aufheiz- und Abkühlphasen auf 0,9°C pro Sek. eingestellt sind. Anschliessend wurden die Proben über Centri Sep Säulen (Applied Biosystem, NJ, USA) aufgereinigt.

Mit der Aufreinigungsmethode mittels Centri Sep Säulen können schnell und effizient Proteine, von Nukleotiden, Puffer und Salzen gereinigt werden. Als erstes wurden 800µl H₂O in die Säulen gegeben und für 1 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Darauf wurden alle Luftblasen weggeklopft und die Säulen in Eppendorf Reaktionsgefässe gelegt und für 2 Min. bei 3000Upm zentrifugiert. Die 20µl Sequenzierungsprobe wurde nun in die Mitte der Säule pipettiert, die DNA wird somit an die Säule gebunden und durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (2 Min. bei 3000Upm) eluiert. Die DNA wurde mit Hilfe einer Speed Vac getrocknet und später für die Sequenzierung in 20µl H₂O resuspendiert. Die Sequenzierung in einem ABI 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Fortser City, CA, USA) wurde freundlicherweise von der Abteilung medizinische Virologie (Prof. Iftner) und der Tropenmedizin (PD Dr. Kreamsner) durchgeführt.

II.2.9.1 BLAST Search

Die verschiedenen Sequenzen wurden anhand eines BLAST Programms (Altschul *et al.*, 1997) auf Homologien mit bereits bekannten Genen in der DDJB (DNA DataBank of Japan), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) und PDB (Brookhaven Protein Databank) Genbanken verifiziert. Sequenzen ohne grössere Homolgien (<50 Nukleotide) wurden mit bekannten sequenzmarkierten Stellen in der EST Datenbank (EST = expressed sequences tags) verglichen.

II.3.10 Charakterisierung der isolierten Gene mittels Northern Blot

II.3.10.1 Herstellung spezifischer DIG markierter Gensonden

Zur Gewinnung spezifischer Gensonden wurde zuerst eine Kolonie PCR (siehe II.3.6) mit dem entsprechendem Plasmid und eine anschliessende Gelelution (siehe II.3.5.2) durchgeführt.

Etwa 5-20µl des Eluats (10-200ng) wurden zusammen mit 1µg Hexamerprimer und 5µl 10x Puffer (MBI Fermentas; 50mM Tris HCL pH 8,0, 5mM MgCl₂, 1mM DTT) bei 100°C für 7 Min. denaturiert. Danach erfolgt die Zugabe von 5µl DIG Nukleotid Mix (100µM dATP, 100µM dCTP, 100µM dGTP, 65µM dTTP und 35µM DIG-dUTP) und 3U Klenow Enzym (MBI Fermentas) mit anschließender Inkubation für 1 Std. bei 37°C. Die Reaktion wurde mit 1µl 0,5M EDTA abgestoppt und die Sonde über den QIAquick PCR Purification Kit (siehe II.3.3.3) gereinigt. Die DIG Markierung wurde wie in II.3.7.1 beschrieben verifiziert.

II.3.10.2 Herstellung einer 28S Oligonukleotid-Sonde

5pmol (ca. 65ng) des 28S Oligos (40mer, Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA) wurden mit 4µl Tailing Puffer, 4µl CoCl₂ (25mM), 1µl CoCl₂ (25mM), 1 DIG dUTP (1mM), 1µl (50 Units) terminale Transferase (DIG Oligonukleotid 3' End labeling Kit; Roche Mannheim) und 8 µl DEPC-H₂O für 15 Min. bei 37°C inkubiert.

Aus einem Gemisch aus 1µl Glykogen Lösung und 200µl EDTA (0,2mol/l) wurden 2µl entnommen und zur Reaktion gegeben. Darauf erfolgte eine Fällung mit 2,5µl LiCl und 75µl gekühltem 100% Ethanol. Das Pellet wurde mit kaltem 50% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10µl DEPC-H₂O resuspendiert.

II.3.10.3 Northern Blot, RNA-Gel

Für ein RNA Gel werden 10µg Gesamt RNA oder 1µg polyA⁺ mRNA in 20µl Probenpuffer gelöst (20mM MOPS, 5mM NaAc, 1mM EDTA pH 8,0, 6% Formaldehyd, 50% Formamid) und mit 2µl Gelladepuffer (50% Glycerin, 1mM EDTA pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt. Daraufhin wurden die Proben für 15 Min. bei 65°C denaturiert und auf ein denaturierendes 1%iges Agarosegel aufgetragen (20mM MOPS, 5mM NaAc, 1mM EDTA pH 8,0, 6% Formaldehyd; 1% Agarose). Alle Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt, und die Gelkammer wurde vor Gebrauch mit 0,1% SDS Lösung in DEPC-H₂O behandelt. Als Laufpuffer diente MOPS Puffer (20mM MOPS, 5mM NaAc, 1mM EDTA pH 8,0). Nach einem 5-minütigen Vorlaufen der RNA bei 100 Volt und 400 mA wurde das Gel vollständig mit dem Laufpuffer bedeckt. Die RNA wurde dann über Nacht auf einem Gel für ca. 15 Std. bei 25 Volt und 400mA aufgetrennt.

Das Gel wird daraufhin in 1µg/ml Ethidiumbromid- Laufpuffer Gemisch gegeben, um die RNA zu färben. Danach wird die RNA im UV Durchlicht bei 312nm durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar und photographiert.

Anschliessend wird das Gel für 10 Min. mit 20x SSC gewaschen und die RNA über Nacht in 20x SSC auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) geblottet nach den von Sambrook *et al.*, 1989 beschriebenen Standardbedingungen. Der Transfer der RNA wird durch die Kapillarkräfte gewährleistet. Nach einem Blotting wird die Membran unter UV Licht (254nm) gehalten, um zu verifizieren ob der Transfer der RNA erfolgreich gewesen ist. Dann wird die RNA auf der Membran fixiert (120mJ, UV Stratalinker, Stratagene; Zhang *et al.*, 1996).

II.3.10.4 Northern Hybridisierung

Vor der Hybridisierung mit der DIG markierten Sonde wird der Northern Blot mit 25ml DIG Easy HYB (Roche, Mannheim) und 50µg/ml denaturierter Lachssperm DNA für 2Std. bei 48°C prähybridisiert. Die spezifisch hergestellten Sonden (siehe II.3.10.1) wurden für 7 Min. bei 100°C denaturiert. Anschliessend wurde die Sonde mit 10ml DIG Easy HYB (Roche, Mannheim) gemischt und auf der Membranen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht bei 48°C. Überschüssige Sonde wurde durch Waschung mit 2x SSC/0,1% SDS 2mal 1 Min. und 2mal 15 Min. mit 2x SSC/0,1%SDS bei Raumtemperatur entfernt. Der DIG Detektionsnachweis erfolgte wie unter II.3.7.2 beschrieben.

II.4 Histologische Methoden

II.4.1 Immunhistologie

Grundlage der Antikörperfärbungen ist der spezifische Nachweis eines Proteins in den unterschiedlichen Gewebeschnitten. Alle Färbungen wurden mit dem *Vectastain* ABC Kit (Vektor, Burlingame CA, USA) durchgeführt. Dabei erfolgte der Nachweis indirekt über einen sekundären Antikörper, der biotiniliert ist und an den primären Antikörper bindet. Die Signaldetektion wird durch die *Vectastain* ABC-Methode (avidin biotinylated enzyme complex) verstärkt. Es wurde ein Gemisch aus Avidin und biotinylierter Peroxidase Moleküle zugegeben. Avidin besitzt eine starke Affinität zu Biotin, so dass mehrere biotinilierte Peroxidase Moleküle gebunden werden und so das Signal durch erhöhte Enzymaktivität verstärken.

Als erstes wurden 5µm dicke Paraffinschnitte oder Gefrierschnitte von unterschiedlichen Geweben angefertigt: gesunde Haut, Nävi, Melanom und Hautmetastasen. Pro Gewebeprobe wurden je 3 Schnitte angefertigt, um einen repräsentativen Querschnitt zu erhalten. Als Positiv-Kontrolle diente Mamma Karzinom (MammaCa). Die Schnitte wurden für 1 Std. bei 60°C gelagert, um eine bessere Haftung der Schnitte an die Objektträger zu erreichen.

Die Schnitte wurden maschinell (Varistan 24-4, SHANDON, Dreieich) für ca. 45 Min. entparaffiniert und in 1x PBS aufbewahrt. Nach 5minütigen Kochen im Dampfkochtopf mit Citratpuffer wurden die einzelne Schnitte 3x für 10 Min. in 1x PBS gewaschen. Die Lokalisation der Gewebeproben auf den Objektträger wurde mit einem Fettstift markiert. Anschliessend erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit 3 Tropfen blocking serum (Pferdeserum) in 10ml 1x PBS.

Der Erstantikörper (Anti-67kDa Laminin receptor IgM; Maus, monoklonal, Ab-1; Dianova, Hamburg) wurde nun in unterschiedlichen Verdünnungen (1:10, 1:25, 1:50 und 1:100 in 1x PBS) getestet bei einer Inkubationsdauer von einer Stunde bei Raumtemperatur. Anschliessend wurden die Schnitte 3x mit 1x PBS für 5 Min. gewaschen. Der Zweitantikörper (biotinierter anti Maus IgM Antikörper, Vector USA) wurde auf die Gewebsschnitte gegeben. Dazu werden 10 ml 1x PBS mit einem Tropfen Zweitantikörper (biotinierter anti Maus IgM Antikörper, Vector USA) und 3 Tropfen Pferdeserum vermischt.

Aus diesem Gemisch wurde dann 100µl auf die Schnitte gegeben und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden 3x in 1x PBS für 5 Min. gewaschen und das AB Reagenz wird folgendermassen angesetzt: 5ml 1x PBS, 1 Tropfen Reagenz A, 1 Tropfen Reagenz B. Davon wurden 100µl auf die einzelnen Schnitte gegeben und für 1 Std. inkubiert.

Für die Farbreaktion wurden 3 Tropfen vom chromogenen Substrat Neufuchsin (Dako, CA, USA) mit 2 Tropfen Activating Agent (Dako, CA, USA) gemischt, für 3 Min. stehen gelassen und mit Substratpuffer (Dako, CA, USA) auf 2ml aufgefüllt. Das chromogene Substrat Neufuchsin bildet eine Farbreaktion. Dazu wurden 2 Tropfen Levamisole (Dako, CA, USA) gegeben, um falsch positive Ergebnisse zu verhindern. Aus diesem Gemisch wurden 100µl auf jeden Gewebsschnitt pipettiert und für 1 Min-1 Std. je nach Farbentwicklung gefärbt. Abschliessend wurde die Farbreaktion mit $H_2O_{bid.}$ abgestoppt. Es erfolgte dann eine Gegenfärbung mit filtriertem HE (Dako, CA, USA) für 1-2 Min. Die Schnitte wurden 3x für 5 Min. $H_2O_{bid.}$ mit gespült und mit Leitungswasser für 5-10 min gebläut. Die Objektträger wurden in $H_2O_{bid.}$ gestellt und mit 60°C warme Kaisers Gelatine (Vektor, Burlingame, CA, USA) eingedeckelt.

II.4.2 *In situ* Hybridisierung an Paraffinschnitten

Anhand der *in situ* Hybridisierung werden in Hautgeweben die Lokalisation der Expression der neuen Genprodukte analysiert. Das Prinzip wird nach der beschriebenen Anleitung von Bochenek und Hirsch *et al.*, 1991 durchgeführt. Die einzelnen Objektträger wurden mit Poly-L-Lysine (Sigma, Heidelberg) für eine bessere Haftung der Gewebsschnitte beschichtet. 8µm dicke Gefrierschnitte werden von mehreren Proben (gesunder Haut, Nävi, Melanome und Hautmetastasen) vorbereitet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

II.4.2.1 Dephosphorylierung des Vektors pBluescript SKII mit CIP

Die Vektor DNA wurde nur mit einem Restriktionsenzym verdaut und anschliessend dephosphoryliert. Somit wird eine Religation des pBluescript SKII Vektors (siehe II.1.4.2) während der Ligation mit der Fremd DNA verhindert. Folgende Reagenzien werden gemischt: 44µl verdaute Vektor DNA, 5µl CIP 10x Puffer und 1µl CIP (1U/µl, alkalische Phosphatase). Die Reaktion wurde zweimal für 30 Min. bei 37°C inkubiert und durch 10 Min. Erhitzen bei 65°C gestoppt. Das Vol. wird mit TE Puffer auf 100µl aufgefüllt und eine Phenolextraktion mit anschliessender Gelelution (siehe II.3.5.2) wurde durchgeführt. Die pBluescript SKII Vektor DNA wurde in 10µl TE Puffer aufgenommen.

II.4.2.2 Umklonierung des Laminin Rezeptors 1

Als erstes wird die Laminin Rezeptor 1 cDNA linearisiert, dabei determiniert das Mapping die Orientierung der klonierten cDNA zwischen dem T3- und T7 Promotor. Dazu wurden die entsprechenden Restriktionsenzyme verwendet, um antisense bzw. sense Strang zu erhalten, wichtig ist die Orientierung der cDNA über Sequenzierung oder Verdau zu überprüfen. SacI (Fermentas, St. Leon-Rot) schneidet im pBluescript Plasmid am 5' Ende, somit wird durch die Inkubation mit T7 RNA Polymerase (Roche, Mannheim) antisense Transkripte hergestellt. Während das ApaI (Fermentas, St. Leon-Rot) am 3' Ende schneidet, werden sense Transkripte mit der Inkubation von T3 RNA Polymerasen (Roche, Mannheim) gewonnen. Nach der Linearisierung wurde die cDNA einer zweifachen Phenol-Chloroform-Reihe unterzogen und die cDNA mit 1/10 Vol. 3M NaAcetat und 2,5 Vol. 100% kaltem Ethanol gefällt und nach der DIG Markierung in 100µl DEPC-H₂O und 1µl RNase Inhibitor resuspendiert.

II.4.2.3 *In vitro* Transkription

Die Sonden wurden über eine *in vitro* Transkription von 1µg/µl Laminin Rezeptor 1 cDNA in dem pBluescript SKII Vektor (siehe II.1.4.2) mit Hilfe des DIG RNA labeling Kits (Roche, Mannheim) und T3 und T7 Polymerase hergestellt.

II.4.2.4 *In situ* Hybridisierung

Die Schnitte wurden zweimal für 20 Min. in Xylol und in einer Ethanolreihe (2x 15 Min. 100%-, 1x 15 Min. 95%-, 1x 10 Min. 70%- und 1x10 Min. 30% Ethanol) dehydriert. Danach wurden die Schnitte 1x für 10 Min. in DEPC-H₂O gehalten und anschliessend für 20 Min. in 0,2M HCl und 2x 5 Min. in 2x SSC behandelt.

Die Objektträger wurden für 15 Min. mit 1µg/ml Proteinase K (Roche, Mannheim) in 100mM Tris HCl (pH 7,5), 50mM EDTA inkubiert. Nachdem die Objektträger für 2x 5 Min. mit DEPC H₂O, für 5 Min. in 100mM Triethanolamine (pH 8,0) und für je 10 Min. in 0,25% Essigsäureanhydrid in 100mM Triethanolamine und 2x SSC behandelt wurden, erfolgte die Vorhybridisierung bei 37°C für 2 Std. mit je 100µl Hybridisierungspuffer (4x SSC, 50% Formamid, 0,25mg/ml yeast tRNA (Ambion, Austin, USA), 1x Denhardts, 5% Dextransulfat, 0,5mg/ml Lachsspermien DNA (Sigma, München) ohne Sonde. Anschliessend erfolgte die Hybridisierung mit je 100µl Hybridisierungspuffer mit 20ng DIG markierte Sonde.

Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C hybridisiert dabei wurden die Deckgläser (24x50mm R. Langenbrinck, Emmendingen) mit Fix Gum (Marabu, Tamm) verschlossen. Die Deckgläser wurden am nächsten Tag entfernt und die Schnitte mit 2xSSC kurz bei Raumtemperatur gewaschen und zweimal mit 2xSSC für je 1 Std. bei 37°C, einmal mit 1xSSC für 1 Std. und 0,5xSSC für 30 Min. bei 37°C und einmal für 5 Min. bei Raumtemperatur im Puffer I (siehe II.1.1) gewaschen. Anschliessend wurden die Schnitte in 2% Schafserum (Dako, CA, USA) in 0,3% Triton X in Puffer I (siehe II.1.1) für 30 Min. inkubiert und anschliessend mit einem alkalische Phosphatase markierten anti-Digoxigenin Antikörper (Roche, Mannheim, 1:500 in 1% Schafserum, 0,3% Triton X verdünnt) für 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden zweimal für 15 Min. in Puffer I (siehe II.1.1) und einmal für 2 Min. in Puffer III (siehe II.1.1) gewaschen.

Anschliessend wurden die Schnitte für >1 Stunde mit je 100µl Substrat Fast Red (2 Methyl-4-chlorobenzene-diazonium tetrachlorozincate, Roche, Mannheim) in 0,1M Tris HCl pH 8,2 inkubiert. Die Reaktion wurde mit Puffer IV (siehe II.1.1) abgestoppt und die Objektträger wurden in destilliertem H₂O gewaschen und mit Glycerolgelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

II.5 Proteinanalytische Methode

II.5.1 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse, auch Durchflusszytometrie genannt wird mit fluoreszenzmarkierten Zellen durchgeführt; dabei können Zellpopulationen charakterisiert, identifiziert und aufgetrennt werden. Die Zellsuspension wird durch eine Trägerflüssigkeit (Facs-Flow) so verdünnt, dass jeweils nur eine Zelle im rechten Winkel zum Flüssigkeitsstrom angeordneten Laser passiert. Verschiedene Detektoren messen daraufhin diverse Zellparameter, darunter die Streuung des Laserlichts.

Zu den fluoreszenzunabhängigen Streulichtparameter gehören: das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* FCS) es korreliert mit der Grösse der Zellen und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter* SSC), dass ein relatives Mass für die intrazelluläre Granularität der Zelle darstellt. Zusätzlich können mehrere Fluoreszenzen (fluoreszenzabhängige Parameter) gleichzeitig gemessen werden.

Der Fluoreszenzfarbstoff (FITC) wird durch Licht der Wellenlänge 450-500nm (blaues Licht) angeregt und strahlt ein einergieärmeres Licht der Wellenlänge 500-550nm (gelbgrünes Licht) aus. Für die FACS Analyse (BD Bioscience, Heidelberg) wurden die Zelllinien WM 1552, IGR 39, WM 1205 LU und WM 451 LU verwendet.

Die unterschiedlichen Zelllinien werden in Kulturflaschen bis zu 5×10^5 – 1×10^6 Zellen angezüchtet. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen werden mit dem entsprechendem HBSS Medium (Gibco, Karlsruhe) gewaschen, abtrypsiniert und anschliessend wurden 8ml Stoppmedium zu den verschiedenen Zelllinien (Gibco, Karlsruhe) hinzugegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen zentrifugiert (5 Min. bei 1800Upm), der Überstand abgesaugt und die Zellpellets wurden mit 1ml 1x PBS/1% BSA gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und 50µl Erstantikörper (Anti-67kDa Laminin receptor IgM; Maus, monoklonal, Ab-1; Dianova, Hamburg) in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 in 1x PBS/1% BSA) hinzugegeben. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 1 Std. bei Raumtemperatur. Nach einen weiteren Waschschrift (1%BSA/1x PBS) und Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und der Zweitantikörper (Anti Maus IgM FITC Konjugat, Sigma, München) wurde in einer 1:20 Verdünnung (in 1x PBS/1%BSA) hinzugegeben und im Dunkeln für 1 Std. aufbewahrt. Abschliessend wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert und die Zellpellets in 500µl 1x PBS resuspendiert. Die FACS Analyse wurde dann sofort gestartet.

III Ergebnisse

III.1 Übersicht

Zuerst wird eine Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzte Vorgehensweise gegeben.

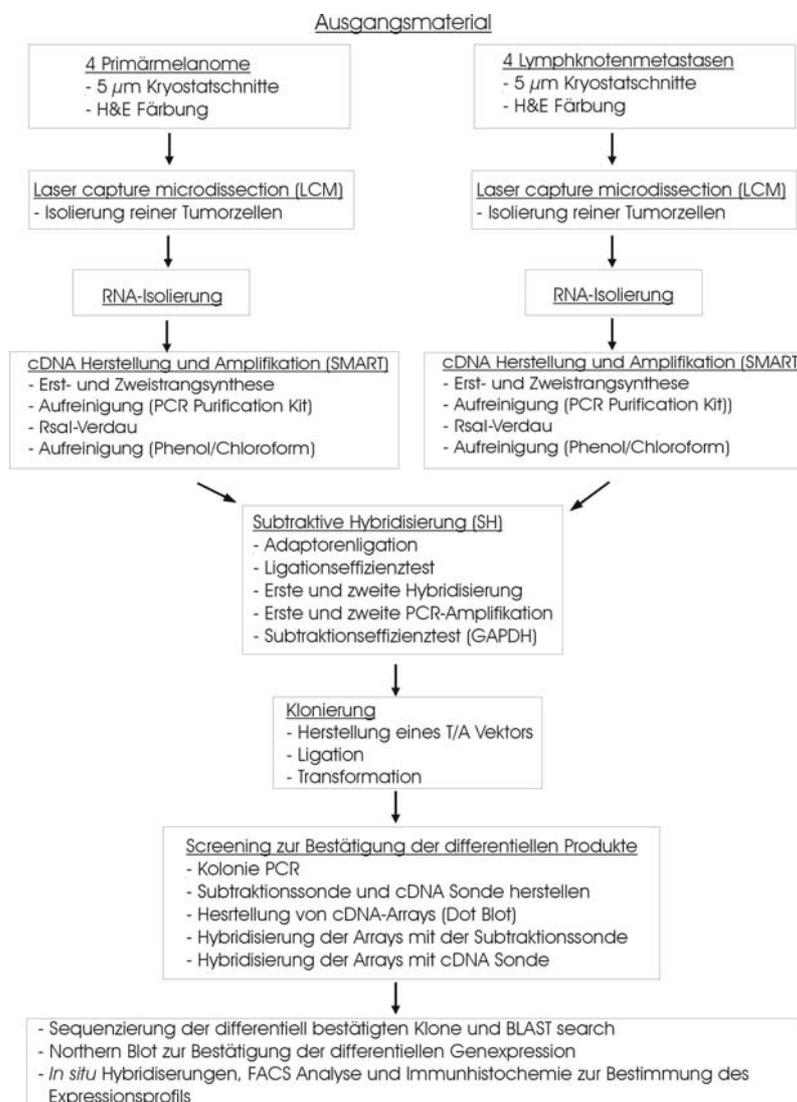


Abb. 10: Übersichtsdarstellung der Vorgehensweise in dieser Arbeit. Nach der Isolierung von Melanomzellen in Primärmelanom und Lymphknotenmetastasen anhand der Laser Capture Microdissection (LCM) erfolgte die Gesamt RNA-Isolierung. Die entsprechenden RNA's wurden daraufhin gepoolt, um einen repräsentativen Querschnitt der Genexpression der Melanomzellen zu erreichen. Anschliessend wurde aus den geringen RNA Mengen über den SMART Kit (BD Bioscience Clontech) cDNA synthetisiert und über PCR amplifiziert. Die Qualität der gewonnenen cDNA wurde über GAPDH-, Tyrosinase- und MelanA- PCR überprüft. Daraufhin wurde die subtraktive Hybridisierung über den PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit durchgeführt. Differentielle cDNA's wurden kloniert und einem Screening Verfahren unterzogen. Hierzu wurden amplifizierte Inserts einzelner Klone auf doppelte Filter (Array/Dot Blot) aufgetropft. Für das Screening wurden Primärmelanom- und Lymphknotenmetastasen spezifische Subtraktions- und cDNA- Sonden hergestellt und mit den Arrays hybridisiert. Somit können differentiell exprimierte Transkripte identifiziert werden. Die erste Hybridisierung mit der Subtraktionssonde diente als Vorscreening, dabei wurde der Hintergrund minimiert (Wang and Brown *et al.*, 1991). Nach der zweiten Hybridisierung mit der entsprechenden cDNA Sonde wurden die bestätigten differentiellen Klone sequenziert. Über eine Homologiesuche über das BLAST Programm (Altschul *et al.*, 1997) wurden diese Klone dann identifiziert. Über Northern Blots wurde anschliessend die differentielle Expression untersucht. Über weitere Analysen wie z.B. Immunhistologie oder *in situ* Hybridisierungen wurde das Expressionsmuster im Hautgewebe detektiert.

III.2 Isolierung reiner Melanomzellen aus dem Gewebeverband über Laser Capture Microdissection

Anhand der Laser Capture Microdissection (LCM) können Melanomzellen aus einem Gewebe schnell und effektiv isoliert werden, um diese für molekulare Analysen zu verwenden. Bei der LCM wurden die Zellen des Interesses auf einem Polymerfilm (Cap, siehe II.3.1) transferiert und die Zellen anschliessend weiter aufgearbeitet. Die Morphologie der Zellen als auch die vorhandene DNA, RNA und Proteine sollten dabei weitgehend intakt bleiben.

III.2.1 Gewebeauswahl für die Laser Capture Microdissection

Es wurden für den Vergleich der Genexpression im Primärtumor versus Lymphknotenmetastase je vier Melanome und vier Lymphknotenmetastasen von unterschiedlichen Patienten verwendet (siehe Tabelle 2). Dies hat den Vorteil, dass individuelle Expressionsschwankungen kompensiert werden und vor allem Gene identifiziert werden, die in einer Mehrzahl der Patienten differentiell exprimiert werden. Somit kann ein repräsentativer Querschnitt der Genexpression erhalten werden. Der Nachteil dabei ist, dass polymorphe Gene isoliert werden können. Die Auswahl der verwendeten Gewebe beruhte hierbei auf histologischen Befunden.

Gewebe	Register-Nr.:	Tumor-dicke	Clark Level	Verlauf der Patienten
Primärmelanom: superfiziell spreitendes Melanom (SSM) (PM1)	1251/99	4 mm	V	- 1/1999: SSM - 11/2000: Hautmetastasen und Lymphknotenfernmetastasen - 3/2001: Fernmetastasen im Skelett, zentrales Nervensystem (ZNS) und in verschiedenen Organen - 11/2001: verstorben
Primärmelanom: superfiziell spreitendes Melanom (SSM) (PM2)	12717/00	1 mm	IV	- 8/2000: SSM und Lymphknotenmikrometastasen - der weitere Verlauf ist unbekannt
Primärmelanom: noduläres Melanom (NM) (PM3)	1799/98	14 mm	V	- 4/1998: NM - 2/1999: regionale Lymphknotenmetastasen und Lymphknotenfernmetastasen - 6/1999: Fernmetastasen in Lunge, ZNS, Skelett und in anderen Organen - 8/1999: verstorben

Gewebe	Register-Nr.:	Tumor-dicke	Clark Level	Verlauf der Patienten
Primärmelanom: noduläres Melanom (NM) (PM4)	10687/99	11mm	V	- 3/1997: NM - 6/1999: NM Lokalrezidiv - 12/1999: Hautmetastasen, Fernmetastasen und Lymphknotenmetastasen
Lymphknotenmetastase (LKM) (LKM1)	7577/97	3,5cm	-	- 9/1995: NM, 4,2mm, Clark Level IV - 1996: Lymphknotenfernmetastasen - 1997: regionale Lymphknotenmetastasen - 9/1997: Fernmetastasen in Lunge und in anderen Organen - 1/1998: verstorben
Lymphknotenmetastase (LKM) (LKM2)	9925/98	3,8cm	-	- 8/1996: lentiginöses Melanom (LM), 12mm, Clark Level V - 6/1997: Lymphknotenmetastasen - 7/1998: Lymphknotenmetastasen - 10/1998: Lymphknotenfernmetastasen - 12/1998: Fernmetastasen in der Leber - 12/1999: Fernmetastasen im ZNS - 1/2000: verstorben
Lymphknotenmetastase (LKM) (LKM3)	3668/00	5mm	-	- 3/2000: LM, 20 mm, Clark Level V - 2000: Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen
Lymphknotenmetastase (LKM) (LKM4)	10363/98	2,5cm	-	- 6/1989: SSM, 3,2mm, Clark Level III - 8/1998: regionale Lymphknotenmetastasen und Lymphknotenfernmetastasen

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Gewebe. Daten zur Tumordicke der Primärmelanome und der Lymphknotenmetastasen und Krankheitsverlauf. Die Proben wurden für die spätere Weiterverfolgung nummeriert: PM1, PM2, PM3 und PM4 = Primärtumore. LKM1, LKM2, LKM3 und LKM4 = Lymphknotenmetastasen.

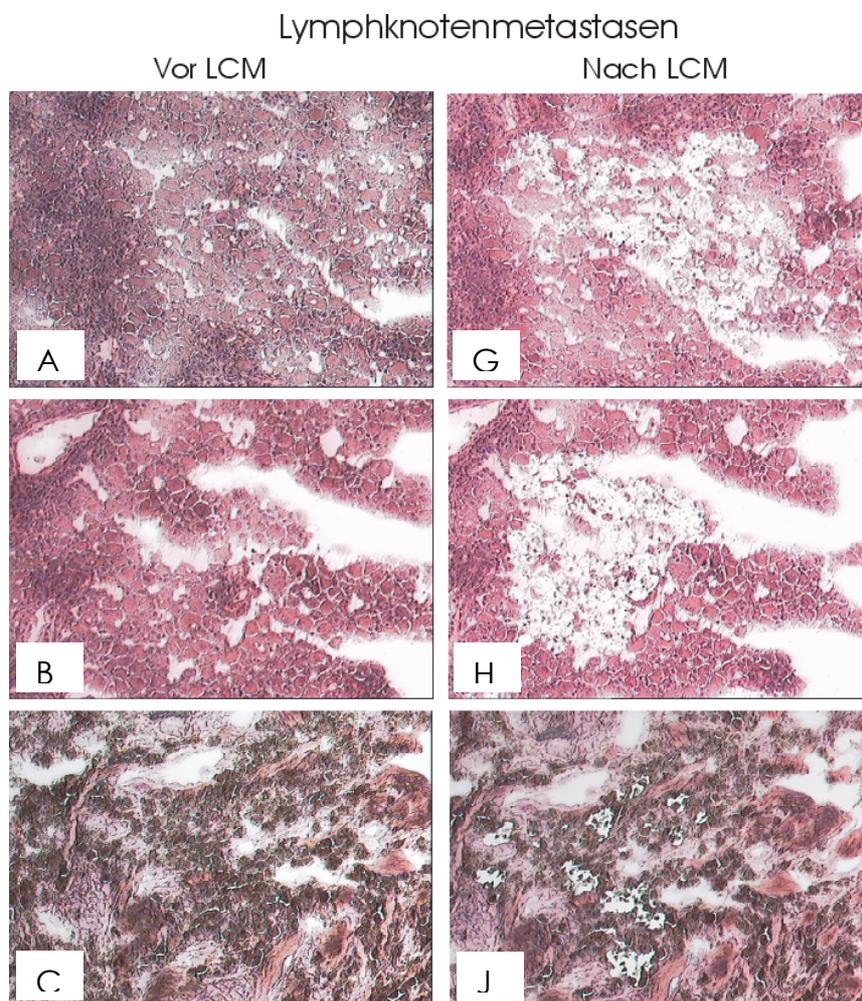
III.2.2 Isolierung der Melanomzellen aus Lymphknotenmetastasengewebe

Nach der Gewebeauswahl wurde für die Identifizierung der Melanomzellen HE (Hematoxillin & Eosin Y) und HMB-45-Färbungen (nicht dargestellt) an 5µm dicken Kryostatschnitten der einzelnen Geweben durchgeführt. Bei einer HE-Färbungen werden Zellkerne gefärbt, während bei einer HMB-45 Färbung die Melanomzellen spezifisch gefärbt werden (siehe II.3.1.2 und II.3.1.1). Bei einer HE-Färbung können allein aufgrund der Morphologie der Zellen Melanomzellen identifiziert werden.

Nachdem die Lokalisation der Melanomzellen in den Schnitten bestimmt wurde, wurden parallel für die LCM Kryostatschnitte angefertigt und mit HE angefärbt. Nach der 10minütigen Lufttrocknung wurden die einzelnen Objektträger (ohne Deckglas) sofort für die LCM eingesetzt.

Als erstes wurde die minimale Anzahl der Melanomzellen bzw. Laserimpulse bestimmt, die für die anschliessende molekularbiologische Aufbereitung notwendig ist. Die cDNA Qualität wurde dabei über eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) des Haushaltsgens GAPDH analysiert. Es zeigte sich, dass 800-1200 Laserimpulse ausreichend sind, um eine ausreichende cDNA Quantität zu erreichen. Dies entspricht ca. 4800-7200 isolierte Melanomzellen aus den Lymphknotenmetastasen (Laserimpuls x 6 = isolierte Gesamtzellzahl). Es konnte gezeigt werden, dass 4800 Melanomzellen für eine cDNA Herstellung guter Qualität ausreichend waren. Für die Isolierung von 4800-7200 Melanomzellen wurden pro eingesetztes Gewebe in der Regel 5 Objektträger mit je 2 Kryostatschnitten benötigt. Die Anzahl der Gewebsschnitte hängt hierbei von der Tumorgrösse ab, bei sehr kleinen Tumoren wurden für die Isolierung der erwünschten Zellen meist mehr Schnitte benötigt.

In Abbildung 11 sind HE-Schnitte der verwendeten Lymphknotenmetastasen vor und nach der LCM-Isolierung gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Melanomzellen aus den Geweben erfolgreich herausgelöst wurden.



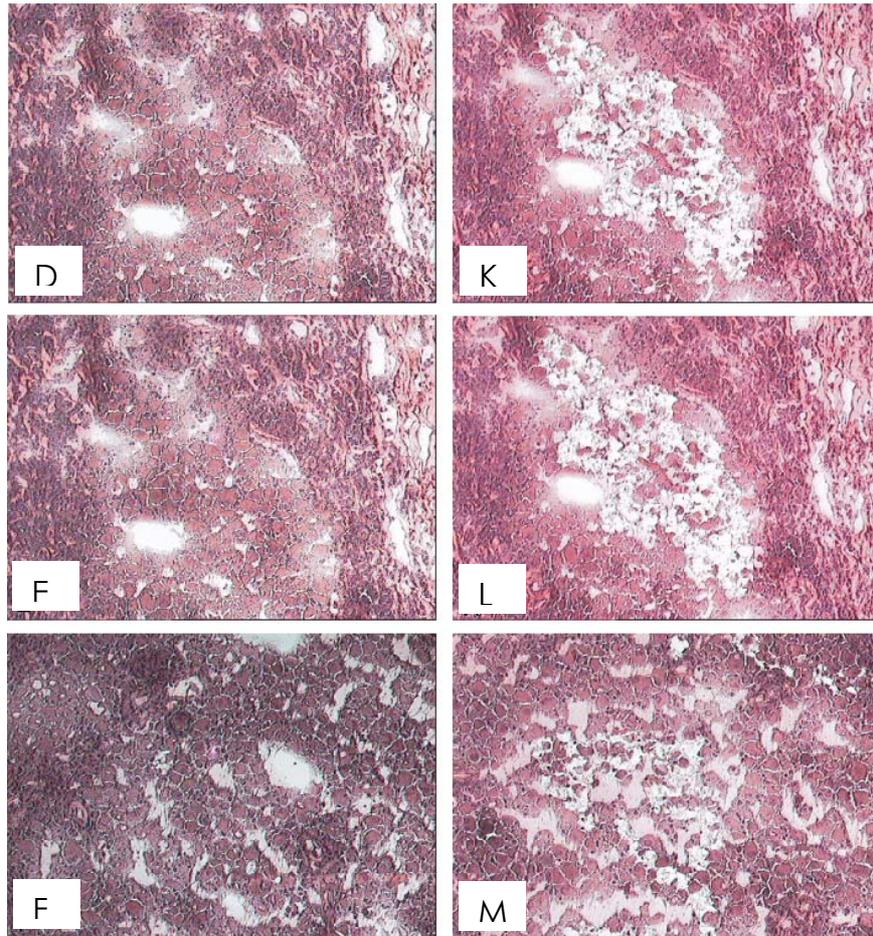


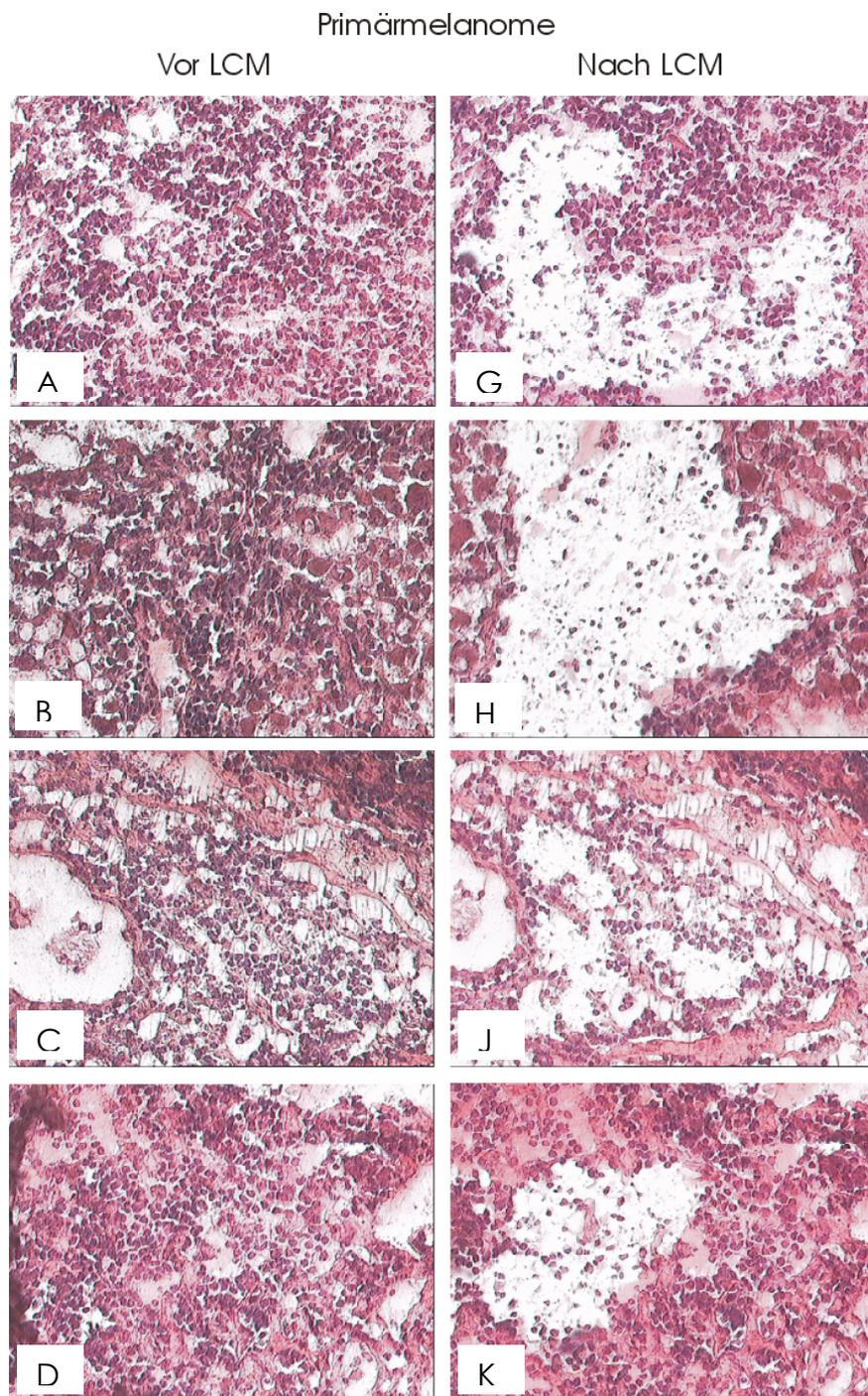
Abb. 11: Übersicht der Isolierung reiner Melanomzellen aus Lymphknotenmetastasen. Bilder A-F zeigen die HE Färbungen der Melanomzellen vor der Übertragung der Melanomzellen aus den Lymphknotenmetastasen auf die Caps, während in Bilder G-M die HE Färbungen der Melanomzellen nach der Übertragung der Melanomzellen aus den Lymphknotenmetastasen auf die Caps zu sehen ist.

III.2.3 Isolierung der Melanomzellen aus Primärmelanomgewebe

Als erstes wurde nach der Gewebeauswahl (siehe III.2.1) für die Identifizierung der Melanomzellen HE (Hematoxyllin & Eosin Y) und HMB-45 Färbungen an 5µm dicken Kryostatschnitten durchgeführt (nicht dargestellt). Anschliessend wurden parallel Kryostatschnitte angefertigt, mit HE gefärbt und der LCM unterzogen.

Die Anzahl der Laserimpulse betrug wie bei den Lymphknotenmetastasen 800-1200, um eine suffiziente cDNA Quantität zu erhalten. Die cDNA Qualitätsüberprüfung erfolgte hier auch über eine GAPDH-PCR. Somit wurden auch bei dem Primärmelanomen ca. 4800-7200 Melanomzellen pro Gewebe isoliert. Da in den vorhandenen Primärmelanomen im Vergleich zu den Lymphknotenmetastasen weniger Melanomzellen vorhanden waren, wurden für die Isolierung von 4800-7200 Melanomzellen 8 Objektträger mit je 2-3 Kryostatschnitten verwendet.

In Abbildung 12 sind exemplarisch HE-Färbungen vor der LCM und nach der Entfernung der Melanomzellen aus den Primärtumoren dargestellt.



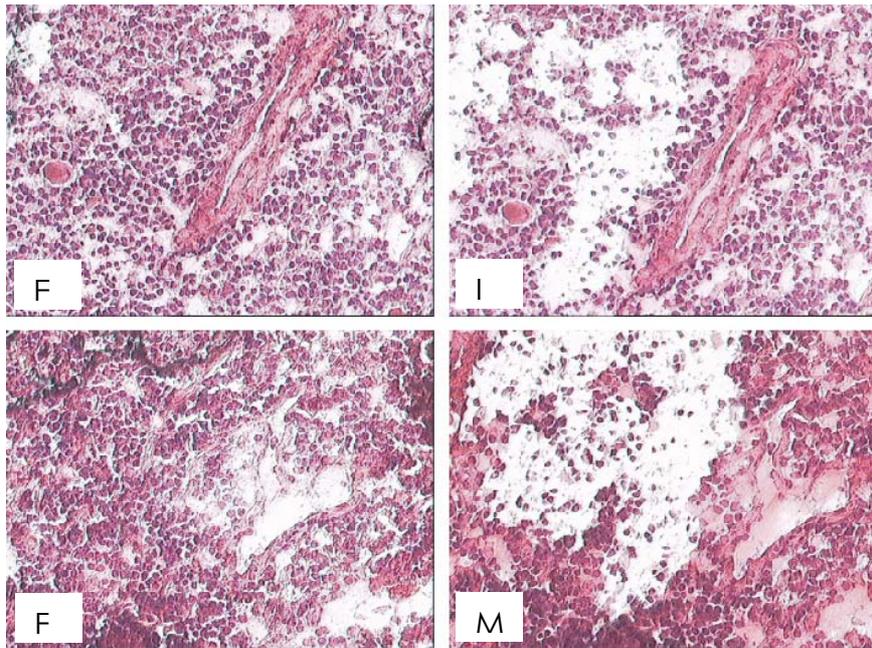


Abb. 12: Übersicht der Isolierung reiner Melanomzellen aus Primärtumoren. Bilder A-F zeigen die HE Färbungen der Melanomzellen vor der Übertragung der Melanomzellen aus den Primärmelanomen auf die Caps, während in Bilder G-M die HE Färbungen der Melanomzellen nach der Übertragung der Melanomzellen aus den Primärmelanomen auf die Caps zu sehen ist.

Nach der Isolierung der reinen Melanomzellen aus den Primärmelanomen bzw. Lymphknotenmetastasen wurden die Melanomzellen auf den einzelnen Caps sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren, damit die RNA nicht degradiert wird. Anschliessend wurden die einzelnen RNA's isoliert (siehe II.3.1.3). Die entsprechenden GAPDH-PCR's sind in III.2.4 zu sehen.

III.2.4 RNA Extraktion aus mikrodisektierten Melanomzellen

Für die Gewinnung der RNA wurden aus mikrodisektierten Melanomzellen zwei verschiedene Isolierungsprotokolle getestet: die Isolierung der RNA über Guanidinoisothiocyanat-(GTC; RNA Clean™ System) und die Isolierung über den Gentra-Kit (Minneapolis, USA; siehe II.3.1.3 und II.3.2.2). Die Quotienten aus den Extraktionswerten bei 260nm und 280nm, die den Reinheitsgrad angeben, lagen zwischen 1,4 und 2,0. Der Reinheitsgrad der RNA lies keine Aussagen über die Integrität der RNA zu, solange der Wert zwischen 1,4 und 2,1 lag. RNA's mit Werten unter 1,4 sind meistens degradiert (Hipfel *et al.*, 1998). Die Ergebnisse der Messungen der RNA Extraktionen sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

GTC-RNA- Isolierungsprotokoll			Gentra-RNA- Isolierungsprotokoll	
Gewebe	Quotient 260/280nm	Ausbeute in μg	Quotient 260/280nm	Ausbeute in μg
SSM (PM1)	1,6	0,03	1,4	0,11
SSM (PM2)	1,7	0,12	1,7	0,71
NM (PM3)	1,5	0,12	1,9	0,57
NM (PM4)	1,4	0,08	1,8	0,37
LKM (LKM1)	1,6	0,13	1,8	0,52
LKM (LKM2)	1,6	0,02	1,8	0,25
LKM (LKM3)	1,5	0,08	2,0	0,38
LKM (LKM4)	2,0	0,02	2,0	0,43

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Reinheit und Ausbeute der RNA unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Isolierungsprotokolle.

Es ist zu sehen, dass mit der Gentra-Isolierungsmethode eine höhere RNA-Ausbeute erreicht wurde als mit der GTC-RNA-Extraktionsmethode. Ausserdem ist der Quotient, d.h. Reinheitsgrad der RNA tendenziell besser.

Eine Qualitätsüberprüfung der RNA wurde über die Herstellung und anschliessenden Amplifizierung (siehe II.3.3) der cDNA über SMART und der PCR-Amplifikation des Haushaltgens GAPDH vorgenommen (siehe Abb.13). Eine Überprüfung der RNA-Qualität über Gelelektrophorese konnte nicht vorgenommen werden, da die RNA-Mengen zu gering waren.

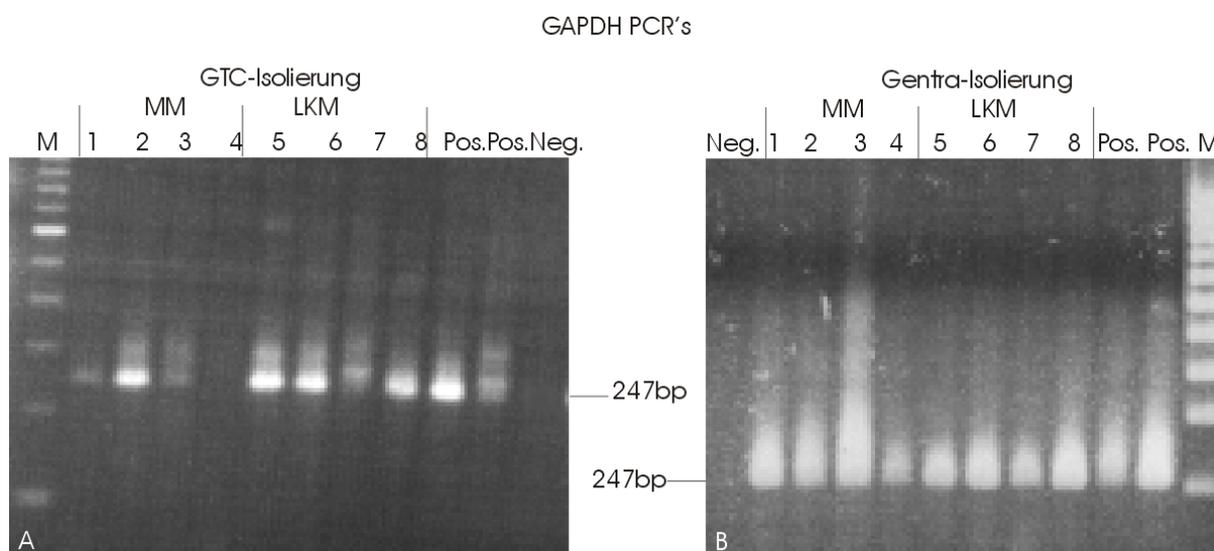


Abb. 13: Überprüfung der RNA-Qualität über nested GAPDH-RT-PCR. In Bild A sind die über die GTC-Isolierungsmethode gewonnenen RNA's für die cDNA Herstellung verwendet worden, während in Bild B die Gentra-Methode zur RNA Extraktion eingesetzt wurde. Neg. = Negativ Kontrolle, Pos. = Positiv-Kontrolle (SK-Mel 28), LKM = Lymphknotenmetastasen cDNA, MM = Primärmelanom cDNA und M = Marker (100bp, MBI, Fermentas). Die GAPDH spezifische Bande liegt bei 247bp. Spuren 1-4 weisen die Primärmelanomen cDNA auf: Spur 1 = PM1, Spur 2 = PM2, Spur 3 = PM3 und Spur 4 = PM4. Spuren 5-8 weisen die Lymphknotenmetastasen cDNA auf: Spur 5 = LKM1, Spur 6 = LKM2, Spur 7 = LKM3 und Spur 8 = LKM4.

Mit beiden eingesetzten Methoden konnte, ausser in Probe 4 (GTC-Methode), erfolgreich das Haushaltsgen GAPDH amplifiziert werden. Jedoch ist ersichtlich, dass bei gleichbleibender Zyklenzahl mehr GAPDH-Produkt mit der Gentra-RNA-Extraktion zu erzielen war als mit der GTC-RNA-Isolierungsmethode. Dies liegt wahrscheinlich vor allem an der höheren RNA-Menge, die mit dieser Isolierungsmethode erzielt wurde. Dieses Gentra-RNA-Extraktionsprotokoll wurde daraufhin leicht modifiziert und für die weiteren RNA-Isolierungen verwendet (siehe II.3.1.3).

Da vor allem ein repräsentativer Querschnitt der Genexpression erreicht werden sollte, wurden die RNA's gleicher Ausgangsgewebe gepoolt, d.h. je 15µl RNA aus den vier einzelnen Lymphknotenmetastasen- bzw. aus den vier Primärmelanomen. Die RNA's wurden anschliessend für die cDNA Herstellung mittels SMART-Kit weiterverarbeitet.

III.3 Herstellung und Amplifikation von cDNA

Nach der RNA-Isolierung aus den mikrodisektierten Melanomzellen der Lymphknotenmetastasen und der Primärmelanome wurde die cDNA über die SMART-Methode (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) generiert und über eine LD (*long distance*) PCR Amplifikation angereichert (Chenchik *et al.*, 1998; Herrler *et al.*, 2001). Die SMART cDNA Synthese Methode umfasst dabei mehrere Schritte: die Erstrang cDNA Synthese, die Zweitstrang cDNA Synthese über eine LD PCR Amplifizierung und die Aufreinigung der PCR Proben. Danach wurden die aufgereinigten Proben über einen RsaI-Restriktionsverdau in kleinere Produkte geschnitten, damit bei der anschliessenden PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung die Adaptoren ligiert werden können. Nach dem RsaI-Verdau wurden die Proben einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und gefällt.

Nach der cDNA-Synthese wurde zunächst die optimale Zyklenzahl für die SMART-Amplifikation der cDNA aus Lymphknotenmetastase bzw. Primärmelanom und der Positiv-Kontrolle humane Plazenta cDNA bestimmt, damit ein repräsentativer Querschnitt der Genexpression in den unterschiedlichen Geweben erhalten bleibt (siehe Abb. 15). Zunächst wurde die Erstrang cDNA Synthese eingeleitet. Dazu wurden je 3µl Gesamt RNA aus den gepoolten mikrodisektierten RNA's eingesetzt (siehe II.3.1.3). Für die anschliessende Zweitstrang cDNA Synthese über eine LD PCR wurden je 7µl Erstrang-cDNA eingesetzt. Bei der Optimierung der PCR Zyklenzahl wurden für jede Tester oder Treiber cDNA je 3 PCR Reaktionsgefässe verwendet.

Nach 15 Zyklen wurden zwei der PCR Reaktionsgefäße auf Eis aufbewahrt und aus dem dritten Eppendorfgefäß wurde nach einer bestimmten Zyklenzahl (18-, 21- und 24 Zyklen) je 15µl Aliquots entnommen (siehe II.3.3.2). Je 5µl der einzelnen Aliquots wurden auf einem Agarose Gel aufgetragen (siehe Abb. 14).

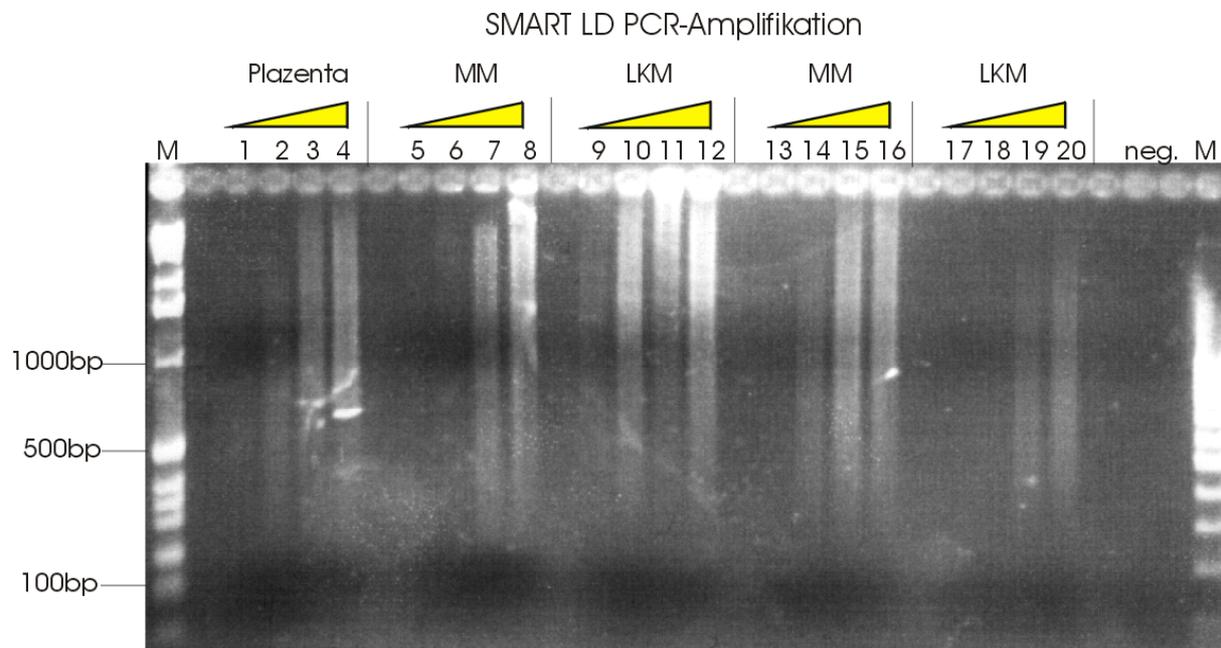


Abb. 14: Über SMART LD PCR amplifizierte cDNA's (Doppelbestimmung). M = Marker (1kb, 100bp, MBI, Fermentas). MM = Primärmelanom, LKM = Lymphknotenmetastase, Plazenta = Positiv Kontrolle und neg. = Negativ Kontrolle. Nach jeweils 15, 18, 21 und 24 Zyklen (zunehmende Dreiecke) wurden je 5µl PCR Produkt auf einem 1,2%igen TAE Agarosegel analysiert. Spuren 1-4 zeigen die Amplifikate der Positiv Kontrolle (humane Plazenta), Spuren 5-6 und 13-16 die aus Primärmelanomen amplifizierte cDNA und Spuren 9-12 bzw. 17-20 die aus Lymphknotenmetastasen amplifizierte cDNA.

Wie in Abb.14 zu sehen ist, variierte die ideale PCR Zyklenzahl in den unterschiedlichen cDNA's. Nach Anleitung des SMART-Protokolls sollte eine Überamplifizierung vermieden werden, da der repräsentativer Querschnitt der Genexpression in den Geweben verfälscht werden kann, und es zu einer Überschreitung der exponentielle Phase kommen kann. Dies hat zur Folge, dass eine Akkumulierung von Einzelstrang cDNA im Vergleich zu Doppelstrang cDNA erfolgt, welche die Klonierung nach der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung beeinträchtigen kann. Ebenso steigt die Fehlerquote der thermostabilen Polymerase (Barnes *et al.* 1994, Cheng *et al.*, 1994) durch die Erhöhung der PCR Zyklenzahl an. Bei der generierten Primärmelanom cDNA lag die ideale PCR Zyklenzahl bei 20, während bei der amplifizierten Lymphknotenmetastasen cDNA 17 PCR Zyklen optimal waren. Bei der Positiv-Kontrolle (humane Plazenta) waren 19 Zyklen die ideale PCR Zyklenzahl. Bei der Lymphknotenmetastasen erfolgte die Bestimmung der PCR-Zyklenzahl anhand der Proben 9-12.

III.3.1 Analyse der Quantität /Qualität der über SMART generierten cDNA's

Die über den SMART Kit gewonnenen cDNA's wurden auf ihre Qualität mittels nested GAPDH-PCR überprüft (siehe II.3.3.4; Abb.15). Das Haushaltsgen GAPDH ist ein ubiquitär exprimiertes Transkript.

Aus der ersten GAPDH-PCR wurden 2µl PCR-Produkt für die nested PCR verwendet. Anschliessend wurden aus der nested GAPDH-PCR je 5µl der einzelnen cDNA's auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich zur SMART Positiv-Kontrolle (humane Plazenta) wurde eine weitere GAPDH Positiv Kontrolle (SK-Mel 28-Melanomzellen, siehe II.3.2.2.1) verwendet.

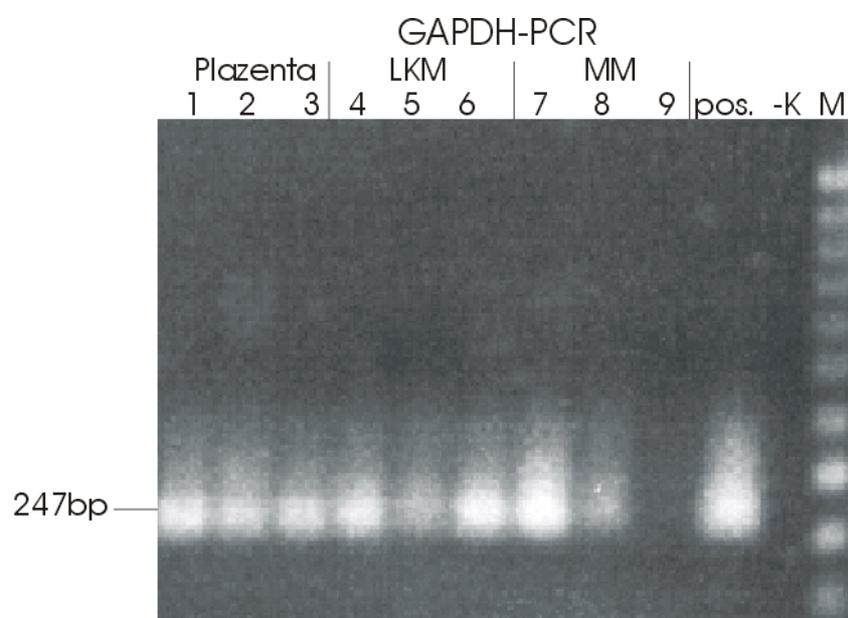


Abb. 15: Überprüfung der Qualität der über SMART hergestellten cDNA's. Plazenta = Positiv-Kontrolle, LKM = Lymphknotenmetastasen cDNA, MM = Primärmelanom cDNA, pos. = Positiv Kontrolle (SK-Mel 28), -K = Negativ Kontrolle und M = Marker (100bp, MBI, Fermentas). Die GAPDH spezifische Bande liegt bei 247bp. Spuren 1-3 humane Plazenta-, Spuren 4-6: die Lymphknotenmetastasen- und Spuren 7-9: die Primärmelanom- cDNA.

Es ist zu sehen, dass in allen cDNA's, ausser von der Primärmelanom cDNA Probe 9, das Haushaltsgen GAPDH amplifiziert wurde.

Zusätzlich wurden zur weiteren Kontrolle nested PCR's mit den Melanommarkern MelanA und Tyrosinase durchgeführt. Anhand der beiden Melanommarker konnte überprüft werden, ob bei der Laser Capture Microdissection die richtigen Zellen, d.h. die Melanomzellen isoliert wurden, da nur diese Zellen oben genannte Gene, die im Pigmentstoffwechsel involviert sind, exprimieren. Die nested MelanA PCR und die Tyrosinase PCR's laufen über je 35 Zyklen (siehe II.3.3.4).

Aus der ersten MelanA- bzw. Tyrosinase-PCR wurden je 2µl PCR-Produkt für die nested PCR verwendet. Anschliessend wurden aus der jeweiligen nested PCR 5µl auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 16). Neben der SMART Positiv Kontrolle (humane Plazenta) wurde SK-Mel 28 als weitere Positiv Kontrolle verwendet (siehe II.3.2.2.1).

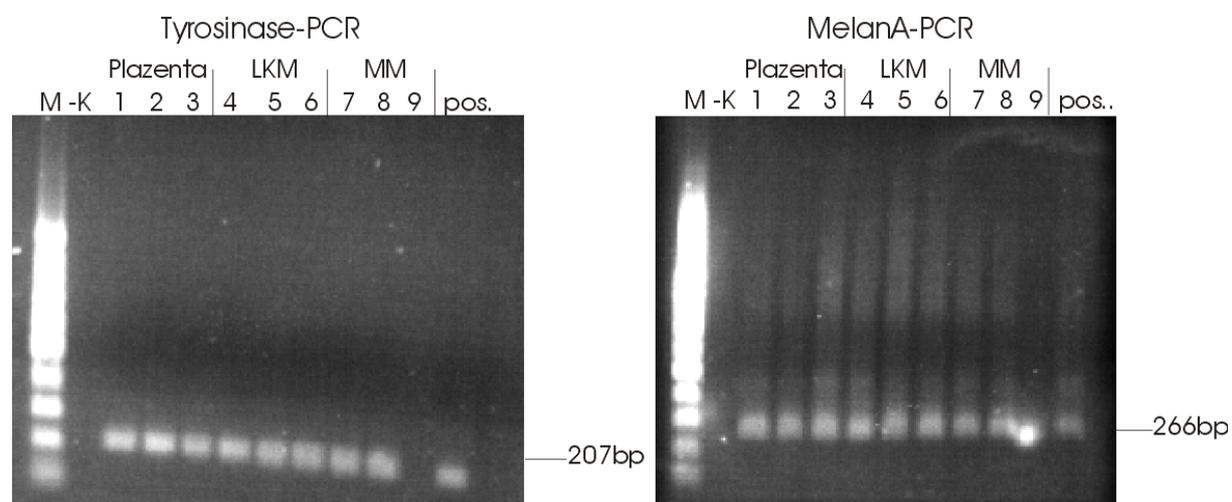


Abb. 16: Überprüfung der Qualität der über SMART hergestellten cDNA's. Plazenta = Positiv-Kontrolle, LKM = Lymphknotenmetastasen cDNA, MM = Primärmelanom cDNA, pos. = Positiv Kontrolle (SK-Mel 28), – K = Negativ Kontrolle und M = Marker (100bp, MBI, Fermentas). Die Tyrosinase spezifische Bande liegt bei 207bp, während die MelanA spezifische Bande bei 266bp liegt. Spuren 1-3: humane Plazenta-, Spuren 4-6: Lymphknotenmetastasen- und Spuren 7-9: Primärmelanom- cDNA .

Wie in Abb. 13 gezeigt wird, konnte in allen cDNA's, ausser Primärmelanom cDNA Probe 9, Tyrosinase und MelanA amplifiziert werden. Es war erstaunlich, dass die SMART-Positiv-Kontrolle (humane Plazenta) ebenfalls in der MelanA- und Tyrosinase- PCR eine Bande ergab. Es könnte sein, dass die aus dem Kit verwendete Plazenta cDNA Kontrolle Melanozyten enthielt. Nach der Qualitätsanalyse wurden die einzelnen cDNA's in die PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung eingesetzt, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren.

III.4 PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung

III.4.1 Analyse des Restriktionsverdaus, der Adaptorligation und der Subtraktions-effizienz

Zur Isolierung differentiell exprimierter Gene wurde die PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung verwendet (Diatschenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996). Die Methode wurde nach Anleitung des PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, USA) durchgeführt (siehe II.3.4).

Die über SMART amplifizierte Lymphknotenmetastasen und Primärmelanom cDNA's wurden zuerst aufgereinigt (siehe II.3.3.3) und anschliessend über einen RsaI-Restriktionsverdau in kleinere Produkte geschnitten, die die Adaptorligation bei der anschliessenden PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung ermöglicht (siehe II.3.4.3 und Abb. 17). Nach dem RsaI-Verdau wurden die Proben einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und gefällt.

Parallel hierzu wurde die cDNA der im Kit vorhandenen Positiv Kontrolle (Skelettmuskel) vorbereitet (siehe II.3.4.1). Das Verfahren bestand dabei aus mehreren Schritten: die Erstrang- und Zweitstrang cDNA Synthese und den Restriktionsverdau mit RsaI. Zur Kontrolle des Restriktionsverdaus der einzelnen cDNA's wurden unverdaute doppelsträngige cDNA's neben RsaI verdauter cDNA auf einem 1%-igen TAE Agarosegel aufgetragen und die Grössenverteilung der DNA's miteinander verglichen (Abb. 17).

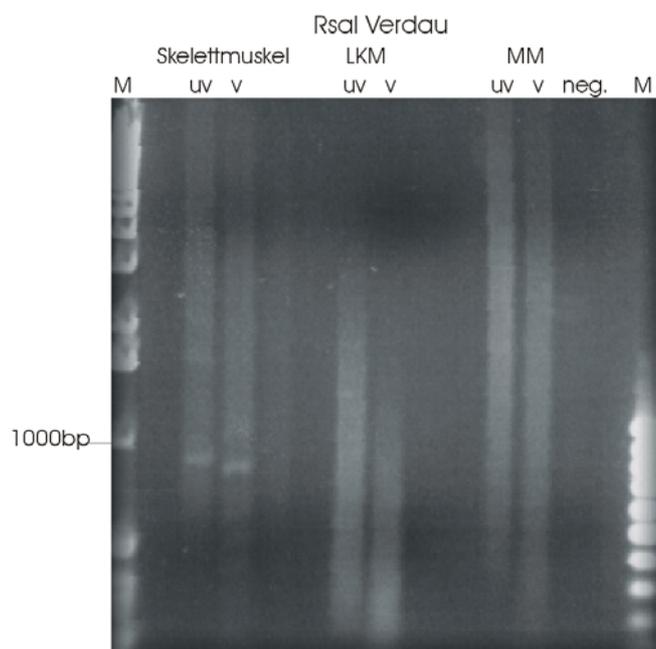


Abb. 17: Effizienz des RsaI Restriktionsverdaus. M = Marker (1kb, 100bp, MBI Fermentas), Skelettmuskel = Positiv Kontrolle, LKM = Lymphknotenmetastase, MM = Primärmelanom, neg. = Negativ Kontrolle. 2,5µl unverdaute (uv) cDNA wurde im Wechsel mit 5 µl RsaI-verdauter (v) cDNA aufgetragen..

Unverdaute cDNA sollte im Bereich zwischen 0,5 und 10kb liegen, während verdaute cDNA im Bereich zwischen 0,1 und 2kb liegen sollte. Wie in Abb. 17 zu sehen ist war der RsaI-Restriktionsverdau bei allen cDNA's erfolgreich, da ein Shift in der Grössenverteilung der einzelnen cDNA's nach dem RsaI-Verdau zu sehen war. Die durch den RsaI-Verdau entstandenen glatten Enden fungierten als Ansatzstellen für die anschliessende Adaptorligation.

Bei der Adaptorligation wurden die Adaptoren an die Tester cDNA's (Lymphknotenmetastasen, Primärmelanom und Skelettmuskel) ligiert. Dabei fungierten in zwei separaten Ansätzen sowohl Primärmelanom als auch Lymphknotenmetastasen als Tester, um überexprimierte Gene der Primärmelanome bzw. der Lymphknotenmetastasen zu identifizieren. Die Adaptoren wurden nur an die Tester- und nicht an die Treiber-cDNA's ligiert. Ein Erfolg der Adaptorligation wurde mittels GAPDH-PCR unter Verwendung GAPDH spezifischer und Adaptoren spezifischer Primer untersucht (Abb. 18). Die PCR Reaktion für GAPDH wurde über 25 Zyklen durchgeführt. Dabei wurden 2 Ansätze pro Probe durchgeführt.



Abb. 18: Effizienztest der Adaptorligation. M = Marker (1kb und 100bp, MBI Fermentas), n.= Negativ Kontrolle, Skelettmuskel = Positiv Kontrolle, MM = Primärmelanom, LKM = Lymphknotenmetastase. Spuren 1-4 Positiv Kontrolle, 5-8 Primärmelanom und Spuren 9-12 Lymphknotenmetastase. Spur 1,3,5,7,9 und 11 zeigen die Banden aus der Kombination Adaptor spezifischer Primer und GAPDH-Primer. Spur 2,4,6,8,10 und 12 zeigen die Banden der internen GAPDH-Primer (siehe II.2.2.5.4).

PCR Produkte, die mit den internen spezifischen GAPDH Primer amplifiziert werden, weisen eine kleinere Bande (500bp) auf. PCR Produkte, die aus der Amplifizierung mit einem GAPDH spezifischen und einem Adaptor spezifischen Primer entstehen, weisen eine grössere Bande (750bp) auf. Durch Vergleich der Bandenintensität der verschiedenen PCR-Amplifikate der internen GAPDH Primer und der Kombination aus GAPDH-spezifischen Primer und Adaptor spezifischen Primer kann festgestellt werden, ob ausreichend Adaptoren ligiert wurden. Bei allen drei Proben war die Adaptorligation erfolgreich.

Das Gelingen der Adaptorligation ist für die nach den zwei Tester-Treiber-Hybridisierungen abschliessenden Suppressions-PCR's essentiell, da die hierfür verwendeten Primer an die Adaptoren ansetzen (Diatschenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996).

Nach der Adaptorligation, erfolgte die erste Tester-Treiber-cDNA Hybridisierung, in der ein Überschuss an Treiber cDNA gegeben wurde. Somit entstehen, wenn die cDNA in Tester und Treiber vorkommen, aus kinetischen Gründen Mischhybride. Hingegen verbleiben differentielle Transkripte, die nur im Tester vorkommen, einzelsträngig (siehe II.3.4). Nur diese können bei der darauffolgenden zweiten Hybridisierung bei der Vermischung beider Tester-Fraktionen Doppelstranghybride mit unterschiedlichen Adaptoren bilden, um exponentiell über PCR amplifiziert zu werden.

Die erste Hybridisierung erfolgte für 10 Stunden. In der zweiten Hybridisierung wurden die beiden Tester und frischer Treiber zusammengefügt und für 12 Stunden inkubiert. Bei den beiden Hybridisierungen ist zu beachten, dass die erste Hybridisierung nie mehr als 12 Std. überschreiten sollte, da die Einzelstrang Tester-Moleküle bevorzugt mit sich selbst hybridisieren. Somit können sie nicht mehr bei der anschließenden zweiten Hybridisierung Doppelstranghybride bilden (Diatschenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996). Ausserdem sollte die zweite Hybridisierung stets länger als die erste Hybridisierung dauern, um garantieren zu können, dass genügende Doppelstranghybride gebildet worden sind (Diatschenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996).

Zur Anreicherung Lymphknotenmetastasen spezifischer Gene wurden cDNA aus mikrodissektierten Melanomzellen aus Lymphknotenmetastasen als Tester und cDNA aus mikrodissektierten Melanomzellen aus Primärmelanomen als Treiber benutzt. Hingegen wurden für die Anreicherung Primärmelanom spezifischer Gene Treiber und Tester in einem zweiten Ansatz ausgetauscht.

Anschliessend erfolgte die PCR-Amplifikation über Adaptor-spezifische Primer zur exponentiellen Anreicherung der cDNA's. Durch die Suppressions-PCR wurde die Amplifizierung der häufig differentiellen Transkripte supprimiert, so dass eine Angleichung an seltene differentiellen Transkripte stattfinden konnte. Von den PCR Produkten wurden je 8µl unsubtrahierte und subtrahierte Probe auf einem 2%-igen TAE Agarosegel aufgetragen, um die Reaktion zu überprüfen (Abb. 19).

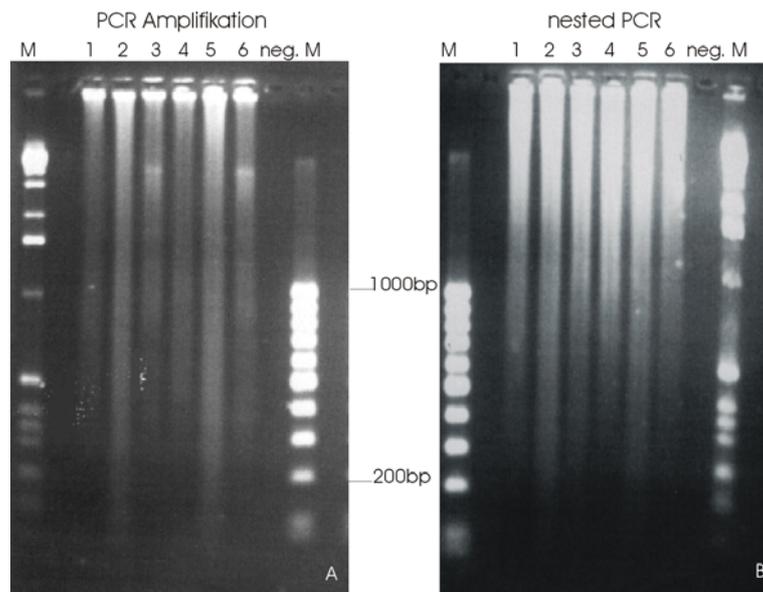


Abb. 19: Anreicherung der differentiellen cDNA's. M = Marker (1kb, 100bp, MBI Fermentas), neg. = Negativ Kontrolle. In Bild A ist die erste PCR Amplifikation und in Bild B die nested PCR mit Adaptor spezifischen Primern nach der Subtraktion dargestellt. Spur 1 zeigt die unsubtrahierte Primärmelanom cDNA, Spur 2 die unsubtrahierte Lymphknotenmetastasen cDNA und Spur 3 die unsubtrahierte Positiv Kontrolle (Skelettmuskel). Spur 4 enthält die subtrahierte Primärmelanom cDNA, Spur 5 die subtrahierte Lymphknotenmetastasen cDNA und Spur 6 die subtrahierte Skelettmuskel cDNA.

Eine Überprüfung der Effizienz der Subtraktion erfolgte, indem die Häufigkeit spezifischer cDNA's vor und nach der Subtraktion ermittelt wurde. Hierzu wurden spezifische semiquantitative PCR's für GAPDH und Tyrosinase mit subtrahierter und unsubtrahierter cDNA durchgeführt (siehe Abb. 20 und Abb. 21). Für die PCR Amplifikationen vor und nach der Subtraktion sind jeweils unterschiedliche Zyklenzahlen erforderlich, um gleiche Bandenintensitäten auf einem 2%-igen TAE Agarogel zu erreichen. Eine Differenz von 5 Zyklen entspricht ca. einer 20-fachen Anreicherung bzw. Reduzierung (Diatschenko *et al.*, 1996). Für die PCR's wurden unsubtrahierte und subtrahierte nested PCR Produkte im Wechsel aufgetragen. Zu erwarten war, dass GAPDH als ubiquitär exprimiertes Transkript nach der Subtraktion reduziert vorliegt.

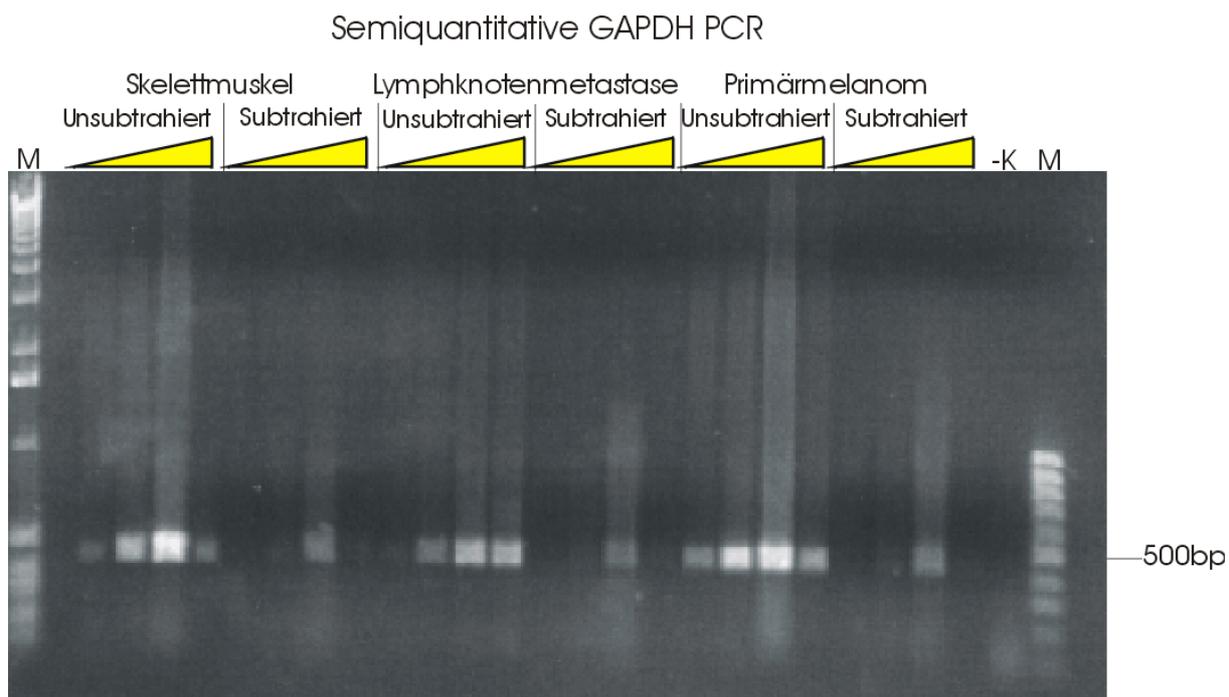


Abb. 20: Subtraktionseffizienztest mittels semiquantitativer GAPDH PCR. -K = Negativ Kontrolle, M = Marker (1kb und 100bp, MBI Fermentas). Nach jeweils 18, 23, 28 und 33 Zyklen (zunehmende Dreiecke) wurden je 5 μ l unsubtrahierte bzw. subtrahierte Probe entnommen und auf einem 2%-igen TAE Agarosegel aufgetragen. Die Grösse der PCR Produkte ist in Basenpaaren angegeben.

Es ist zu sehen, dass nach der Subtraktion sowohl bei der Positiv-Kontrolle als auch bei Lymphknotenmetastasen- und Primärmelanom- cDNA's als Tester das Haushaltsgen GAPDH reduziert vorliegt. Dabei lag die Differenz bei allen cDNA's bei ca. 13 Zyklen.

In Abb. 21 ist das Ergebnis der nested Tyrosinase PCR aufgezeigt. Bei der Tyrosinase-PCR wurden im Wechsel die nested PCR-Proben der unsubtrahierten bzw. subtrahierten cDNA aufgetragen.

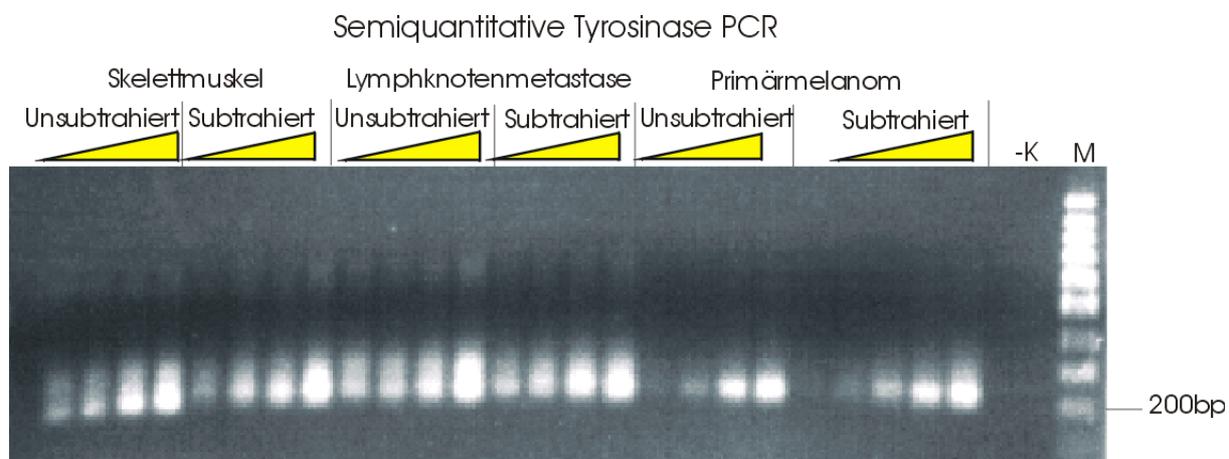


Abb. 21: Subtraktionseffizienztest mittels semiquantitativer Tyrosinase PCR. -K = Negativ Kontrolle, M = Marker (1kb und 100bp, MBI Fermentas). Nach jeweils 20, 25, 30 und 35 Zyklen (zunehmende Dreiecke) wurden je 5 μ l unsubtrahierte bzw. subtrahierte Probe entnommen und auf einem 2%-igen TAE Agarosegel aufgetragen. Die Grösse der PCR Produkte ist in Basenpaaren angegeben.

Es ist zu erkennen, dass Tyrosinase nach der Subtraktion mit Lymphknotenmetastasen als Tester und Primärmelanom als Treiber nicht angereichert wurde, während nach der Subtraktion mit Primärmelanom als Tester und Lymphknotenmetastase als Treiber Tyrosinase angereichert wurde. Dabei wurde Tyrosinase durch die Subtraktion mit Primärmelanom als Tester mit einer Differenz von ca. 8 Zyklen angereichert. Erstaunlich war, dass die Positiv Kontrolle (Skelettmuskel) bei der Tyrosinase PCR Banden ergab. Erwartet wurde eher eine Anreicherung von Tyrosinase-Transkript, wenn Lymphknotenmetastasen als Tester verwendet wurde, da bereits gezeigt wurde, dass die Tyrosinase Expression mit der Melanomprogression abnimmt (de Vries *et al.*, 2001). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Subtraktion bei beiden erfolgreich gewesen ist.

III. 4.2 Analyse der Subtraktionsbanken mittels Kolonie-PCR

Nach der Überprüfung der Effizienz der Subtraktion mit Lymphknotenmetastasen- bzw. Primärtumor als Tester wurden die subtrahierten nested PCR-Produkte in einen geeigneten T/A Vektor kloniert und in kompetente Bakterien transformiert und ausplattiert. Dabei erwies sich die Klonierung in den pCR 2.1 Vektor erfolgreicher als in den Bluescript Vektor SKII. Insgesamt wurden je 320 Bakterienklone aus den subtrahierten Lymphknotenmetastasen- und Primärmelanomen cDNA Banken als Tester gepickt, um sie anschliessend über Kolonie PCR zu amplifizieren. Dabei diente die Kolonie PCR der Anreicherung der klonierten cDNA's über die an den Adaptoren ansetzenden Primer. In Abb. 22 ist exemplarisch eine Kolonie-PCR einiger Lymphknotenmetastasen Klone aufgezeigt.

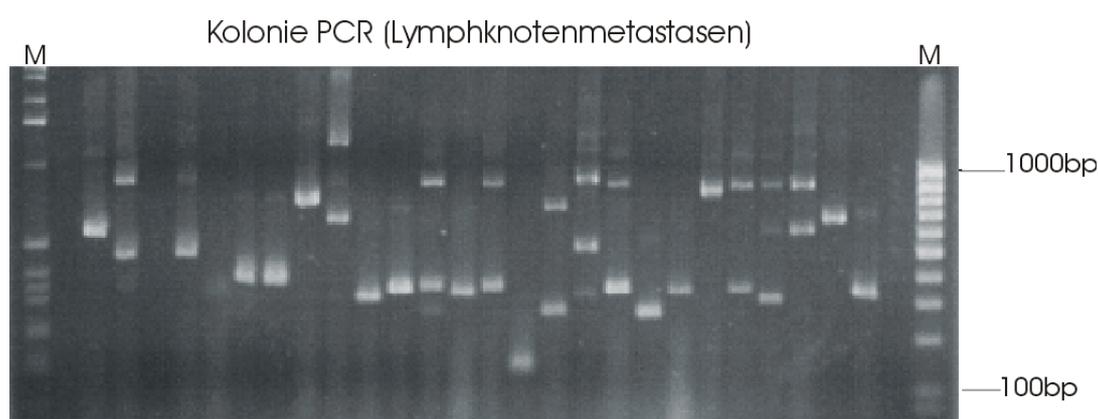


Abb. 22: Über Kolonie PCR amplifizierte Inserts der Lymphknotenmetastasen Subtraktions cDNA Bank.
M = Marker (100bp, MBI Fermentas; Erläuterungen siehe Text).

Es ist zu erkennen, dass bei den einzelnen angereicherten und klonierten Lymphknotenmetastasen cDNA's die Insertgrößen sehr variabel sind, dabei lagen die Größen in der Regel zwischen 100-1000 Basenpaaren.

Waren mehrere Banden zu sehen, so war das darauf zurückzuführen, dass die gepickte Kolonie nicht nur aus einem, sondern aus zwei oder mehreren Klonen bestand. Der hohe Anteil an verschiedenen grossen Transkripten bei den Lymphknotenmetastasenklonen könnte darauf hinweisen, dass viele Gene bei der Metastasierung aktiviert sein könnten.

In Abbildung 23 ist das Ergebnis der Kolonie-PCR der gepickten Primärmelanomklone dargestellt.

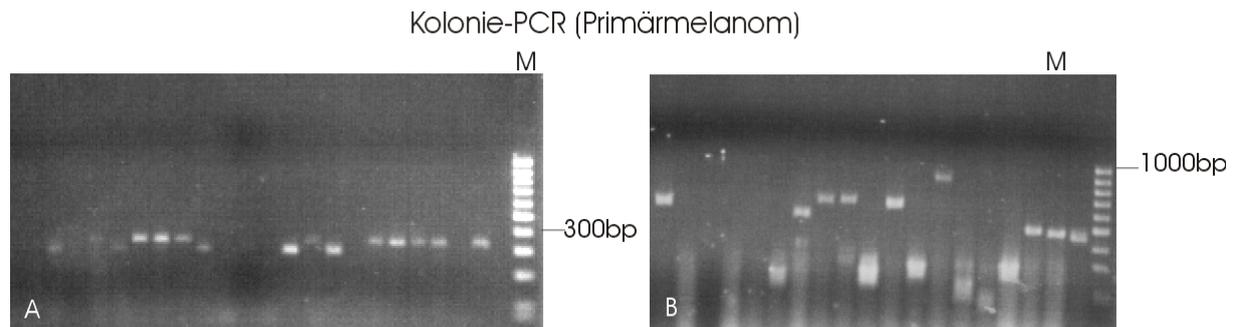


Abb. 23: Über Kolonie PCR amplifizierte Inserts der Melanom Subtraktions cDNA Bank. M = Marker (100bp, MBI Fermentas; Erläuterungen siehe Text).

Es ist zu sehen, dass die Grösse der differentiell exprimierten Transkripte in Primärmelanomzellen im Vergleich zu denen in Metastasenzellen fast alle im selben Bereich lagen waren. Die Insertgrössen lagen dabei in der Regel zwischen 200-300 Basenpaaren (Abb. 23 A), lediglich wenige Klone zeigten wie in Abb. 23 A und B dargestellt abweichende Insertgrössen. Dies könnte darauf hindeuten, dass keine grosse Heterogenität in der Primärmelanom cDNA Bank vorhanden war. Ausserdem könnte die eingesetzte RNA und/oder cDNA der Primärmelanomen in ihrer Qualität schlechter gewesen sein als die der Lymphknotenmetastasen. Schliesslich könnte es auch sein, dass im Primärmelanom weniger Gene überexprimiert vorliegen als in der Lymphknotenmetastase.

III. 4.3 Screening der Subtraktionsbanken mittels cDNA Arrays

III.4.3.1 Hybridisierungen mit den Subtraktionssonden

Anschliessend wurden die einzelnen Klone der Lymphknotenmetastasen- bzw. Primärmelanom Subtraktions-Bank einem doppelten Screeningverfahren mittels Arrays unterworfen, um festzustellen, welche der klonierten Transkripte differentiell exprimiert werden.

Als erstes wurden in einem Vorscreening die Arrays mit Lymphknotenmetastasen- bzw. Primärmelanom Subtraktionssonden hybridisiert.

Die Subtraktionssonden wurden dabei aus den nested PCR Produkten der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung (Primärmelanomsonde aus der Hybridisierung mit Primärmelanom cDNA als Tester bzw. Lymphknotenmetastasen sonde aus der Hybridisierung mit Lymphknotenmetastase cDNA als Tester) hergestellt (siehe II.3.7). In Abb. 24 wird gezeigt, wie die Auswertung der einzelnen Signale erfolgt ist.

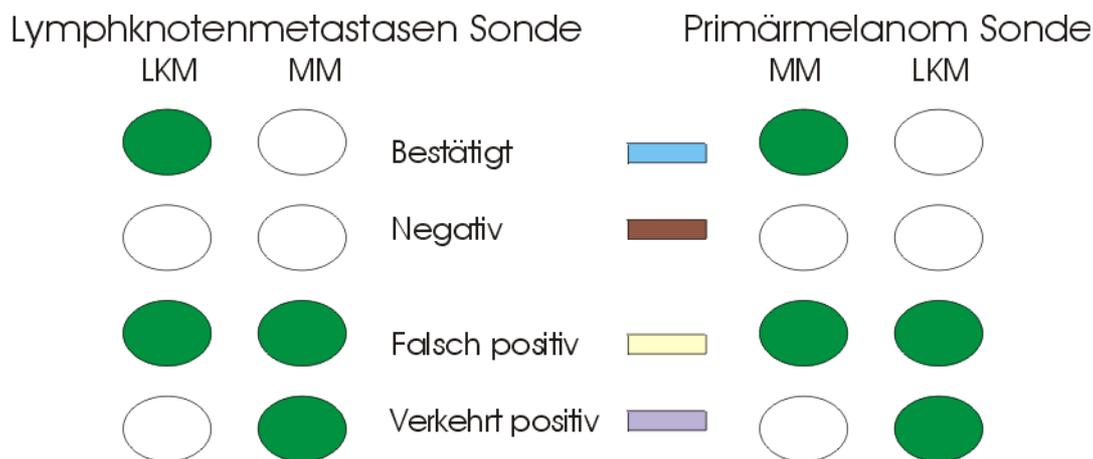


Abb. 24: Übersicht der Auswertung bei der Array Hybridisierung. LKM = Lymphknotenmetastasen spezifische Klone, MM = Primärmelanom spezifische Klone (weitere Erklärungen im Text).

Wie in Abb. 24 dargestellt ist, wurden Klone, die mit beiden Subtraktionssonden ein Signal zeigten, als falsch positive Klone bezeichnet und anschliessend ausselektiert. Klone, die mit beiden amplifizierten Subtraktionssonden kein Signal zeigten, sind negative Klone und wurden ebenfalls ausselektiert. Falls z.B. ein Melanomklon nur mit der Melanom spezifischen Subtraktionssonde ein Signal ergibt, so ist dieser ein bestätigt differentieller Klon. Falls der Klon hingegen nur mit der Lymphknotenmetastasen Sonde ein Signal zeigt, wird er als ein verkehrt positiver Klon gewertet.

Für das Vorscreening wurden von den 320 über Kolonie-PCR amplifizierten Klone 267 amplifizierte Inserts der Lymphknotenmetastasen spezifischen bzw. 138 amplifizierte Inserts der Primärmelanom spezifischen Subtraktions cDNA Bank mit den Subtraktionssonden hybridisiert. Hierzu wurden je 60 amplifizierte Inserts auf eine Nylonmembran aufgetropft, fixiert und mit den Subtraktionssonden hybridisiert (Abb. 25).

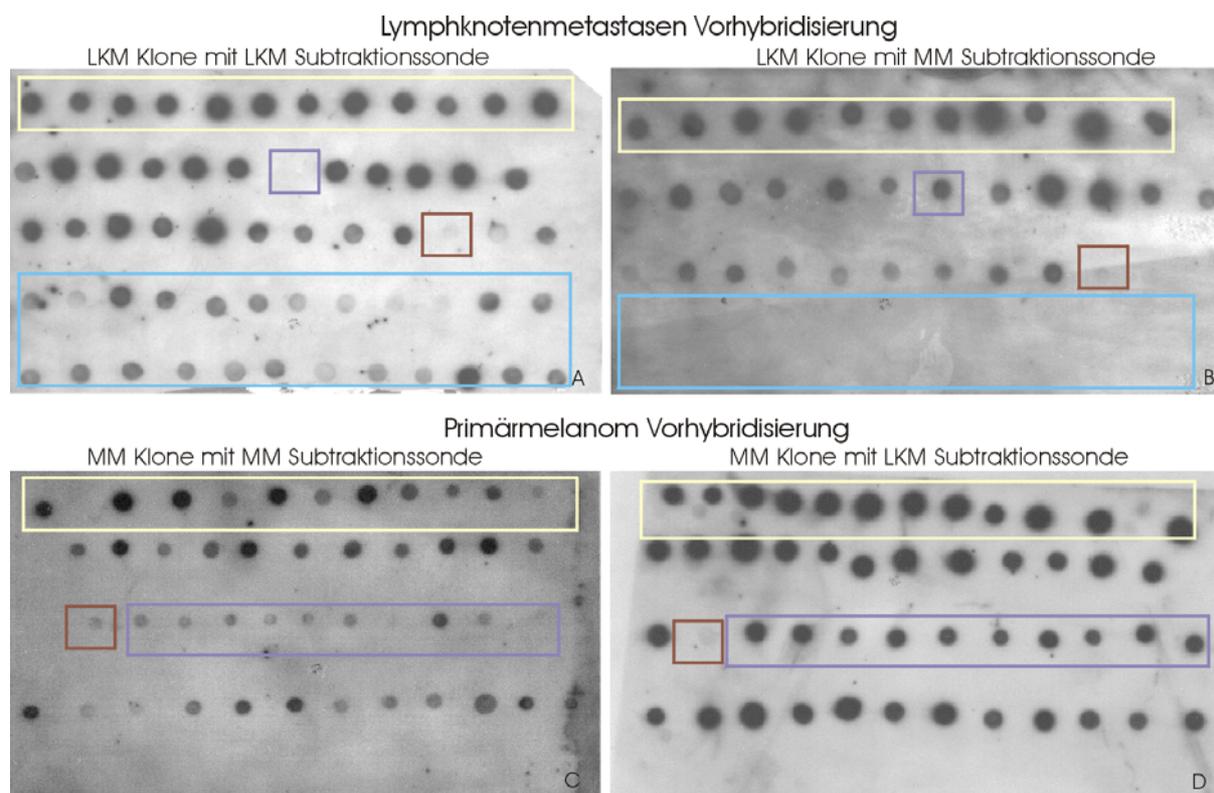


Abb. 25: Exemplarischer cDNA Arrays der Hybridisierung der Lymphknotenmetastasen bzw. Primärmelanomklonen mit den Subtraktionssonden. In Bild A sind 60 amplifizierte Inserts der Lymphknotenmetastasen spezifischen Subtraktions cDNA Bank (LKM Klone) mit einer Lymphknotenmetastasen Subtraktionssonde (LKM) hybridisiert. In Bild B sind dieselben Inserts auf die entsprechenden Positionen aufgetropft und mit einer Primärmelanom spezifischen Subtraktionssonde (MM) hybridisiert. In Bild C sind 60 amplifizierte Transkripte der Primärmelanom spezifischen Subtraktions cDNA Bank (MM Klone) aufgetropft und mit einer Primärmelanom spezifischen (MM) Subtraktionssonde hybridisiert. In Bild D sind dieselben Inserts auf die entsprechenden Positionen aufgetropft und mit einer Lymphknotenmetastasen spezifischen Subtraktionssonde (LKM) hybridisiert. Der gelbe Kasten zeigt exemplarisch falsch positive Klone, der lila Kasten verkehrt positive Klone, der rote Kasten negative Klone und der blaue Kasten die bestätigt differentiellen Klone.

Aus Abbildung 25 ist zu erkennen, dass der Anteil an falsch positiven Klone bei der Vorhybridisierung der Lymphknotenmetastasen spezifischen amplifizierten Inserts mit den Subtraktionssonden sehr hoch ausgefallen ist. Ein ähnliches Bild konnte bei den Primärmelanom spezifischen Inserts gezeigt werden. Auch hier ist bei der Hybridisierung mit den Subtraktionssonden ein hoher Anteil falsch positiver Klone bzw. verkehrt positiver Klone zu sehen. Der Anteil an bestätigt differentiellen Klone war hierbei sehr gering.

In Abb. 26 ist das Ergebnis des Vorscreenings mit den Subtraktionssonden zusammengefasst. Von den insgesamt je 320 getesteten Klonen konnten 267 Lymphknotenmetastasen Klone und 138 Melanom Klone über Kolonie PCR amplifiziert werden.

Vorscreening mit den Subtraktionssonden

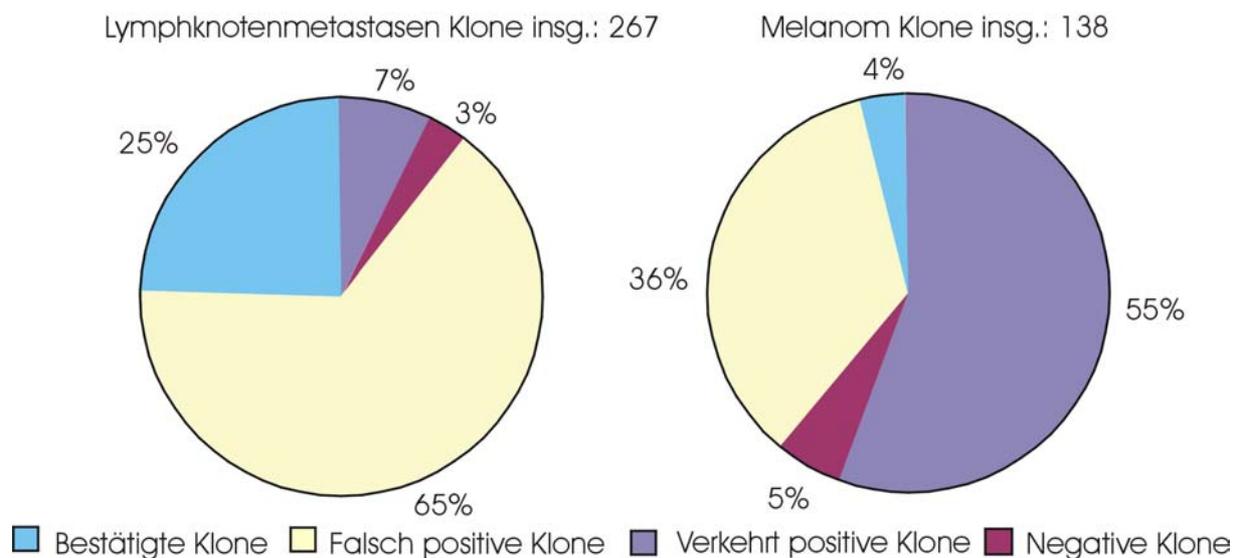


Abb. 26: Ergebnis des Vorscreenings mit den Subtraktionssonden. Anzahl der unterschiedlich aufgetretenen Klone ist in Prozent angegeben. 100% entspricht der Gesamtzahl der eingesetzten Klone, d.h. bei den Lymphknotenmetastasen wurden insgesamt 267 Klone und bei den Primärmelanomen 138 Klone für der Hybridisierung eingesetzt.

Von den 267 Lymphknotenmetastasen Klonen erwiesen sich 25% als bestätigt differentiell, 7% als verkehrt positiv und 3% als negativ. Der höchste Anteil mit 65% waren falsch positive Klone. Von den 138 über Kolonie PCR amplifizierten Melanom Klonen erwiesen sich lediglich 4% als bestätigt differentiell, 5% als negativ, 36% als falsch positive Klone und 55% der Klone waren verkehrt positive Klone. Die genaue Anzahl der gewonnen Klone beim Vorscreening mit den Subtraktionssonden wird in Tabelle 4 dargestellt.

	Lymphknotenmetastasen-spezifische Klone	Primärmelanom-spezifische Klone
Anzahl der Klone insgesamt	267	138
Anzahl der falsch positiven Klone	173	48
Anzahl der verkehrt positiven Klone	20	77
Anzahl der negativen Klone	9	7
Anzahl der differentiellen Klone	67	6

Tabelle 4: Ergebnis des Screenings mit den Subtraktionssonden. Von den insgesamt 267 eingesetzten Lymphknotenmetastasen Inserts erwiesen sich 67 als differentiell, 173 als falsch positiv, 20 als verkehrt positiv und 9 als negativ. Von den insgesamt 138 Primärmelanom Inserts erwiesen sich 6 als differentiell, 48 als falsch positiv, 77 als verkehrt positiv und 6 als negativ.

Die differentiellen Klone wurden anschliessend auf ihre differentielle Genexpression mit einer weiteren Hybridisierung mit Lymphknotenmetastasen- bzw. Primärmelanom cDNA Sonden überprüft (siehe II.3.7). Die Hybridisierung dieser Klone mit den cDNA-Sonden wurde vor allem deshalb durchgeführt, um festzustellen, ob die Klone bei der Hybridisierung mit den cDNA-Sonden noch immer falsch positiv erscheinen würden, oder ob es sich bei diesem Ergebnis um ein Artefakt der Subtraktionssonde handelt.

Da sich bei den klonierten cDNA's der Melanomklone nur 6 Klone nach dem Vorscreening als bestätigt differentiell erwiesen, wurden für die weitere Überprüfung der differentiellen Genexpression falsch positive- und verkehrt positive Klone der Primärmelanomklone für die Hybridisierung mit den cDNA Sonden verwendet. Hierfür wurden die gesamten 77 verkehrt positiven- und 39 der falsch positiven Primärmelanomklone verwendet. Auch bei den Lymphknotenmetastasenklone wurden 9 falsch positive Klone für die weitere Überprüfung einer möglichen differentiellen Genexpression eingesetzt.

III.4.3.2 Hybridisierungen mit cDNA-Sonden

Die Hybridisierung mit cDNA-Sonden diente der Bestätigung der differentiellen Transkripte und der weiteren Eliminierung nicht differentieller Klone. Das Screening mit der cDNA-Sonde ist aussagekräftiger als das Subtraktionssonden Screening, bei dem die PCR-Produkte mit ihresgleichen, den subtrahierten Amplifikaten, hybridisiert wurden. Somit dient nach Wang *et al.*, 1991 die Hybridisierung mit den Subtraktionssonden nur für eine Vorselektion der Klone. Die Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde spiegelt die Stärke des Signals die Expressionshäufigkeit des Transkripts im Ausgangsgewebe wieder.

Zuerst wurden cDNA-Sonden hergestellt. Dazu wurden erneut aus demselben Ausgangsgewebe über SMART-PCR Primärmelanom cDNA's bzw. Lymphknotenmetastasen cDNA's generiert, gepoolt, aufgereinigt und einer DIG Markierung unterworfen (siehe II.3.7.1). Für dieses zweite Screening wurden 67 Klone, die aus dem Vorscreening der Lymphknotenmetastasen als differentiell bestätigt wurden und 9 falsch positive Klone verwendet, während 6 Klone, die sich aus dem Vorscreening der Primärmelanome als differentiell bestätigt hatten, 77 verkehrt positive und 39 der falsch positive Klone verwendet wurden.

Die PCR-Amplifikate der Inserts wurden wie unter II.3.7.1 beschrieben auf eine Nylonmembran aufgetragen, fixiert und anschliessend mit den Lymphknotenmetastasen spezifischen und Primärmelanom spezifischen cDNA-Sonden hybridisiert (Abb. 27).

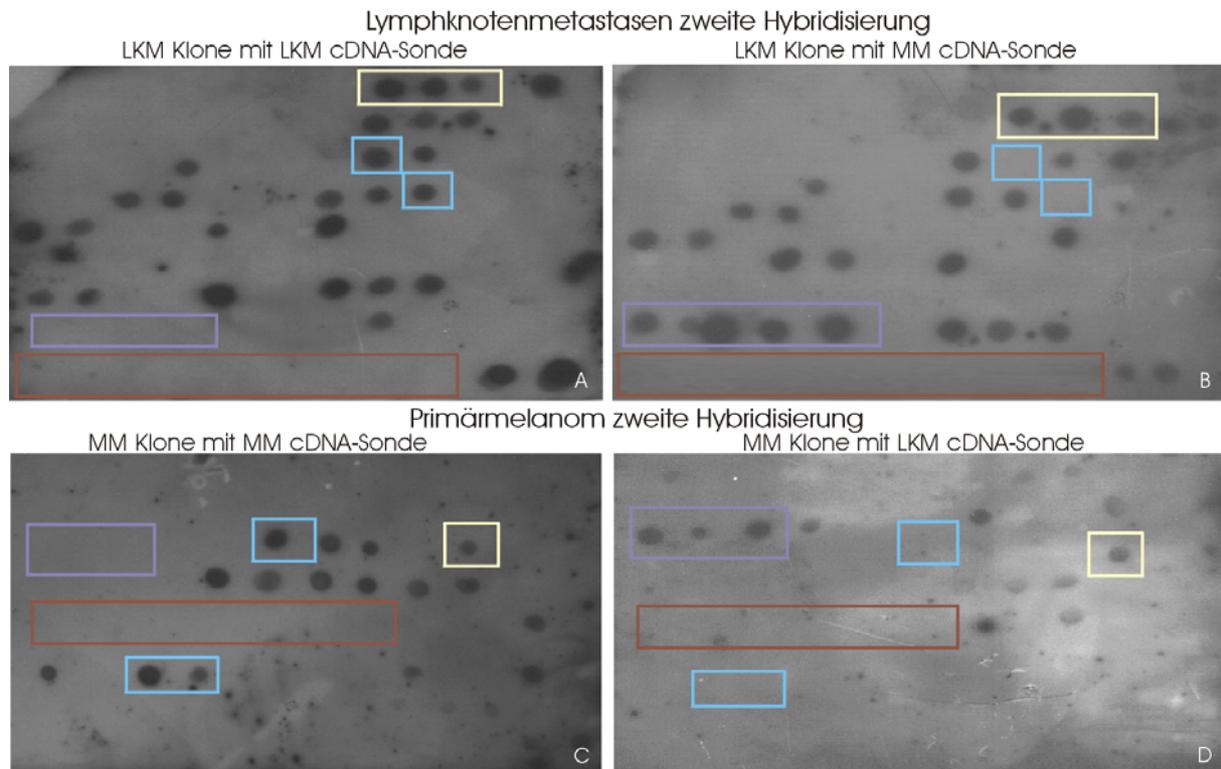


Abb. 27: cDNA Arrays der Hybridisierung der Lymphknotenklone bzw. Primärmelanomklone mit den cDNA-Sonden. In Bild A sind 60 amplifizierte Transkripte der Lymphknotenmetastasen spezifischen Subtraktions cDNA Bank (LKM Klone) mit einer Lymphknotenmetastasen cDNA-Sonde (LKM) hybridisiert. In Bild B sind dieselben Inserts auf die entsprechende Positionen aufgetropft und mit einer Primärmelanom spezifischen cDNA-Sonde (MM) hybridisiert. In Bild C sind 60 amplifizierte Inserts der Primärmelanom spezifischen Subtraktions cDNA Bank (MM Klone) aufgetropft und mit einer Primärmelanom spezifischen (MM) cDNA-Sonde hybridisiert. In Bild D sind dieselben Inserts auf die entsprechende Positionen aufgetropft und mit einer Lymphknotenmetastasen spezifischen cDNA-Sonde (LKM) hybridisiert. Der gelbe Kasten zeigt falsch positive Klone, der lila Kasten verkehrt positive Klone, der rote Kasten negative Klone und der blaue Kasten die bestätigt differentiellen Klone.

Die Auswertung der einzelnen Spots erfolgte wie bereits bei den Subtraktionssonden beschrieben. Aus Abbildung 27 ist zu erkennen, dass der Anteil an negativen Klone bei der zweiten Hybridisierung der Lymphknotenmetastasen- und der Primärmelanom spezifischen amplifizierten Inserts mit den cDNA-Sonden sehr hoch ausgefallen ist. In Abb. 28 ist das Ergebnis des zweiten Screenings mit den cDNA-Sonden zusammengefasst.

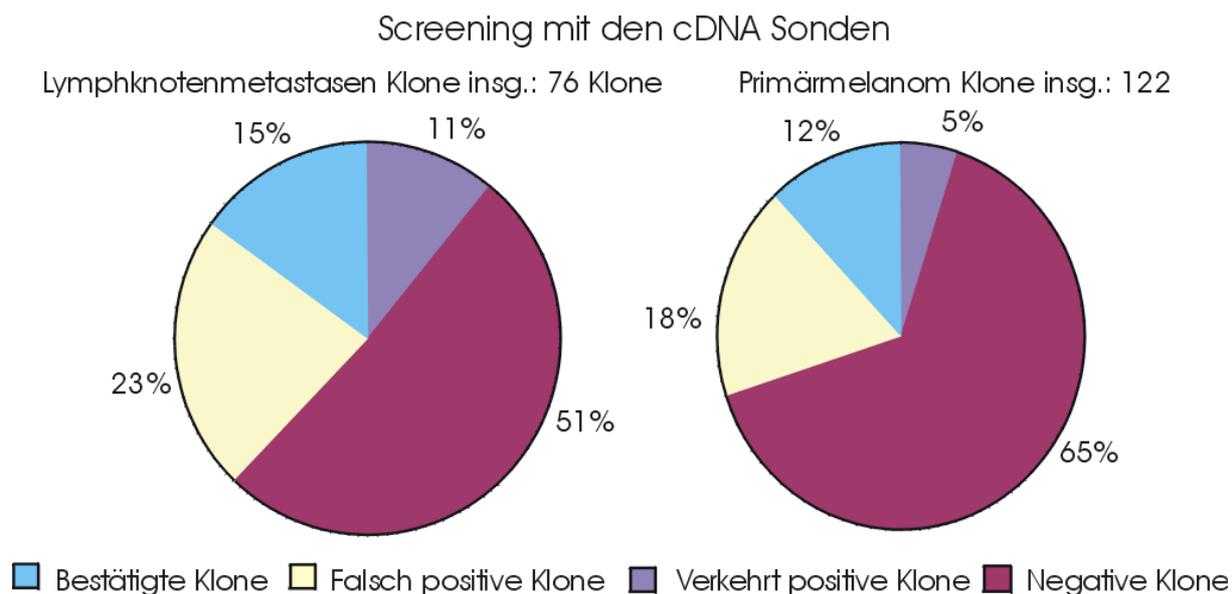


Abb. 28: Ergebnis des zweiten Screenings mit den cDNA-Sonden. Anzahl der unterschiedlichen aufgetretenen Klone ist in Prozent angegeben. 100% entspricht der Gesamtzahl der eingesetzten Klone, d.h. bei den Lymphknotenmetastasen wurden insgesamt 76 Klone und bei den Primärmelanomen 122 Klone eingesetzt.

51% bzw. 65% der Klone erwiesen sich bei der Hybridisierung mit den cDNA Sonden als negative Klone. Bei den Lymphknotenmetastasen erwiesen sich 15% der Klone als differentiell bestätigt, während beim Primärmelanom 12% differentiell bestätigt wurden. 23% bzw. 18% waren falsch positive und 11% bzw. 5% waren verkehrt positive Klone. Der hohe Anteil an negativen Klonen und falsch positiven Klonen führt zu der Vermutung, dass die Dot-Blot Screeningmethode nicht sensitiv genug ist. Es ist möglich, dass mit diesem Screening Verfahren diese Klone nicht detektiert werden konnten, da die entsprechenden cDNA's seltene Transkripte repräsentieren, die im Rahmen der Suppressions-PCR effizient amplifiziert wurden.

Die genaue Anzahl der gewonnenen Klone beim zweiten Screening mit den cDNA-Sonden wird in der nächsten Tabelle 5 dargestellt.

	Lymphknotenmetastasen-spezifische Klone	Primärmelanom-spezifische Klone
Anzahl der getesteten Klone insgesamt	76	122
Anzahl der falsch positiven Klone	17	22
Anzahl der verkehrt positiven Klone	9	6
Anzahl der negativen Klone	39	79
Anzahl der differentiellen Klone	11	15

Tabelle 5: Ergebnis des Screenings mit den cDNA-Sonden. Von den insgesamt 76 eingesetzten Lymphknotenmetastasen cDNA's erwiesen sich 11 als differentiell, 17 als falsch positiv, 9 als verkehrt positiv und 3 als negativ. Während von den insgesamt 122 Primärmelanom Inserts erwiesen sich 15 als differentiell, 22 als falsch positiv, 6 als verkehrt positiv und 79 als negativ.

Für die Beurteilung der Transkripte bezüglich ihrer Beteiligung an der Progression des malignen Melanoms wurde als nächster Schritt die Sequenzierung der differentiellen Klone durchgeführt.

III.5 Sequenzierung der differentiellen Transkripte

Es wurde die mit den cDNA Sonden bestätigten 11 Lymphknotenmetastasen spezifische und 15 Klone der Melanom spezifischen cDNA Bank sequenziert. Ausserdem wurden 23 Klone sequenziert, die sich mit den Lymphknotenmetastasen Subtraktionssonden als differentiell bestätigt erwiesen haben.

In Abb. 29 sind Dot Blots von 10 Klonen aus der Lymphknotenmetastasen spezifischen Subtraktionsbank, die über Sequenzierung und Homologievergleiche in den Genbanken identifiziert worden sind, gezeigt.

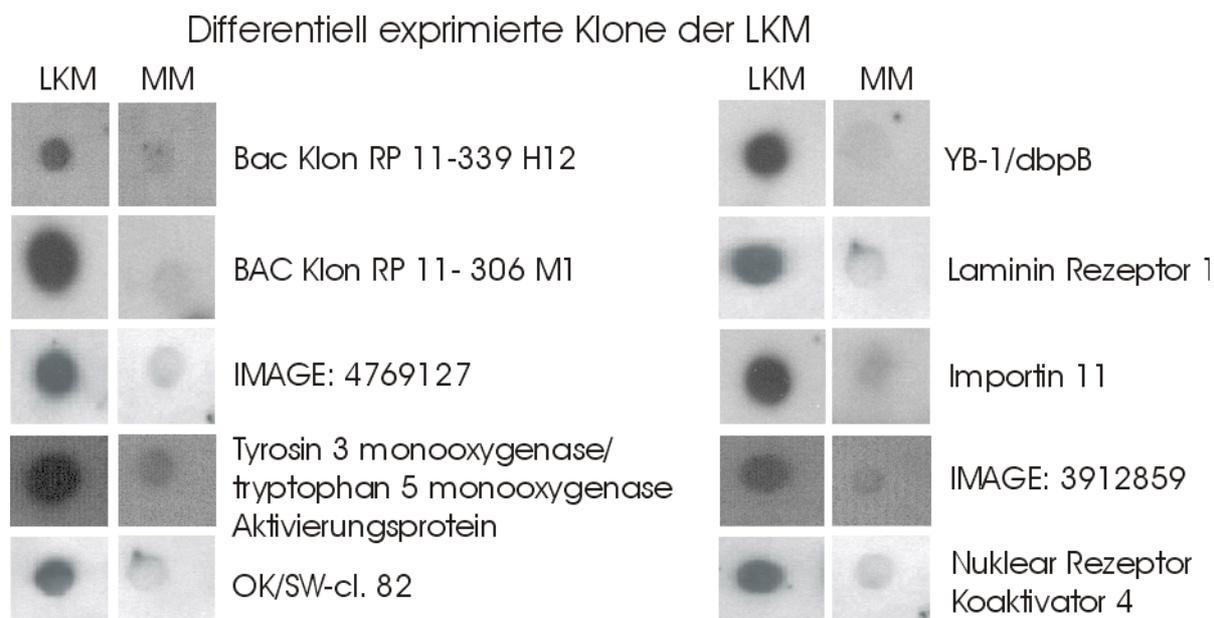


Abb. 29: Exemplarische Dot Blots der identifizierten differentiellen Klone. LKM = Lymphknotenmetastasen, MM = Primärmelanom. Dargestellt sind Signale aus der Array Hybridisierung mit der Lymphknotenmetastasen Sonde (LKM) im Vergleich zu den Signalen aus der Hybridisierung mit der Primärmelanom Sonde (MM). Die bestätigten differentiellen Klone werden sequenziert und über die Genbank identifiziert.

Die isolierten Gene werden in Tabelle 6 nach ihrer Funktion/Vorkommen zusammengefasst.

Funktion/Vorkommen	Isolierte Gene
➤ Mitochondriale Proteine	NADH Dehydrogenase 4, Cytochrom C oxidase, isolate mitochondrium 183 und 526
➤ Ribosomale Proteine	L7, L21 und OK SW-cl.82
➤ Transportproteine	Importin 11
➤ Translation	Eukaryotischer Elongationsfaktor 1 alpha und Capping Protein
➤ Transkription	YB-1 und Nuklear Rezeptor Koaktivator 4
➤ Signaltransduktion	Tyrosinase 3 monooxygenase 5 tryptophan monooxygenase (14-3-3 theta)
➤ Zelladhäsion	67kDa Laminin Rezeptor 1
➤ Unbekannt	IMAGE: Klone: 3912859, 3952593 und 4769127 Bac Klone: RP 11-306 M1 und RP 11-339 H12

Tabelle 6: Allgemeine Darstellung der identifizierten Gene. Die isolierten Gene sind nach ihrer Funktion bzw. Vorkommen aufgelistet.

Auffällig war, dass eine Reihe von Genen isoliert wurden, die im Metabolismus der Zellen eine Rolle spielen. Da in der Metastase der Stoffwechsel angeregt ist, war das Vorhandensein dieser Gene zu erwarten. Zusätzlich sind einige bislang auf ihre Funktion unbekannte Gene gefunden wurden wie beispielsweise IMAGE Klon 3952593, 3912859 und 4769127. Zudem sind keine Daten über die Funktion von OK/SW-cl.82 mRNA, Bac Klon RP 11-306 M1 und Bac Klon RP 11-339 H12 beschrieben. Zusätzlich sind Gene gefunden wurden, die eine Rolle bei der Metastasierung spielen wie beispielsweise der YB-1 Transkriptionsfaktor und der Laminin Rezeptor 1. Die Gene IMAGE: 3912859, IMAGE: 4769127, Bac Klon RP 11-306 M1, Bac Klon RP 11-339 H12, Importin11 und der Laminin Rezeptor 1 wurden für weitere Analysen mittels Northern Blots ausgewählt, um die differentielle Genexpression zu verifizieren. Somit kann festgestellt werden, wie sich die Expression während der malignen Transformation von normaler Haut über benigne Nävi zu Primärmelanomen, Lymph- und Hautmetastasen verändert.

In der Tabelle 7 erfolgt eine detaillierte Auflistung aller Lymphknotenmetastasen spezifischen Gene nach ihrem Expressionsprofil, der isolierten Insertgrösse, Homologie und, wenn bekannt, nach ihrer Funktion.

Leider sind keine Sequenzdaten zu den Primärmelanom Klonen vorhanden. Entscheidende Parameter, welche die Sequenzierung beeinträchtigen könnten, werden im Diskussionsabschnitt näher erläutert.

Tabelle 7: Überexprimierte Gene in der Lymphknotenmetastase

Differentielles Genprodukt	Insertgrößen	Homologie (bp)	Expressionsmuster	Funktion	Referenz
Tyrosin 3 monooxygenase/ tryptophan 5 monooxygenase Aktivierungsprotein (14-3-3 theta, YWHAQ) 2166 bp	400 bp	282/289 (97%)	- Gehirn, Epithelzellen, die 14-3-3 theta-Expression steigt mit der epithelialen Differenzierung an - ist in einer chemoresistenten Mewo-Zelllinie überexprimiert	- gehört zur 14-3-3 Proteinfamilie: aktivieren Tyrosin- und Tryptophan- Hydroxylasen und inhibieren Protein Kinase C - Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle - Protein weist Chaperonaktivität auf	Watanabe <i>et al.</i> , 1994, Chaudhary <i>et al.</i> , 2000, Hermeking <i>et al.</i> , 2003 Yaffe <i>et al.</i> , 1997, Sinha <i>et al.</i> , 2000 Zimmermann <i>et al.</i> , 2000
Importin 11 1420 bp	480 bp	201/228 (88%)	- Testis, embryonale Karzinome	- Transportprotein: koordiniert den 60S Ribosomentransport - UbCM2 Translokation in den Nukleus über Importin 11	Scott <i>et al.</i> , 2000
Capping protein muscle Z-line alpha 1 (CAPZA1) 1706 bp	580 bp 550 bp	253/263 (96%) 485/502 (96%)	- Gehirn, Plazenta, Skelettmuskel, Erythrozyten	- Translation - reguliert das Wachstum der Aktinfilamente, Zellbewegung	Hutchings <i>et al.</i> , 2003, Barron-Casella <i>et al.</i> , 1994, Hart <i>et al.</i> , 1997

Differentielles Genprodukt	Insertgrößen	Homologie (bp)	Expressionsmuster	Funktion	Referenz
Ribosomen Protein L21	500 bp	326/328 (98%)	- Muskel, Rhabdomyosarcom, 60S- und 80S-Ribosomen-Komplex, Colon, Leber, Uterus, Retina Skelettmuskel und Eierstöcke	- a) bei der Cap abhängigen Translation beteiligt an: GTP Hydrolyse, Bindung der 60S UE an den Translationinitiationskomplex, Freilassung der 40S- und 60S- UE aus dem 80S Ribosom - b) bei der Cap unabhängigen Translation beteiligt an: Abkopplung der tRNA Polypeptidkette und Bildung neuer Peptidbindungen	Petter <i>et al.</i> , 1994, Frigerio <i>et al.</i> , 1995, Kenmochi <i>et al.</i> , 1998 Bortoluzzi <i>et al.</i> , 2001 Petter <i>et al.</i> , 1994
	300 bp	224/226 (99%)			
568 bp					
Cytochrome C oxidase I (MTCOI)	600 bp	461/467 (98%)	- Mitochondrien, Prostata, Niere, Skelettmuskel Herz,	- Bestandteil des Atmungskettenkomplex 4 (im Mitochondrium-lumen) - Elektronentransport	Kadenbach <i>et al.</i> , 1983, Shoffner and Wallace <i>et al.</i> , 1995 Holthofer <i>et al.</i> , 1999, Huang <i>et al.</i> , 1999, Williams <i>et al.</i> , 2004
	650 bp	461/464 (99%)			
	900 bp	450/455 (98%)			

Differentielles Genprodukt	Insertgrößen	Homologie (bp)	Expressionsmuster	Funktion	Referenz
isolate 183 mitochondrion 16568 bp	280 bp	218/231 (94%)	- Mitochondrien	- Citratzyklus, Fettsäureoxidation	Mishmar <i>et al.</i> , 2003
	850 bp	434/442 (98%)			
	650 bp	55/61 (90%)			
isolate 526 mitochondrion 16573 bp	570 bp	297/315 (94%)	- Mitochondrien	- Citratzyklus, Fettsäureoxidation	Mishmar <i>et al.</i> , 2003
NADH Dehydrogenase 4 (MTND4) 1668 bp	800 bp	446/485 (91%)	- Mitochondrien	- Elektronentransport - Atmungskette I	Anderson <i>et al.</i> , 1981, Oliver and Wallace <i>et al.</i> , 1982, Andrews <i>et al.</i> , 1999
	550 bp	421/431 (97%)			
	470 bp	384/387 (99%)			

Differentielles Genprodukt	Insertgrößen	Homologie (bp)	Expressionsmuster	Funktion	Referenz
Immunoglobulin kappa locus 515442 bp	800 bp	398/400 (99%)	- B-Zellen	- Immunantwort	Tomlinson <i>et al.</i> , 1995
MHC Klasse Komplex II DR ALPHA 1237 bp	800 bp	178/184 (96%)	- Leukozyten, Macrophagen, Blut, B-Lymphozyten, dendritische Zellen	- Immunantwort, Antigen-Präsentierung	Lee <i>et al.</i> , 1982 Larhammar <i>et al.</i> , 1982 Abendroth <i>et al.</i> , 2000
Laminin Rezeptor 1 (67 kDa; Multidrug resistance associated protein MGr1-Ag) 1039 bp	350 bp	323/328 (98%)	- Colon-, Mamma- und Lungen-Karzinom, - Expression in Nävi, zunehmend während Melanomprogression - Protein auch in einer Melanomzelllinie gefunden - hohe Expression in metastasierenden humanen Tumoren - höhere Expression in Lungenkarzinomzelllinie als in benigner Zelllinie - hohe Expression in Ovarialtumoren (korreliert mit der Invasivität)	- Zelloberflächen- bzw. non intergrin- Protein: bindet an Laminin (Glykoprotein; Hauptkomponente der Basalmembran) und Elastin - Potentielle Rolle bei der Colonkarzinom Progression - wird durch p53 reguliert - Potentielle Rolle bei der Zelladhäsion, Zellproliferation, Zellkommunikation, Angiogenese, Tumorprogression und Metastasierung	Gehlsen <i>et al.</i> , 1989 Vacca <i>et al.</i> , 1993, Rao <i>et al.</i> , 1983, Modugno <i>et al.</i> , 2002 Satoh <i>et al.</i> , 1992, Castronovo <i>et al.</i> , 1993, van den Brule <i>et al.</i> , 1994, Montuori <i>et al.</i> , 1996, Vande Broek <i>et al.</i> , 2001, Donadlson <i>et al.</i> , 2001, Fulop <i>et al.</i> , 2002, Chen <i>et al.</i> , 2002, Asano <i>et al.</i> , 2004

Differentielles Genprodukt	Insertgrößen	Homologie (bp)	Expressionsmuster	Funktion	Referenz
Bac Klon RP 11-306 M1 140226 bp	850 bp	334/352 (94%)	- Adenokarzinom, Uterus	- unbekannt	Sanger Center 1998
Bac Klon RP 11-339 H12 215532 bp	350 bp	256/261 (98%)	- fötaler Leber und Herz, Adenokarzinom, Plattenzellkarzinom, hepatozelluläres Karzinom, Lungentumor, Haut, Milz, GCB-Zellen, Glioblastoma	- unbekannt	Sulston <i>et al.</i> , 1998
	850 bp	252/257 (98%)			
OK/SW-cl.82 mRNA 463 bp	350 bp	220/252 (87%)	- Colon Adenokarzinom	- unbekannt	Itoh <i>et al.</i> , 2001
IMAGE: 3952593 1748 bp	470 bp	384/387 (99%)	- Eierstöcke, Adenokarzinom	- unbekannt	Straussberg <i>et al.</i> , 2002
	800 bp	480/490 (97%)			
	600 bp	446/485 (91%)			
IMAGE: 3912859 2677 bp	800 bp	384/408 (94%)	- Uterus, Leiomyosarcoma, fötales Gehirn, Dünndarm	- unbekannt	Straussberg <i>et al.</i> , 2002
	780 bp	190/201 (94%)			

Differentielles Genprodukt	Insertgrößen	Homologie (bp)	Expressionsmuster	Funktion	Referenz
IMAGE: 4769127 2122 bp	700 bp	405/410 (98%)	- Plazenta, fötale Leber	- unbekannt	Straussberg <i>et al.</i> , 2002
Nuklear Rezeptor Koaktivator 4 (Androgen rezeptor: ARA 70) 3506 bp	780 bp	471/483 (97%)	- Gehirn - Prostata	- Transkriptionsfaktor, Mitglied der Steroid Superfamilie - in Gegenwart von Testosteron verstärkt der Androgen Rezeptor (ARA) die transkriptionelle Aktivität von Androgen	Yeh <i>et al.</i> , 1996, Rahmann <i>et al.</i> , 2003, Thin <i>et al.</i> , 2003, Zhou <i>et al.</i> , 2002
nuclease sensitive element binding protein-1 (YB-1)	680 bp	149/159 (93%)	- ubiquitär - vor allem in Skelettmuskel und Herz stark exprimiert - in Mamma- und kolorektales Karzinom, Osteo- und Lungen- Sarkom, Ovarialtumor - korreliert mit der Tumor Progression beim Melanom, sonst sind keine weiteren Daten zum Melanom bekannt	- YB-1 gehört zur Familie der menschlichen Kälteschockproteine - Transkriptionsfaktor: bindet an Y-Box von einigen Genen an das CCAAT Motiv - bindet an die Y-Box von MHC Klasse II Promotoren mit der Consensussequenz: CTGATTGG (identisch zu CCAAT Box) - im Mamma- und Lungen-Karzinom führt die Hochregulation von YB-1 zur Translokation in den Nukleus (prognostischer Marker)	Sakura <i>et al.</i> , 1988, Matsumoto und Wolffe <i>et al.</i> , 1998 Didier <i>et al.</i> , 1988 Hipfel <i>et al.</i> , 2000 Janz <i>et al.</i> , 2002 Saji <i>et al.</i> , 2003, Gessner <i>et al.</i> , 2004,

1474 bp				<ul style="list-style-type: none"> - DNA Reparatur, Zellproliferation, Immunsuppression, Apoptose, Zytostatikaresistenz, Invasion und Metastasierung - Interaktionen mit AP-2 und p53 - wird durch GATA Transkriptionsfaktoren reguliert - YB-1 Translokation in den Nukleus bei andenoviralen infizierten Zellen; unterstützt die Virus Replikation 	<p>Ohga <i>et al.</i>, 1998, Swamynathan <i>et al.</i>, 2002, Jürchott <i>et al.</i>, 2003, Holm <i>et al.</i>, 2004</p> <p>Zhang <i>et al.</i>, 2003, Mertens <i>et al.</i>, 1998, 2003</p> <p>Yokoyama <i>et al.</i>, 2003</p> <p>Holm <i>et al.</i>, 2002</p>
---------	--	--	--	--	--

Tabelle 7. Überexprimierte Gene in der Lymphknotenmetasase. Es sind 34 Genprodukte (mit Angaben der Transkriptgrößen in Basenpaaren) der Lymphknotenmetastasen spezifischen Subtraktions-cDNA-Bank aufgeführt (fett gedruckt in schwarzes Schrift) und die bei der Hybridisierung mit der Lymphknotenmetastasen-Subtraktions- bzw. cDNA-Sonde (fettgedruckt in blauer Schrift) ein stärkeres Signal zeigten als mit der Melanom- Subtraktions- bzw. cDNA- Sonde. Der IMAGE Klon: 3912859 und 4769127, der Laminin Rezeptor 1 (LAMR1), Importin 11, die beiden Bac Klone: RP 11-339 H12 und RP 11-306 M1 wurden im Northern Blot näher charakterisiert. Die Angaben in der dritten Spalte geben die Übereinstimmung des klonierten Genfragmentes mit der Sequenz in der Genbank an. Dabei beruht die Diskrepanz zwischen Insertgröße und Sequenzhomologie auf den Umstand, dass beim Sequenzieren nur die ersten ca. 200-400 Basenpaare zuverlässig lesbar waren. In der vierten Spalte wird das Expressionsmuster des klonierten Genfragmentes dargestellt und in der fünften Spalte die dazugehörige Literaturangabe.

III. 6 Verifizierung der differentiellen Genexpression mittels Northern Blot

Es wurden zur Bestätigung der differentiellen Genexpression Melanomzelllinien unterschiedlicher Wachstumsphasen verwendet. Folgende Gene aus der Lymphknotenmetastasen spezifischen Subtraktionsbank wurden für den Northern Blot verwendet:

- Bac Klon RP 11-339 H12
- Importin 11
- Laminin Rezeptor 1 (67kDa, LAMR1)
- Tyrosinase 3 monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenase Aktivierungsprotein (14-3-3 theta; YWHAQ)

Zusätzlich wurden Northern Blots von den Klonen: IMAGE 4761927, 2912859 und Bac RP 11-306 M1 durchgeführt. Die Banden waren jedoch für eine Auswertung zu schwach. In der nächsten Tabelle 8 sind die Ergebnisse der RNA-Extraktion aus Melanomzelllinien bezüglich der Reinheit und Ausbeute dargestellt. Der Reinheitsgrad der RNA's lag in der Regel zwischen 1,4 und 1,9.

RNA für Northern Blots		
Zelllinien	Quotient 260/280nm	Ausbeute in µg
Fibroblasten	1,8	6,1
Keratinocyten	1,9	1,14
Melanozyten	1,7	0,27
WM 1552 (RGP)	1,4	15
WM 35 (RGP)	1,5	5,73
IGR 39 (RGP)	1,7	2,8
WM 115 (VGP)	1,4	4,2
WM 793 (VGP)	1,6	2,4
SK-Mel 19 (met. Melanom)	1,3	1,2
SK-Mel 28 (met. Melanom)	1,9	2,08
M5 (met. Melanom)	1,8	2,06
WM 1205 LU (hochaggressives metastatisches Melanom)	1,8	6,94
WM 451 LU (hochaggressives metastatisches Melanom)	1,8	5,1

Tabelle 8: Ergebnisse der Gesamt-RNA Isolierungen aus Melanomzelllinien. Dargestellt sind die Reinheiten der RNA-Quotient aus 260nm/280nm und die Ausbeute in µg. RGP = *radial growth phase*, VGP = *vertical growth phase*, met. Melanom = metastatisches Melanom.

Nach der RNA-Extraktion wurden die RNA's über ein Agarose-Gel für den Northern Blot aufgetrennt (Abb. 30). Abb. 30 zeigt eine intakte RNA, da deutlich die 18S- und 28S-Banden der einzelnen RNA's zu sehen sind.

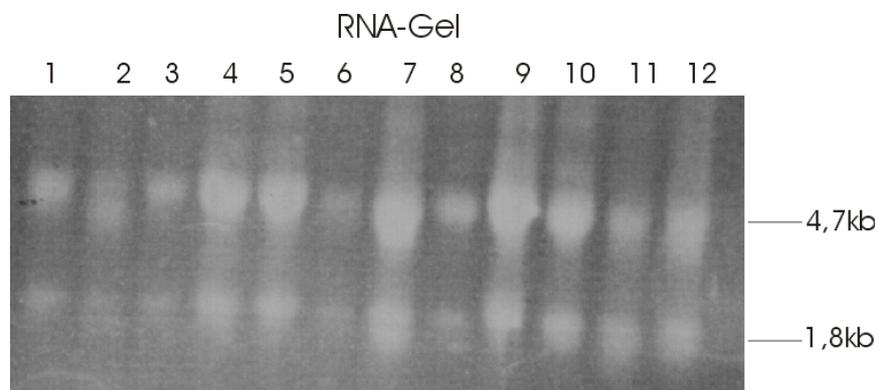
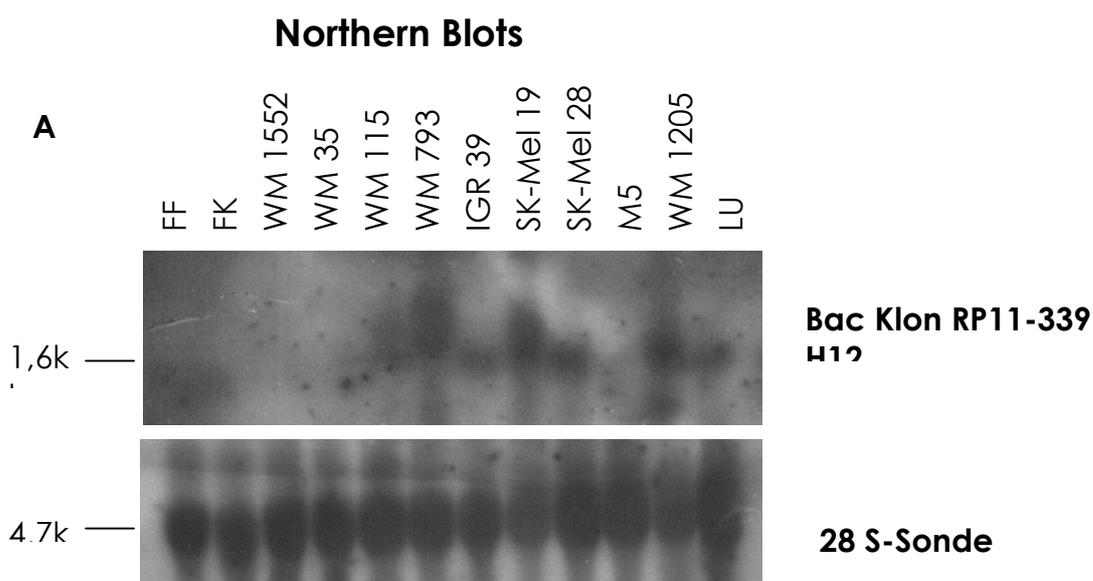


Abb. 30: RNA-Gel für einen Northern Blot. Spur 1 weist Fibroblasten-, Spur 2 Keratinozyten-, Spur 3 WM Melanozyten-, Spur 4 WM 1552-, Spur 5 WM 35-, Spur 6 WM 115-, Spur 7 WM 793-, Spur 8 IGR 39-, Spur 9 SK-Mel 28-, Spur 10 WM 1205 LU- und Spur 12 WM 451 LU RNA auf. Die 28 S Bande ist bei 4,7kb und die 18 S Bande bei 1,8 kb zu sehen.

In Abb. 31 sind die Northern Blots des Bac Klons RP 11-339 H12, von Importin 11, Laminin Rezeptor 1 (67kDa, LAMR1) und von Tyrosinase 3 monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenase Aktivierungsprotein (14-3-3 theta; YWHAQ) dargestellt. Die 28 S-Sonde (4,7kb) dient hierbei als Kontrolle für die Integrität der geladenen RNA und als Standard für die semiquantitative Auswertung der Signale durch die spezifischen Sonden mit Hilfe des Computerprogramms Molecular Analyst (BioRad, CA, USA).



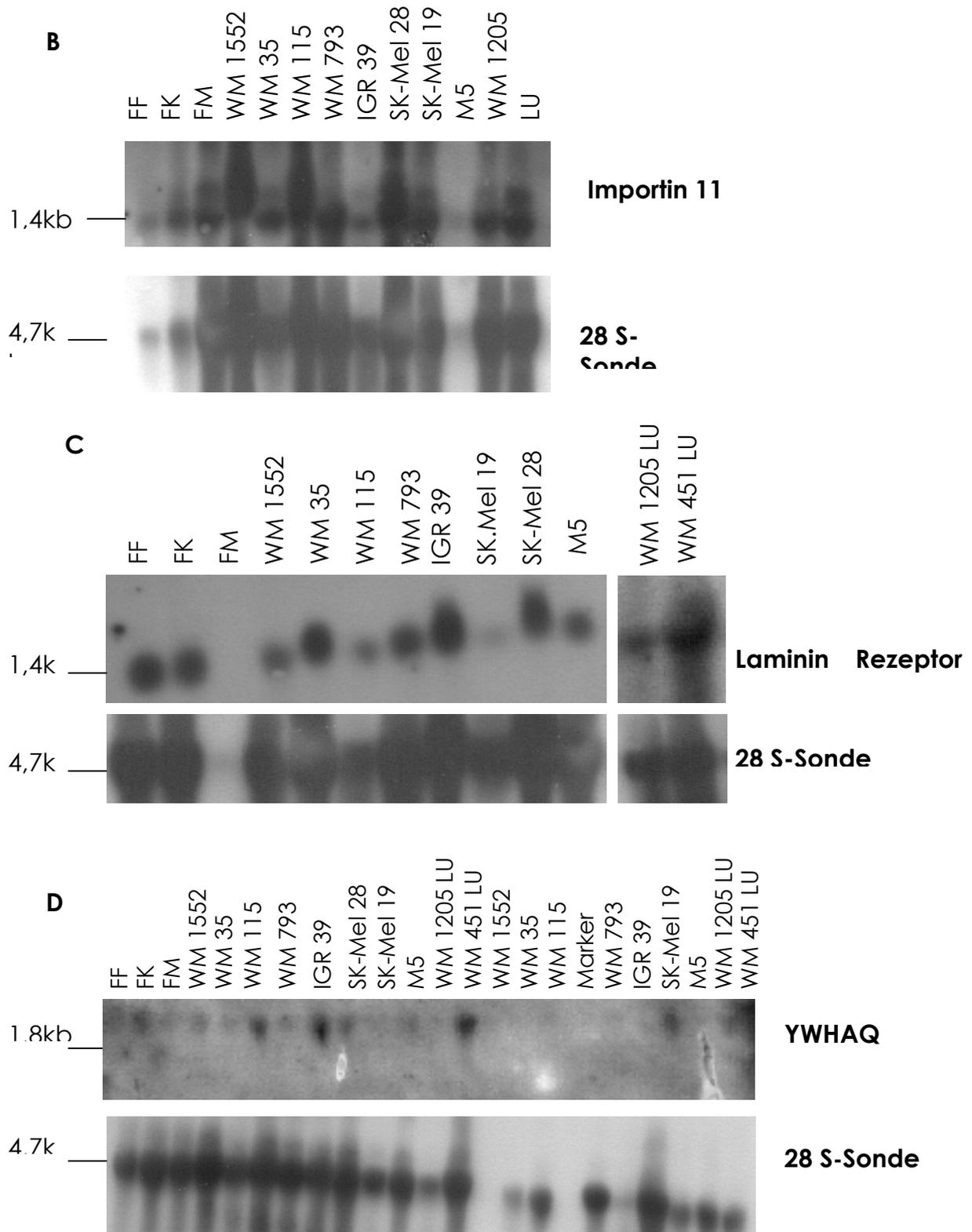


Abb. 31: Northern Blot Hybridisierungen. Bild A zeigt die Northern Hybridisierung mit dem Bac Klon RP11-339 H12, Bild B Importin 11, Bild C Laminin Rezeptor 1, und Bild D das Tyrosin 3 monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenase Aktivierungsprotein (YWHAQ).

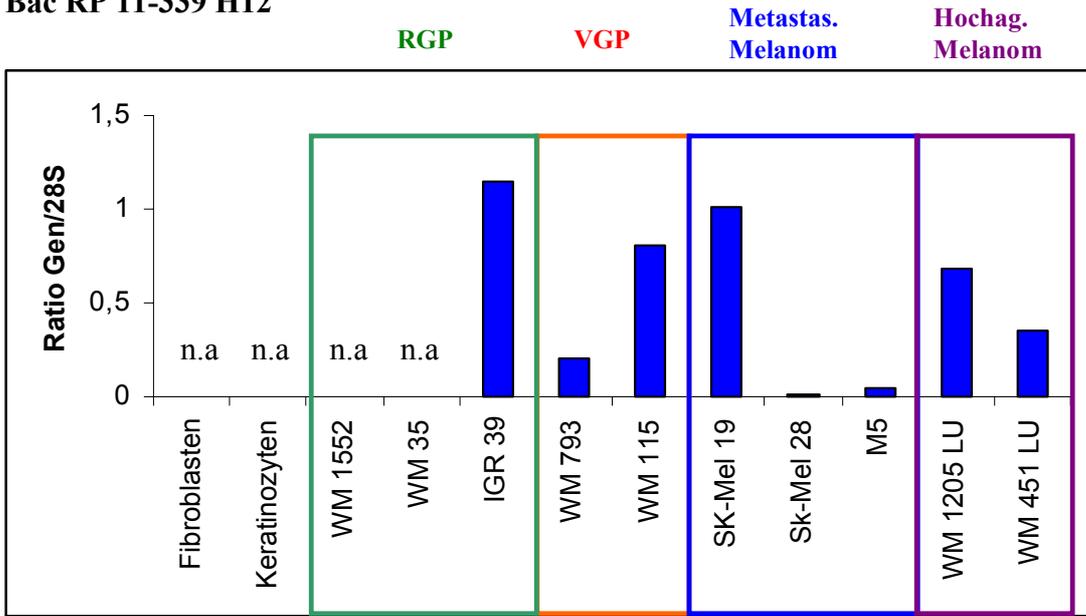
Aufgrund der Tatsache, dass kein RNA-Marker verwendet wurde, erfolgte die Grössenermittlung der einzelnen RNA's dadurch, dass ihre Banden zu denen der 18S- und 28S-Sonden in Relation gesetzt wurden. Anschliessend wurde die semiquantitative Auswertung der RNA-Expression durchgeführt (Tabelle 9).

Zelllinien	Ratio: Gen/28S			
	Bac Klon RP 11-339 H12	Importin 11	Laminin Rezeptor 1	YWHAQ
Fibroblasten	-	0,64	1,22	0,83
Keratinocyten	-	0,84	1,07	0,4
Melanozyten	-	0,88	-	0,94
WM 1552C (RGP)	-	0,91	0,24	0,29; -
WM 35 (RGP)	-	0,95	0,99	0,23; -
WM 115 (VGP)	0,81	0,77	1,08	0,09; -
WM 793(VGP)	0,21	1,1	1,46	0,15; -
IGR 39 (VGP)	1,15	1,04	0,75	0,46; -
SK-Mel 19 (met. Melanom)	1,01	1,01	0,28	0,32; 0,3
SK-Mel 28 (met. Melanom)	0,00977	2,0	0,85	0,6
M5 (met. Melanom)	0,05	-	1,07	1,2; 0,26
WM 1205 LU (hochaggressives metastatisches Melanom)	0,68	0,92	0,65	0,3; 0,7
WM 451 LU (hochaggressives Melanom)	0,35	0,99	0,64	0,6; 0,6

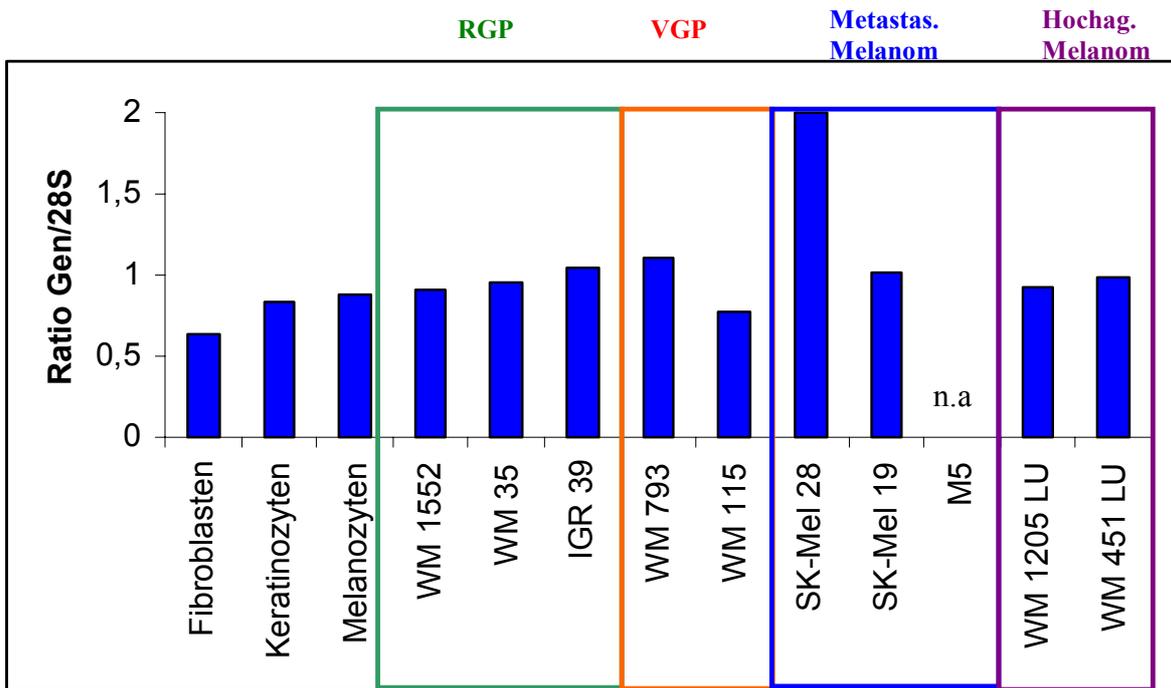
Tabelle 9: Übersicht der semiquantitativen RNA-Expressions-Ermittlung. Die Ermittlung der einzelnen Ratios durch Ermittlung des Verhältnisses von Gen zu 28S-RNA unter Verwendung des Programms Molecular Analyst (BioRad, CA, USA).

In der nächsten Abbildung (Abb. 32) sind die Auswertungen der Expressionsprofile des Bac Klons RP11-339H12, YWHAQ, Laminin Rezeptor 1, Importin 1 und IMAGE: 3912859 in den analysierten Zelllinien zusammengefasst. Für das bessere Verständnis sind die Wachstumsphasen der einzelnen Zelllinien eingezeichnet.

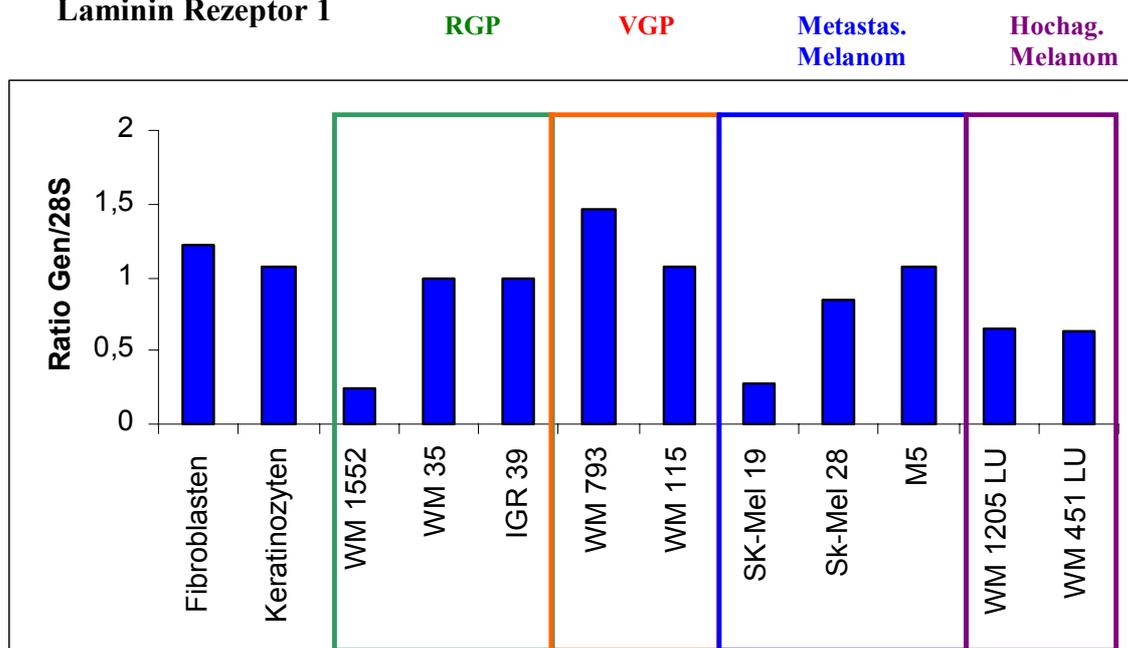
A Bac RP 11-339 H12



B Importin 11



C Laminin Rezeptor 1



D YWHAQ

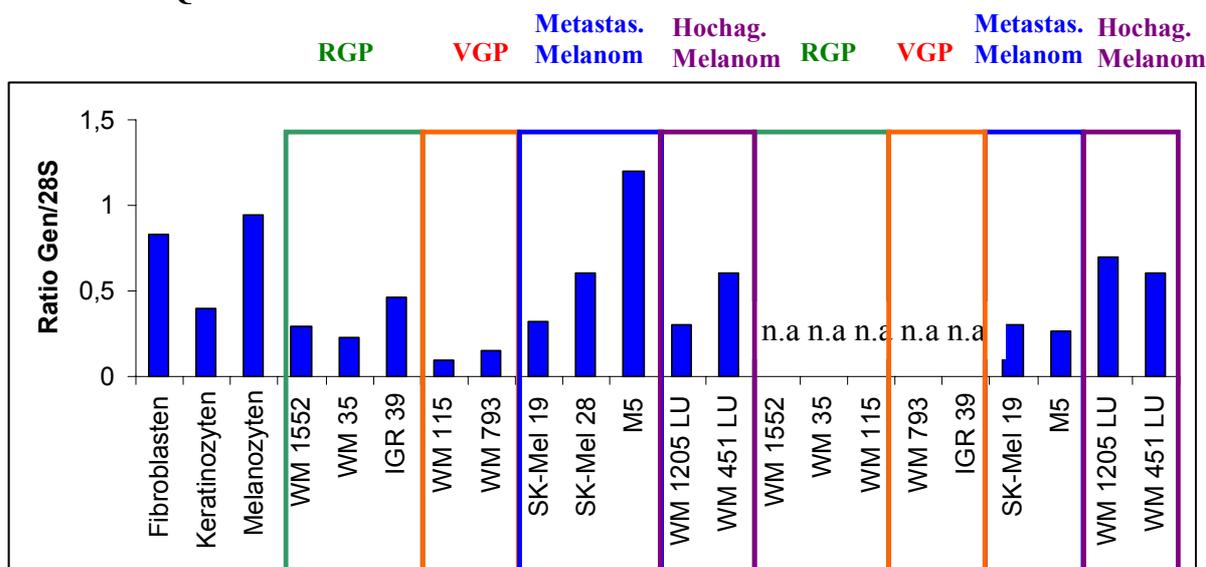


Abb. 32: Übersicht der semiquantitativen Auswertung der Northern Blots. n.a = nicht auswertbar. Die Genfragmente des unbekanntes Bac Klon RP11-339 H12 sind in Bild A dargestellt. In Bild B ist der Importin 11, in Bild C der 67kDa Laminin Rezeptor 1 und in Bild D ist das Tyrosinase 3 monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenase Aktivierungsprotein (YWHAQ) dargestellt. Die unterschiedlichen Wachstumsphasen sind schematisch in jedes Bild eingezeichnet. Hierbei steht für RGP (*radial growth phase*), VGP (*vertical growth phase*), Metastas. Melanom = Metastatisches Melanom und Hochag. Melanom = hochaggressives Melanom.

Bei allen untersuchten Klonen konnte keine Korrelation mit den Wachstumsphasen der Melanomzelllinien beobachtet werden.

Beim unbekanntem Bac Klon RP11-339 H12 konnten die ersten vier RNA's nicht ausgewertet werden. Die stärkste Expression konnte in der radial wachsenden Zelllinie IGR 39 beobachtet werden. Zusätzlich konnten starke Signale in der vertikalen Zelllinie WM 115 und in den metastatischen Zelllinien SK-Mel 19, WM 1205 LU und WM 451 LU detektiert werden. Importin 11 agiert als Transportprotein von Substraten in den Nukleus (Scott *et al.*, 2000) und wurde in allen untersuchten Zelllinien exprimiert.

Der Laminin Rezeptor 1 (67kDa) wurde ebenfalls in jeder Melanomzelllinie exprimiert. Die Melanozyten RNA konnte dabei nicht ausgewertet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Laminin Rezeptor in Metastasen überexprimiert wird (Vacca *et al.*, 1993, Asano *et al.*, 2004).

Das Protein YWHAQ spielt eine Rolle bei der Signaltransduktion (Zimmermann *et al.*, 2000) und wird ubiquitär exprimiert. Die stärkste Expression für dieses Aktivierungsprotein konnte in der metastatischen Zelllinie M5 detektiert werden. Zusätzlich wurde YWHAQ stark in Fibroblasten und Keratinozyten exprimiert.

Generell kann man sagen, dass mittels Northern Blots an den Melanomzelllinien keine Korrelation mit der Tumorprogression auf RNA-Ebene zu sehen ist. Als nächstes wurde, aufgrund der bekannten Literaturangaben der Laminin Rezeptor 1 für nähere Analysen verwendet. Hierzu wurden auf Proteinebene die Laminin Expression in unterschiedlichen Melanomzelllinien anhand von FACS-Analysen untersucht. Für die Expressionsanalyse im Gewebe wurden immunhistologische Färbungen und *in situ* Hybridisierungen durchgeführt.

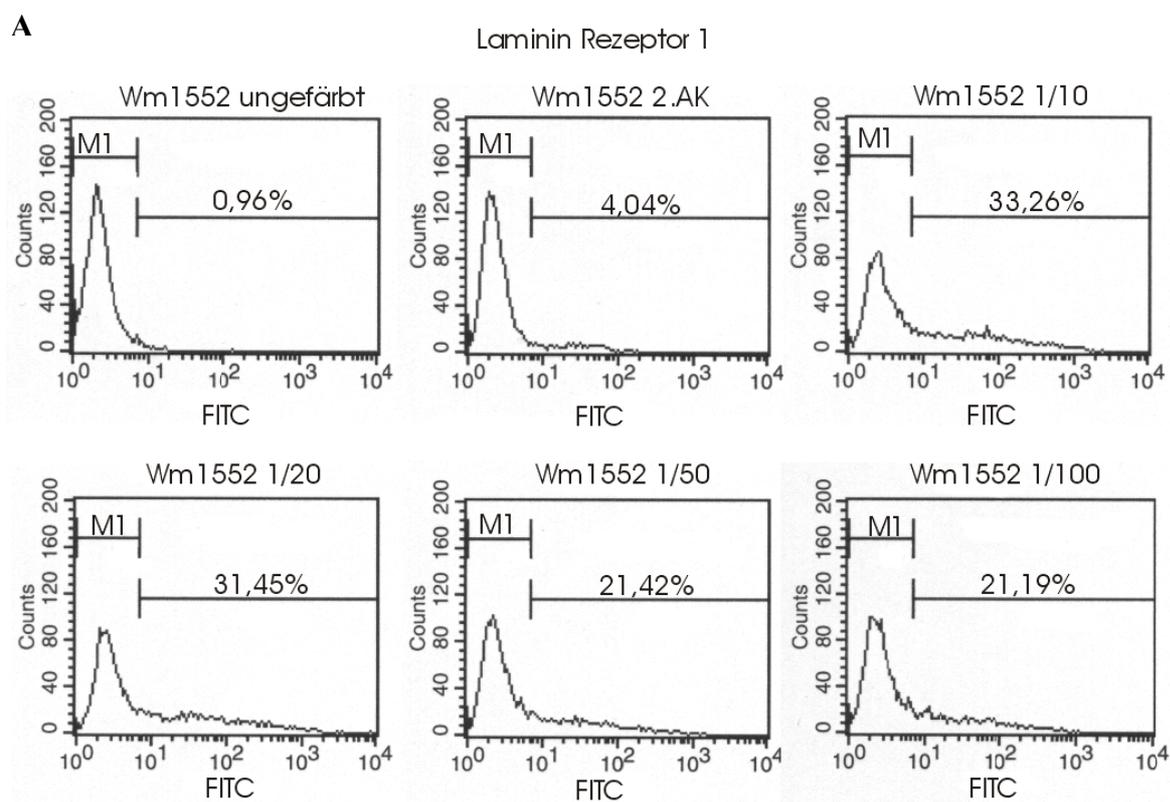
Für die Bestätigung der differentiellen Expression der einzelnen Gene in der Metastase ist es notwendig Northern Blots mit unterschiedlichen Geweben (Haut, Nävus, Melanom) anzufertigen. Leider konnten das Expressionsprofile der einzelnen Gene im Gewebe nicht analysiert werden, da keines zur Verfügung stand.

III.7 Expressionsanalyse des Laminin Rezeptors 1 (67kDa)

III.7.1 FACS-Analyse

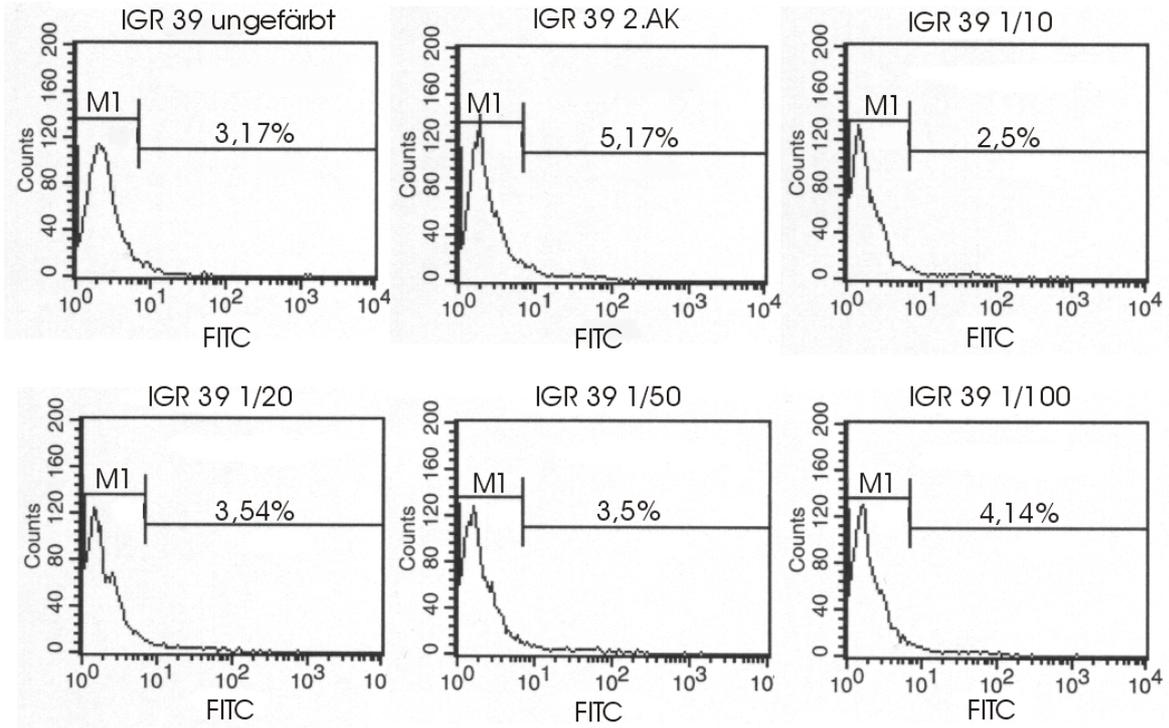
Anhand der FACS-Analyse (BD Bioscience, Heidelberg) wurde die Expressionsanalyse des Laminin Rezeptor 1 Proteins in unterschiedlichen Melanomzelllinien ermittelt. Hierfür wurden die radial wachsenden Zelllinien WM 1552 und IGR 39 und die metastatischen Zelllinien WM 1205 LU und WM 451 LU verwendet. Diese Zelllinien wurden ausgewählt, da sie auf RNA-Ebene mittels Northern Blot eine Laminin Expression aufzeigten. Der Erstantikörper (Anti-67kDa Laminin receptor IgM; Maus, monoklonal, Ab-1; siehe II.1.7) wurde zunächst in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50 siehe II.5.1) getestet.

In der nächsten Abbildung (Abb. 33) sind die einzelnen FACS-Auswertungen der eingesetzten Melanomzelllinien zusammengefasst.



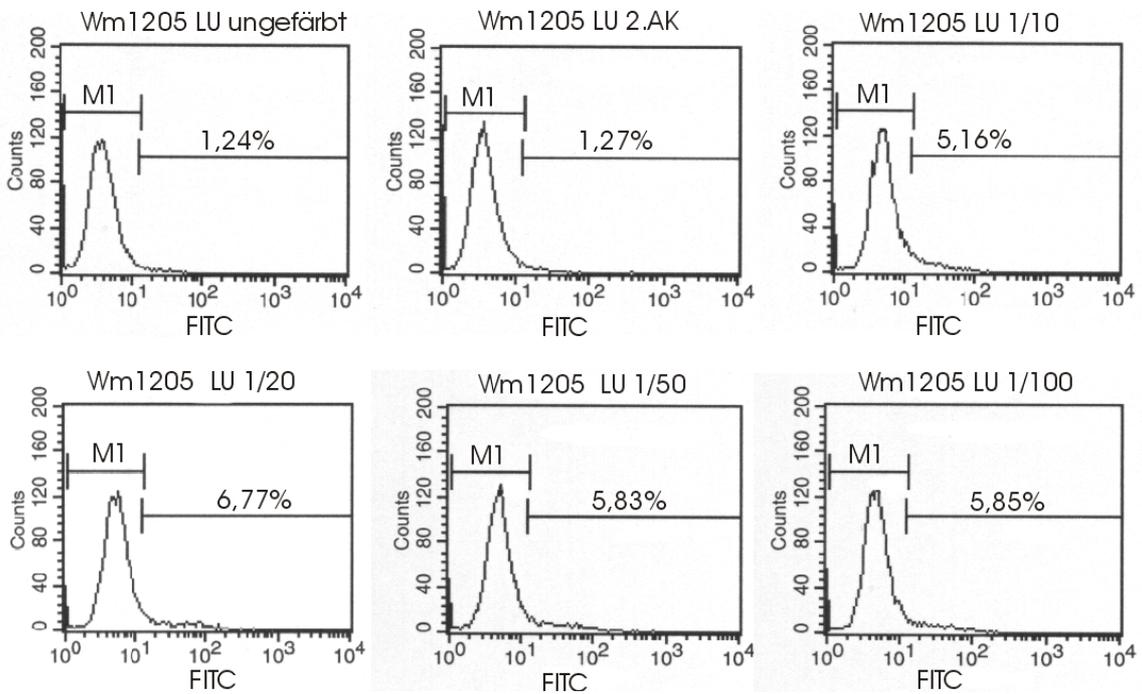
B

Laminin Rezeptor 1



C

Laminin Rezeptor 1



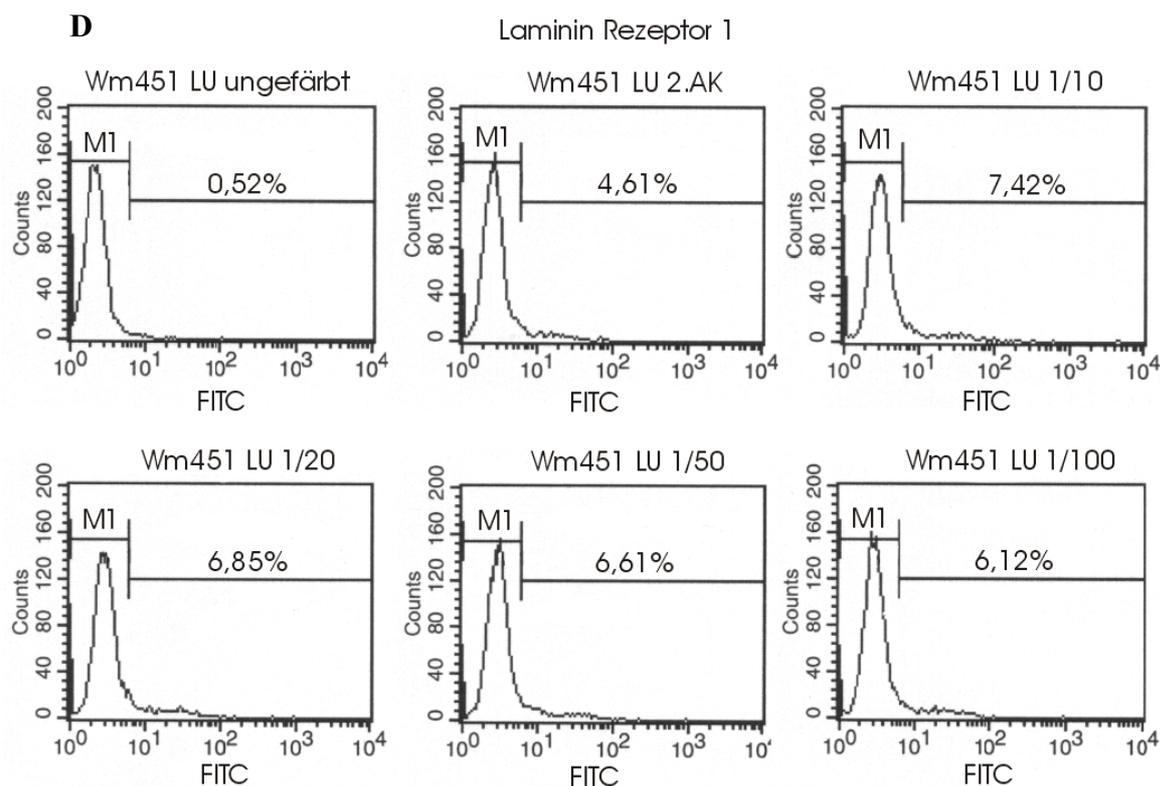


Abb. 33: Übersicht der Laminin Rezeptor 1 FACS-Auswertungen. In Bild A ist die FACS-Analyse der radial wachsenden Zelllinie WM 1552, in Bild B der radial wachsenden Zelllinie IGR 39, in Bild C der metastatischen Zelllinie WM 1205 LU und in Bild D der metastatischen Zelllinie WM 451 LU aufgezeigt. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen und als Negativ Kontrolle wurden Zellen verwendet, bei denen nur der Zweitantikörper (2.AK) verwendet wurde. Der Laminin Rezeptor 1 Erstantikörper wurde in unterschiedlichen Verdünnungen getestet: 1/10, 1/20, 1/50 und 1/100.

In der nächsten Tabelle 10 werden die Prozentangaben der Laminin Rezeptor 1 positiven Zellen aller verwendeten Melanomzelllinien zusammengefasst.

Zelllinien	Prozentualer Anteil der Laminin Rezeptor 1 positiven Zellen			
	1/10 Verdünnung	1/20 Verdünnung	1/50 Verdünnung	1/100 Verdünnung
WM 1552	33,26	2,5	5,16	7,42
IGR 39	31,45	3,54	6,77	6,85
WM 1205 LU	21,42	3,5	5,83	6,61
WM 451 LU	21,19	4,14	5,85	6,12

Tabelle 10: Prozentuale Übersicht der Laminin Rezeptor 1 positiven Zellen in den unterschiedlichen Zelllinien.

Wie aus Abb. 33 und Tabelle 10 zu erkennen ist, war lediglich bei der radial wachsende Melanomzelllinie WM 1552 eine deutliche Laminin Rezeptor 1 Detektion möglich. Über 30% der Zellen zeigten bei einer 1/10 oder 1/20 Verdünnung eine Laminin Rezeptor 1 Expression.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Northern Blot Daten nicht überein, da in dieser Melanomzelllinie eine schwache Laminin Rezeptor 1 RNA Expression zu detektieren war. Bei der radial wachsenden Melanomzelllinie IGR 39 und in den metastatischen Melanomzelllinien WM 1205 LU und WM 451 LU ist keine Expression des Laminin Rezeptors 1 zu sehen. Somit kann keine konkrete Aussage über die Proteinanalyse in diesen Zelllinien getroffen werden. Eventuell weisen die verwendeten Melanomzelllinien IGR 39, WM 1205 LU und WM 451 LU kein Laminin Rezeptor 1 auf. Parameter, die die FACS-Analyse hierbei erschwert haben könnten, werden im Diskussionabschnitt dieser Arbeit näher erläutert.

III.7.2 Immunhistologie

Für den Nachweis der Lokalisation des Laminin Rezeptor 1-Genprodukts im Gewebe wurde der *Vectastain* ABC Kit (Avidin biotinylated enzyme Complex, siehe II.1.5) verwendet. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler α -Maus 67kDa Laminin receptor: IgM (siehe II.1.7) verwendet. Der Nachweis erfolgte indirekt durch einen sekundären, α -Maus IgM Antikörper (AK), der biotinyliert ist. Es wurden 5 μ m dicke Paraffinschnitte von unterschiedlichen Geweben angefertigt: gesunde Haut, Nävi (2x compound- und 1x dysplastischer- Nävi), Melanome (1x noduläres-, 1 akrolentiginöses- und 2x superfiziell spreitende- Melanome) und 2x Hautmetastasen.

Pro Gewebeprobe wurden je 3 Schnitte angefertigt, um einen repräsentativen Querschnitt zu erhalten. Als Positiv-Kontrolle für die Antikörperfärbung dienten Mamma Karzinom-Paraffinschnitte. Die Schnitte wurden zuerst für 5 Minuten in Citratpuffer gekocht. Der Erstantikörper (siehe II.1.7) wurde in unterschiedlichen Verdünnungen (1:10, 1:25, 1:50 und 1:100 in 1x PBS) getestet. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde für die Farbreaktion das chromogen Substrat Neufuchsin (Dako, CA, USA) verwendet. Die Farbreaktion wurde nach 38 Minuten abgestoppt und mit filtriertem HE (Dako, CA, USA) erfolgte die Gegenfärbung (siehe II.4.1). Die beste Färbung wurde mit einer 1:50 Verdünnung des Laminin Rezeptors 1 Antikörper erzielt. In den nächsten Abbildung 34 ist exemplarisch das Ergebnis der immunhistologischen Färbung dargestellt.

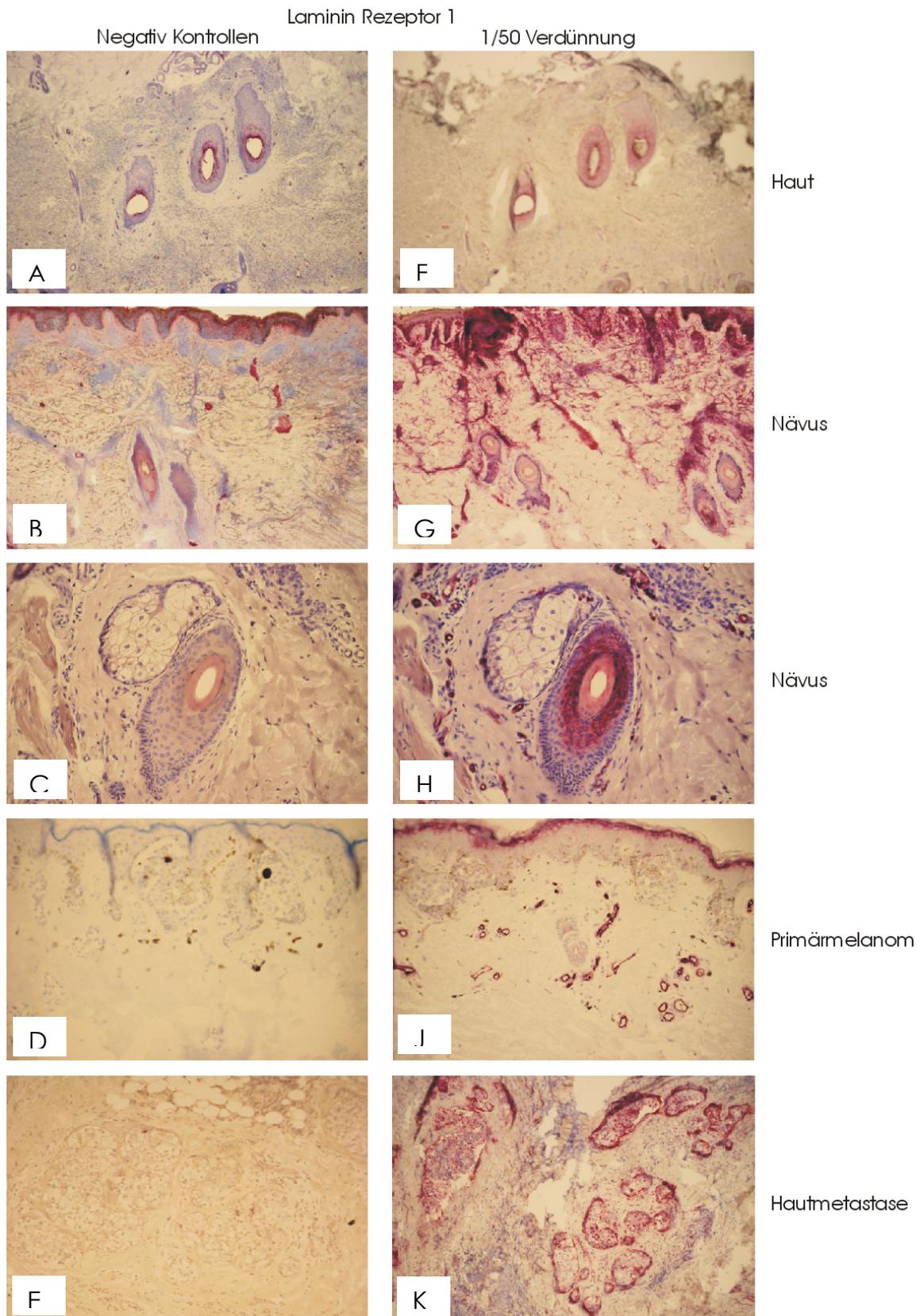


Abb. 34: Expression des Laminin Rezeptors 1 in Geweben von Haut, Nävus, Primärmelanomen und Hautmetastasen (Immunhistologie). In Bild A-E sind die Negativ Kontrollen und in Bild F-K die Laminin Rezeptor 1 Färbung in einer 1/50 Verdünnung aufgezeigt. In der Positiv Kontrolle (Mamma Karzinom) konnte keine Färbung beobachtet werden.

Wie aus Abb. 34 zu erkennen ist, wurden in den Haut-, Nävus- und Primärmelanom-Geweben (SSM) die Haarfollikelzellen unspezifisch gefärbt. In der Hautmetastase wurden zusätzlich die Kontakte der einzelnen Tumornester zur extrazellulären Matrix oder zum Stroma unspezifisch angefärbt. Zusätzlich sind auf allen Gewebesschnitten einzelne Farbstoffpräzipitate verteilt. Somit sind nur unspezifische Färbungen erzielt worden.

III.7.3 *in situ* Hybridisierung

Für die Analyse der RNA Expression des Laminin Rezeptors 1 in Hautgeweben wurden *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Hiefür wurden 5µm dicke Paraffinschnitte von unterschiedlichen Geweben angefertigt: 2x gesunde Haut, 2x compound Nävus, 1x akrolentiginöses-, 1x noduläres- und 1x superfiziell spreitendes Melanom und 2x Hautmetastasen.

Als erstes wurde das in pCR2.1 Vektor klonierte Laminin Rezeptor 1 cDNA Fragment in den pBluescript SK-Vektor umkloniert, um eine *in vitro* Transkription über die T3 bzw. T7 Polymerasen zu ermöglichen (siehe II.4.2.3). Dazu wurden der pBluescript SK-Vektor bzw. die Laminin Rezeptor 1 Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen ApaI und SacI (Abb. 35 A und B). Nach dem Verdau wurde der pBluescript SK-Vektor dephosphoryliert (siehe II.4.2.1) und eine Gelelution durchgeführt (siehe II.3.5.2). Auch die verdaute Laminin Rezeptor Plasmid-DNA wurde entsprechend verdaut und über eine Gelelution aufgereinigt (Abb. 35 C).

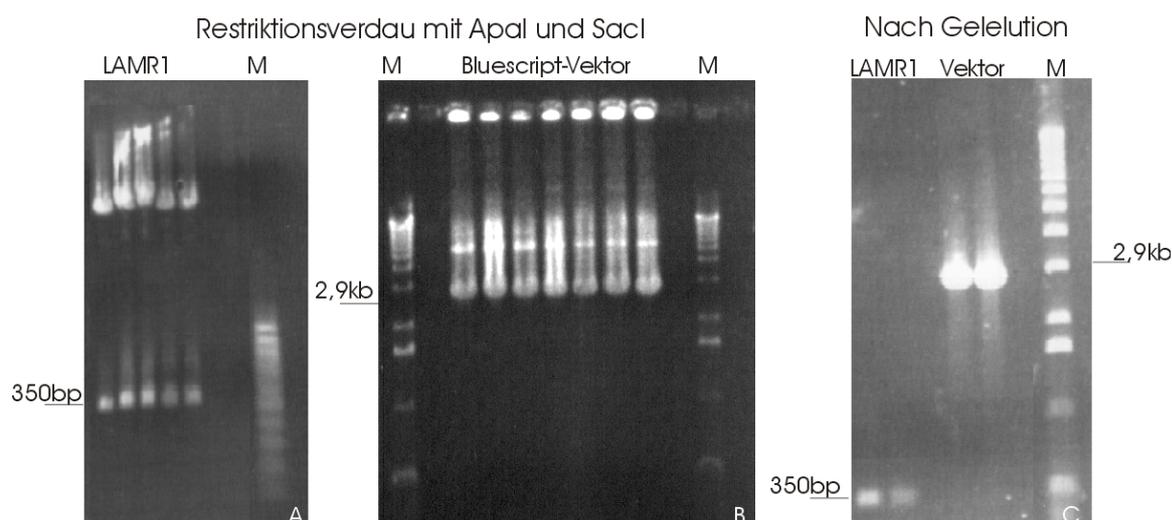


Abb. 35: Restriktionsverdau mit ApaI und SacI und Überprüfung der Gelelution. M = Marker (100bp und 1kb, MBI, Fermentas), LAMR1 = Laminin Rezeptor 1. Bild A zeigt den Restriktionsverdau mit der LAMR1-DNA, Bild B den Restriktionsverdau mit der Bluescript Vektor-DNA. In Bild C wurde die Anwesenheit der LAMR1- und der Bluescript- DNA nach einer Gelelution überprüft.

Nach erfolgreicher Umklonierung wurde die Laminin Rezeptor 1 cDNA mit den Restriktionsenzymen SacI/ApaI linearisiert (siehe II.4.2.2, Abb. 36). SacI schneidet im pBluescript Plasmid am 5' Ende, somit wurde durch die Inkubation mit T7 RNA Polymerase antisense Transkripte hergestellt. Während das ApaI am 3' Ende schneidet, wurden sense Transkripte mit der Inkubation von T3 RNA Polymerasen gewonnen.

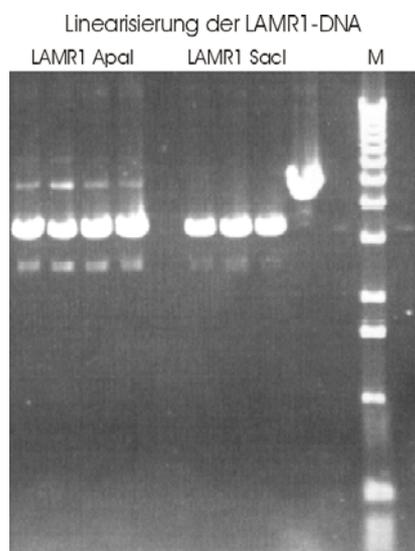


Abb. 36: Überprüfung der Linearisierung. M = 1kb Marker (MBI, Fermentas), LAMR1 = Laminin Rezeptor. Die ersten 4 Spuren zeigen die Linearisierung der LAMR1-DNA mit dem Restriktionsenzym ApaI, und die nächsten Spuren die Linearisierung mit dem Restriktionsenzym SacI.

Die Sonden wurden über eine *in vitro* Transkription von 1µg/µl Laminin Rezeptor 1 cDNA in dem pBluescript SKII Vektor mit Hilfe des DIG RNA labeling Kits (Roche, Mannheim) und T3 und T7 Polymerase hergestellt (siehe II.4.2.3). In der Abbildung 37 ist die Überprüfung der DIG-Markierung der beiden Sonden aufgezeigt

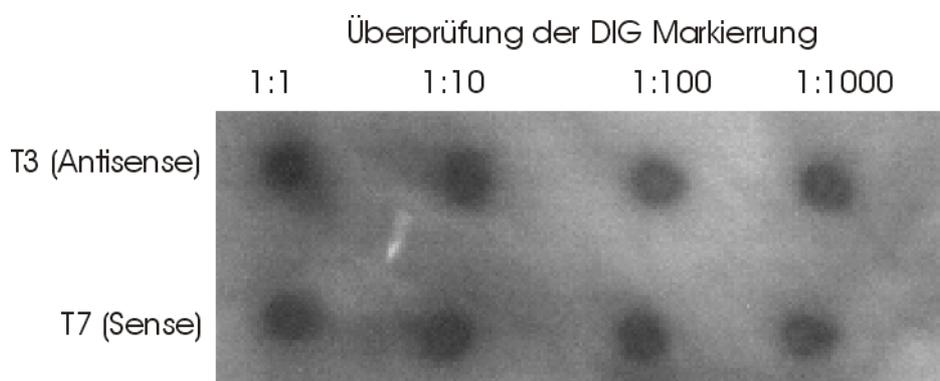


Abb. 37: Überprüfung der DIG-Markierung der Laminin Rezeptor 1 Sonden. Die Sonden wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000) aufgetropft. Nach Einleitung von Roche entsprechen 1µg eingesetzte template DNA 10µg markierte RNA. Nach der verwendeten Anleitung von Hirsch *et al.*, 1991 sind in der 1:1 eingesetzten Sonde 100ng Sonde pro µl vorhanden.

In Abbildung 38 ist das Ergebnis der *in situ* Hybridisierung an Gewebe von Haut, Nävus, Primärmelanomen (superfiziell spreitende = SSM und noduläres = NM) und Hautmetastase dargestellt.

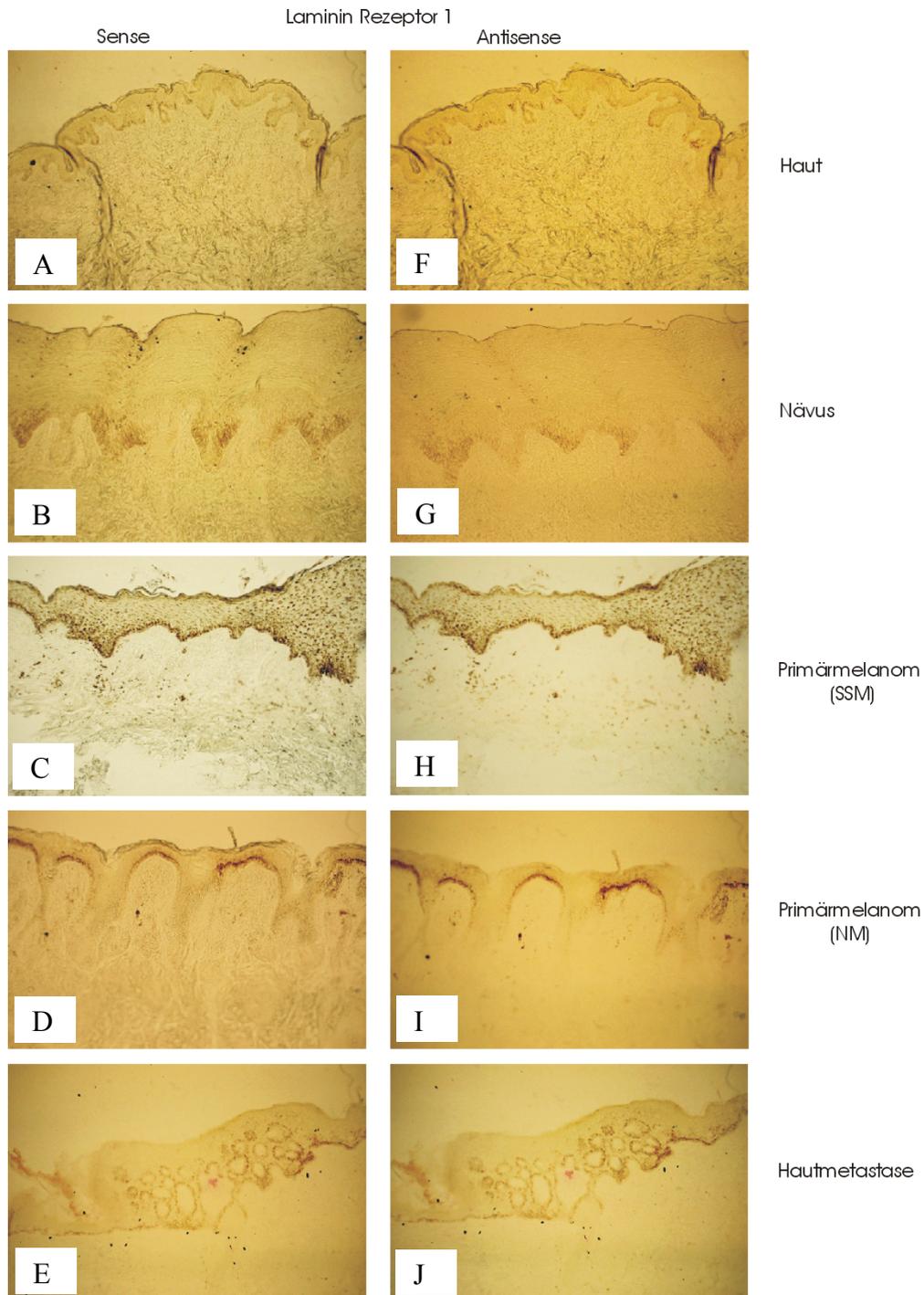


Abb. 38: *In situ* Hybridisierungen vom Laminin Rezeptor 1 an Geweben. In Bild A-E sind die sense- und in Bild F-J die Antisense Hybridisierungen gezeigt. Sense = Negativ Kontrolle, Antisense = Laminin Rezeptor 1 Färbung.

Anhand der *in situ* Hybridisierung konnten keine spezifische Hybridisierung an den einzelnen Gewebsschnitten detektiert werden, obwohl die Sonden bei der Überprüfung der DIG Markierung starke Signale aufweisen. Es müssen eine Reihe anderer Parameter bei einer *in situ* Hybridisierung berücksichtigt werden, die im späteren Diskussionsabschnitt erläutert werden.

IV Diskussion

IV.1 Bewertung der über Laser Capture Microdissection isolierten RNA

Für ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge in der Krebsentstehung spielt die Identifizierung und Quantifizierung der Genexpressionen in Tumorzellen eine wichtige Rolle. Gewonnene Zellpopulationen aus einzelnen Gewebsbiopsien sind heterogen. Hingegen spiegeln kultivierte Zellen nie die *in vivo* Bedingungen bzw. Verhalten wieder und weisen oft genomische Veränderungen aufweisen (Meade-Tollin *et al.*, 1990, Mikolowska-Mennis *et al.*, 2002).

Die Unterschiede im Expressionsverhalten sind oft auf Kulturartefakte zurückzuführen. Diese entstehen zum einen dadurch, dass die Zellen aus ihrer normalen Umgebung entfernt wurden und sie den Kontakt zu den benachbarten Zellen und den Kontakt untereinander verlieren. Zum anderen wirken sich die verwendeten Zellkulturmedien, Wachstumsfaktoren und anderen Additiva bzw. lange Kultivierungszeiten auf die Zellen aus.

Mit der Methode der Laser Capture Microdissection können maligne Zellen aus einem heterogenen Gewebe schnell und effektiv isoliert werden. Dabei bleibt sowohl die Morphologie der Zellen als auch die RNA, DNA und die vorhandenen Proteine weitgehend unverändert. Entwickelt wurde die Methode im National Institute of Health (NIH) (Emmert-Buck and Liotta *et al.*, 1996). Die Laser Capture Microdissection ist somit eine wichtige Grundlage für molekulargenetische Studien wie beispielsweise für die Analysen von Mutationen, Genexpression und zur Herstellung von cDNA-Banken von isolierten Tumorzellen aus Nativmaterial.

In dieser Arbeit wurde als Ausgangsmaterial Gefrierschnitte von Lymphknotenmetastasen und Primärmelanomen verwendet. Bei der Isolierung der Melanomzellen erwiesen sich 800-1200 Laserimpulse als ausreichend, um eine gute cDNA Qualität zu erreichen. Somit wurden insgesamt ca. 4800-7200 Melanomzellen aus den Primärtumoren bzw. Lymphknotenmetastasen isoliert (Laserimpuls x 6 = isolierte Gesamtzellzahl). Ein Problem bei der Laser Capture Microdissection ist die schlechte RNA-Qualität und die geringe RNA-Quantität, die aus den einzelnen Proben erhalten wurde. Um eine mögliche RNA Degradation zu minimieren, ist es nötig, schnell und sauber zu arbeiten. Zusätzlich sollten die einzelnen Gewebsschnitte auf bestimmte Weise gelagert werden, d.h. die einzelnen Objektträger müssen nach der HE-Färbung in einer luftdichten Glasschale aufbewahrt werden, die davor mit 10%SDS und DEPC-H₂O ausgewaschen wurden (Ehrig *et al.*, 2001).

Ausserdem sollte, um eine Degradierung der RNA während der Laser Capture Microdissection zu verhindern, das Gewebe gekühlt gelagert werden, was aber den Ablauf der Laser Capture Microdissection erschwert.

Wie es in dieser Arbeit gezeigt wurde, konnte aus den mikrodisezierten Melanomzellen der Lymphknotenmetastasen bzw. Primärmelanomenn für den anschliessenden SMART-Kit eine ausreichend RNA-Menge isoliert werden. Das Problem in dieser Arbeit war jedoch die schlechte RNA-Qualität. Hierzu wurde die RNA-Qualität elektrophoretisch und über eine GAPDH-PCR gemessen. Zusätzlich wurde die Analyse der RNA Quantität/Qualität aus den mikrodisezierten Melanomzellen in der Frauenklinik von Herrn Bonin über dem Agilent Bioanalyser freundlicherweise durchgeführt, welches ebenfalls durch elektrophoretische Messung die RNA- Qualität und –Quantität bestimmt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendete RNA rein von Proteinverunreinigungen war. Bei der Messung der RNA-Qualität und Quantität mit Hilfe des Agilent Bioanalyser konnte gezeigt werden, dass die RNA aus den mikrodisezierten Melanomzellen eine schlechte Qualität aufzeigte, da weder der 18S- noch der 28S-Peak der einzelnen RNA's zu detektieren war. Es sind in dieser Arbeit nur wenige differentiell exprimierte Gene identifiziert worden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die verwendete RNA aus den mikrodisezierten Melanomzellen degradiert vorlag.

Das Problem der schlechten RNA-Qualität und/oder Quantität ist bei der Laser Capture Microdissection ein bekanntes Problem, da meist eine begrenzte Anzahl an mikrodisezierten Zellen für die weiteren Analysen zur Verfügung steht. Herkömmliche Guanidinisothiocyanat-(GTC)-RNA- Isolierungsprotokolle benötigen in der Regel 10^6 Ausgangszellen und einen geeigneten Carrier für eine ausreichende RNA Gewinnung. Diese hohe Zahl an Ausgangszellen ist bei kleinen Tumoren kaum zu erreichen, da meist nicht genügend Ausgangsgewebe für die Isolierung der erwünschten Zellen vorhanden ist.

In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass mit dem neuentwickelten RNA 6000 Pico Assay Kit eine ausreichende RNA-Menge guter Qualität hergestellt werden kann. Die Messung erfolgte durch den Agilent 2100 Bioanalyser, jedoch ist dieser Assay sehr kostenintensiv (Copoys *et al.*, 2003).

Eine Alternative zur „konventionellen“ GTC-RNA-Isolierung ist die Kombination der Laser Capture Microdissection und der *in vitro* Transkription, dabei wird die mRNA über die *in vitro* Transkription der cDNA amplifiziert (Ernst *et al.*, 2002, Baugh *et al.*, 2001, Aoyagi *et al.*, 2003, Luzzi *et al.*, 2003).

Der Vorteil dabei ist, dass als Ausgangsmaterial 2-100ng Gesamt-RNA ausreichend sind für eine anschließende Microarray-Analyse (Affymetrix GeneChip, Baugh *et al.*, 2001). Dabei diente zur Isolierung der RNA das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen und zur Überprüfung der RNA Qualität das Agilent Programm.

Das es möglich ist aus Laser Capture Microdissection Proben grosser Tumoren RNA guter Qualität zu isolieren, wurde bereits in vielen Publikationen für Mamma-, hepatozelluläres-, Prostata-, Pankreas-, Augen- und Colon Karzinom beschrieben (Luo *et al.*, 1999, Sgroi *et al.*, 1999, Kohda *et al.*, 2000, Ohyama *et al.*, 2000, Dolter *et al.*, 2001, Fuller *et al.*, 2003, Michel *et al.*, 2003, Farrow *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004).

Hier erfolgte die Färbung der Zellen ebenfalls durch H&E und die RNA wurde in der Regel über den RNAEasy Kit der Firma Qiagen oder anhand des Microisolations Kit der Firma Stratagene (CA, USA) isoliert. In der Regel wurden über 10000-70000 Laserimpulse verwendet, dies entspricht ca. 60000-420000 isolierten Zellen. Trotz allem ist der Erhalt einer stabilen und guten RNA während der Zeit der Fixierung, Färbung und Isolierung der erwünschten Zellpopulationen kritisch.

Studien belegten, dass eine ideale Fixierung mit Ethanol statt Formalin oder Aceton die Integrität/Stabilität der RNA aufrechterhält (Fend *et al.*, 1999, Goldsworthy *et al.*, 1999, Su *et al.*, 2004). In dieser Arbeit erfolgte die Fixierung ebenfalls mit Ethanol. Ausserdem ist die Verwendung von Gefrierschnittenmaterial im Vergleich zu in Paraffin eingebettetem Gewebe besser für die anschließende RNA Isolierung geeignet (Fend *et al.*, 1999, Goldsworthy *et al.*, 1999). Dies konnte an murinen Leberzellen gezeigt werden, die über Laser Capture Microdissection isoliert wurden. Hierfür wurde zur Quantifizierung der cDNA-Konzentrationen anhand des Haushaltsgens GAPDH RT-PCR-Analysen angefertigt. Es zeigte sich, dass bei Gefrierschnitten im Vergleich zu Paraffin eingebetteten Gewebe, die GAPDH-Konzentrationen höher lagen. (Goldsworthy *et al.*, 1999).

Eine weitere Schwierigkeit ist die unterschiedliche Transkriptionsaktivität in den Geweben, was dazu führt, dass die Quantität an isolierbarer RNA variiert. Um genügend RNA für die PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung und die Herstellung der cDNA Sonden zu erhalten, wurden in dieser Arbeit jeweils 4 Primärmelanome und 4 Lymphknotenmetastasen gepoolt. Somit können individuelle Expressionsschwankungen kompensiert werden.

Ausserdem können somit Gene identifiziert werden, die in einer Mehrzahl von Patienten differentiell exprimiert sind, welche eine essentielle Rolle bei der Pathogenese des malignen Melanoms einnehmen könnten. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist, dass das Gewebe nach der Operation sofort schockgefroren wird. Durch spezielle Vorgehensweisen bei der Aufbereitung des Gewebes wie beispielsweise die Verwendung von flüssigem Stickstoff und von einem GTC-Phenol-Mix-Überschuss garantieren ein gutes Aufschliessen des Gewebes (Hipfel *et al.*, 1998).

In drei weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die sensitive Methode der RT-PCR in Kombination mit der Laser Capture Microdissection verwendet werden kann ohne den repräsentativen Querschnitt der Genexpressionen zu beeinträchtigen (Fink *et al.*, 1998, Bustin *et al.*, 2002, Copois *et al.*, 2003).

Im Bereich der dermatologische Onkologie ist für die Funktionsanalyse atypischer Nävi beim malignen Melanom die Laser Capture Microdissection und LOH (LOH = *loss of heterozygosity*) Analyse eingesetzt worden. Ebenfalls ist die Laser Capture Microdissection bei Angiofibromen und beim Merkel-Zelltumor verwendet worden (Boni *et al.*, 1999, Maitra *et al.*, 2002).

Sander *et al.*, verwendet die Laser Capture Microdissections-Methode in Kombination mit der Immunhistochemie, um nach BRAF-Mutationen in mikrodisektierten Zellen, am Nävi, Primärmelanomen und Metastasen zu suchen (Sander *et al.*, 2003). Auch im *Cancer Genome Anatomy Project* (GCAP) wurde mit Hilfe der Laser Capture Microdissection eine Vielzahl von Genen katalogisiert, die bei der Tumorprogression unterschiedlicher Karzinome (Prostata, Mamma, Eierstock, Kolon und Lunge) von Bedeutung sind. Somit konnten neue cDNA Banken hergestellt werden (Simone *et al.*, 1998 und 2000).

IV.2 Bewertung der SMART-Methode

Für eine Genexpressionanalyse ist meist die RNA Quantität und/oder Qualität der limitierende Faktor. Die RNA Isolierung aus sehr kleinen Probenmengen kann sehr schwer und ineffizient sein. Die neuentwickelte SMART-Methode (*switch mechanism at the 5' end of RNA transcripts*) beruht auf einer LD (*long distance*) PCR Amplifizierung der generierten doppelsträngigen cDNA, dabei entsteht für die anschliessende PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung eine suffiziente cDNA-Menge (Chenchik *et al.*, 1998, Herrler *et al.*, 2001). Es wurde belegt, dass mit der Verwendung der SMART-Technik eine bis zu 2000fache Anreicherung durch die LD-PCR möglich ist (Puskas *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurde zuerst die optimale PCR Zyklenzahl ermittelt. Die ideale Zyklenzahl betrug bei der generierten Primärmelanom cDNA 20 Zyklen, während bei der amplifizierten Lymphknotenmetastasen cDNA 17 PCR Zyklen ideal waren. Bei der Positiv-Kontrolle (humane Plazenta) waren 19 Zyklen die optimale Zyklenzahl. Wichtig bei der Benutzung der SMART-Methode ist die ermittelte PCR-Zyklenzahl einzuhalten. So bleibt einerseits der repräsentative Querschnitt der Expression der verschiedenen Gene erhalten. Andererseits führt eine Erhöhung der PCR-Zyklenzahl zu einer Überschreitung der exponentiellen Phase, in dessen Folge es zur Akkumulierung von einzelsträngiger cDNA kommt, welche später die PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung und die Klonierung erschweren kann. Zusätzlich führt eine Erhöhung der PCR-Zyklenzahl durch den Einbau falscher Basen zu einer erhöhten Fehlerrate der thermostabilen Polymerase (Chenchik *et al.*, 1998, Zhumabayeva *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2004).

Somit sollte für die Gewinnung einer guten cDNA-Qualität und zum Erhalt der Genrepräsentation aus den einzelnen Geweben die ermittelte PCR-Zyklenzahl unbedingt eingehalten werden (Berryman *et al.*, 2001, Zhumabayeva *et al.*, 2001).

Zudem können mit der SMART-Methode Volle-Länge-cDNA's generiert werden (Zhu *et al.*, 2001). Dabei spielen die modifizierten Oligo-Primer aus dem Kit eine tragende Rolle, sie weisen an ihren 3' Enden eine Oligo(G)-Sequenz auf. Diese können dann Basenpaare durch die reverse Transkriptase (RT) mit den angefügten Desoxycytidinen bilden. Danach wechselt die RT die Matrize und beendet die Auffüllreaktion. Eine hergestellte cDNA-Bank aus Skelettmuskel zeigte bei der Sequenzierung eine längere Sequenz im 5'-Bereich als die bereits veröffentlichte cDNA-Bank (Ciavatta *et al.*, 1999, Zhu *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit konnte über den SMART-Kit erfolgreich cDNA aus der Lymphknotenmetastase und aus dem Primärmelanom generiert werden. Wichtig bei der cDNA-Herstellung ist, eine Überamplifizierung zu vermeiden, da der repräsentativer Querschnitt der Genexpressionen in den unterschiedlichen Geweben somit verfälscht werden könnte. Andererseits kann es zu einer Überschreitung der exponentielle Phase kommen. Dies hat zur Folge, dass eine Akkumulierung von Einzelstrang cDNA im Vergleich zu Doppelstrang cDNA erfolgt, die die Klonierung nach der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung beeinträchtigt könnte. Die Qualität und Quantität der generierten cDNA wurde anhand einer GAPDH-PCR überprüft.

Zusätzlich konnte durch weitere PCR Kontrollen über die Melanommarkern MelanA und Tyrosinase gezeigt werden, dass die richtigen Zellen, d.h. die Melanomzellen über die Laser Capture Microdissection isoliert wurden, da nur die Melanomzellen diese im Pigmentstoffwechsel involvierten Gene exprimieren.

Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die über SMART hergestellte cDNA für Genexpressionsanalysen aus verschiedenen Tumoren eingesetzt werden kann (Zhumabayeva *et al.*, 2001). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die über SMART hergestellte cDNA im Vergleich zu den entsprechenden RNA's stärkere Hybridisierungssignale, die über einen Phosphoimager bestimmt wurden, aufzeigten. Somit vermutet Zhumabayeva *et al.*, dass die SMART-Methode eine sehr hohe Sensitivität bei der Detektion von unterrepräsentierten RNA-Transkripten aufweist (Zhumabayeva *et al.*, 2001).

In einer weiteren Studie konnte über RT-PCR gezeigt werden, dass über SMART generierte cDNA's im Vergleich zur RNA der Querschnitt der Genexpressionen aufrechterhalten wurde (Endege *et al.*, 1999).

Bei kleinen Tumoren ist es meist sehr schwierig eine ausreichende RNA-Menge für ein Genexpressionsanalyse zu erreichen. Hierzu wurde in einer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die SMART Effizienz durch die Zugabe von T4Gen-32 Protein um ca. 100% gesteigert werden kann (Oliva *et al.*, 2000, Villalva *et al.*, 2001). Der Bakteriophage spielt eine essentielle Rolle bei der DNA Replikation, -Rekombination und -Reparatur, indem es spezifisch an einzelsträngige DNA bindet und sie stabilisiert (Pant *et al.*, 2003, Jones *et al.*, 2004). Zudem ist bekannt, dass das T4Gen-32 Protein die Effizienz der Taq Polymerase, reversen Transkriptase und Telomerase erhöhen kann. Jedoch ist dabei der genaue Mechanismus noch unbekannt (Chandler *et al.*, 1998).

Studien belegten, dass mit der SMART-generierten cDNA auch Microarray-Analysen durchgeführt werden können (Vernon *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2003, Becker *et al.*, 2004).

IV.3 Bewertung der Methode der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung war bereits in unserem Labor mit den Ausgangsgeweben Nävi versus Primärmelanom etabliert worden (Hipfel *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass mit der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung vor allem starke Expressionsunterschiede detektiert werden können (Matz *et al.*, 1998).

Aus diesem Grund hat diese Methode im Vergleich zum Differential Display, RNA-Fingerprint, Microarrays oder SAGE (*serial analysis of gene expression*), weitere Methoden zur Identifizierung differentieller Genexpression, leichte Vorzüge bei tumorbiologischen Fragestellungen (Liang *et al.*, 1992, Welsh *et al.*, 1992). Zhang *et al.*, vermutet nämlich, dass Gene mit starken Expressionsunterschieden biologisch bedeutsamer sind (Zhang *et al.*, 1997).

Die Anwendung differentieller Techniken hat den Vorteil, dass weder Kandidatengene noch fehlerhafte Proteinprodukte oder beteiligte Chromosomenregionen bekannt sein müssen. Die Methode des Differential Displays erlaubt die vergleichende Hybridisierung von cDNA's zweier Zellpopulationen und kommt mit geringen RNA-Mengen aus (Liang *et al.*, 1992). Der Nachteil besteht darin, dass nur die 3'-Enden der mRNA's erfasst werden und somit eine Identifizierung des Gens erschwert sein kann. Ausserdem erhält man beim anschliessenden Screening der Klone viele falsch positive Klone. Die Ursache dafür ist, dass eine differentielle Displaybande mehrere verschiedene Sequenzen enthält (Callard *et al.*, 1994, Matz *et al.*, 1998, Broude *et al.*, 2002). Der Vorteil des Differential Displays liegt darin, dass cDNA's mehreren Gewebe zur gleichen Zeit verglichen werden können. Im Gegensatz zur PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung können somit aktivierte und inaktivierte Gene gleichzeitig dargestellt werden.

Ein Nachteil der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung ist, dass in der Regel 0,5-2µg RNA eingesetzt werden müssen. Dies konnte in dieser Arbeit mit der SMART-Methode umgangen werden. In der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung werden differentiell exprimierte Gene nicht physikalisch getrennt (Oligo (dT)₃₀ Latexbeads, Hydroxyapatit oder Streptavidin Biotin Säulen), sondern mittels Suppressions-PCR spezifisch angereichert (Diatschenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996).

Somit ist das Verfahren im Vergleich zur konventionellen Subtraktion weniger zeit- und arbeitsaufwendig, und es kann bis zu einer 5000fachen Anreicherung der unterrepräsentierten Transkripte mit Hilfe der Suppression-PCR kommen (Diatschenko *et al.*, 1996, Gurskaya *et al.*, 1996). Dabei rehybridisieren aus kinetischen Gründen häufig vorkommende differentielle Transkripte in der Regel mit sich selbst. Dadurch entstehen zwei identische Adaptoren an den cDNA Enden (siehe II.3.4). Als Folge tritt eine sogenannte Schlaufenbildung ein, die eine Primer Anlagerung und somit die Amplifizierung der cDNA Fragmente verhindert. Auf diese Weise kommt es zu einer Anreicherung der seltenen Transkripten, da ihre Anreicherung exponentiell erfolgt, während die Anreicherung des häufig vorkommenden Transkripten supprimiert wird.

In dieser Arbeit konnte ein erfolgreicher RsaI-Verdau gezeigt werden. Das Gelingen des RsaI-Verdau ist zur Herstellung glatter Enden für die anschliessende Adaptorligation essentiell. Auch zu lange cDNA's könnten die Hybridisierung nachteilig beeinflussen, da sie durch die Bildung von komplexen Sekundärstrukturen die Bindung ausreichender Mengen von Sonde an Matrize inhibieren könnten.

Eine Zerstückelung der cDNA in viele kleine Fragmente kann für den Erhalt der Repräsentation der Expression einzelner Gene vorteilhaft sein. Da einige cDNA's aus einer gemeinsamen Genfamilie stammen und somit ähnliche Sequenzen besitzen, können sie untereinander kreuzhybridisieren und den repräsentativen Querschnitt der Genexpressionen verfälschen (Diatchenko *et al.*, 1996).

Die PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung ist eine sehr sensitive Methode, da auch Transkripte mit weniger als 300-500 Kopien erfasst werden können. Problematisch bei solchen Transkriptmengen/Kopienzahl ist später die Detektionsgrenze bei dem anschliessendem Screeningverfahren.

Mit cDNA-Arrays- und Northern Blot- Hybridisierungen sind diese Transkripte oft nicht mehr zu detektieren, da ihre Anzahl unter der Detektionsgrenze ist oder sie liefern falsch positive Ergebnisse (Matz *et al.*, 1998, Osborne *et al.*, 2002). Dies wurde durch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Array-Hybridisierungen bestätigt. Der grösste prozentuale Anteil der Subtraktionsprodukte bei den Hybridisierungen zwischen Lymphknotenmetastasen und Primärmelanomen als auch zwischen Primärmelanomen und Lymphknotenmetastasen lieferte mit den Subtraktionssonden falsch positive Signale und mit den cDNA-Sonden negative Signale. Aus den je 320 generierten Klonen konnten bei den Lymphknotenmetastasen 267- und bei den Primärmelanomen 138 Klone über die Kolonie-PCR amplifiziert werden. Bei den Lymphknotenmetastasen erwiesen sich mit den Subtraktionssonden davon 25% (67 Klone) als bestätigt differentiell und bei den Primärmelanomen 4 % (6 Klone).

Eine Möglichkeit für den hohen Anteil an negativen Klonen beim Screeningverfahren mit den cDNA-Sonden anhand der Array-Hybridisierungen ist, dass mit dieser Methode diese Gene nicht detektiert werden konnten, da die entsprechenden cDNA's seltene Transkripte repräsentieren, die im Rahmen der Suppressions-PCR effizient amplifiziert wurden. Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass somit die Stärke der Suppressions-PCR im Rahmen der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung demonstrieren könnte.

Da sie eine exponentielle Anreicherung von seltenen cDNA's fördert, während sie die Anreicherung häufig vorkommender Transkripte supprimiert.

Da der Verdacht bestand, dass die Methode des Screeningverfahrens mittels Dot Blot nicht sensitiv genug war und der Anteil der differentiellen Klone beim Melanom zu gering war, wurden für die weiteren Screeningschritte mit den cDNA-Sonden falsch positive und verkehrt positive Klone verwendet. Auch bei der Lymphknotenmetastase wurden zusätzlich zu den 67 differentiell bestätigten Klonen 9 falsch positive Klone analysiert.

Dabei ergab sich folgendes Ergebnis: aus den 76 Klone von der Lymphknotenmetastase erwiesen sich am Ende 15% (11 Klone) und beim Melanom 12% (15 Klone) als differentiell bestätigt.

Es wird in einer Vielzahl von Studien belegt, dass die meisten Screeningverfahren nicht sensitiv genug sind, um die differentielle Genexpression zu bestätigen bzw. wenige Kopienzahlen zu detektieren. Beispielsweise in der Arbeitsgruppe von Eleveld-Trancikova konnten von 600 Klone lediglich 30 nach dem Screening als differentiell exprimiert bestätigt werden (Eleveld-Trancikova *et al.*, 2002).

Sensitivere Methoden wie beispielsweise die quantitative RT-PCR's hätten eventuell aus den falsch positiven und negativen Klonen differentielle cDNA's bestätigen können. In einer Studie von Gütgemann *et al.*, wurde für die Detektion differentieller Genexpression einer invasiven Melanomzelllinie (MelIm) die Microarray- (Atlas, Clontech) und die RT-PCR Analyse verwendet (Gütgemann *et al.*, 2001). Nach der Evaluierung der Array-Daten konnten 36 Gene als differentiell bestätigt werden. 26 (72%) dieser Gene erwiesen sich in der quantitativen RT-PCR Analyse als differentiell exprimiert (Gütgemann *et al.*, 2001).

Die Subtraktionseffizienz der Lymphknotenmetastasen- bzw. Primärmelanom cDNA wurde in dieser Arbeit mittels einer GAPDH-PCR getestet, dabei wurde die Häufigkeit spezifischer cDNA's vor und nach der Subtraktion ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass GAPDH, wie nach einer erfolgreichen Subtraktion erwartet wurde, vermindert vorlag. Aus der Lymphknotenmetastasen spezifischen cDNA Subtraktionsbank konnte eine Vielzahl von Genen, die in der Lymphknotenmetastase exprimiert sind, isoliert werden. 34 Sequenzen, die 21 verschiedene Gene repräsentieren, konnten in ihrer differentiell exprimierten Genexpression im Dot Blot bestätigt werden.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit der Kombination aus Laser Capture Microdissection, SMART-Kit und PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung differentielle Gene isoliert werden können.

Die Kombination dieser verschiedenen Methoden wurde bis jetzt nur in einer Arbeit durchgeführt (Diggle *et al.*, 2003). Hierbei wurde der Laminin Rezeptor 1 als überexprimiertes Gen in urothelialen Karzinomen gefunden. Als Ausgangsmaterial diente einerseits gesundes Gewebe und ein Karzinom im ersten Tumorstadium. Für die Gewebepräparation wurden 9µm dicke Kryostatschnitte von 10 Patienten angefertigt, um einen repräsentativen Querschnitt der Genexpressionen zu erhalten.

Da in dieser Arbeit das Vorhandensein von ausreichendem Patientenmaterial begrenzt war, wurden je 4 Primärmelanome und 4 Lymphknotenmetastasen für die Identifikation differentieller Genexpressionen verwendet. Die einzelnen Gewebsschnitte wurden ebenfalls, wie in dieser Arbeit beschrieben, über H&E angefärbt.

Ausserdem wurden bei Diggle *et al.*, einige Gefrierschnitte mit CK20 (Zytokeratin 20) markiert, um bestimmte Areale im Gewebe zu definieren (Diggle *et al.*, 2003). Dies garantiert die exakte Isolierung der erwünschten Zellen anhand der Laser Capture Microdissection.

Wenn man jedoch herkömmliche Färbungen wie beispielsweise H&E mit immunhistochemischen Färbungen vergleicht, konnte gezeigt werden, dass bei den immunhistochemischen Färbung stets eine Reduktion der RNA-Konzentration vorlag. Die Ursache hierfür waren die langen Waschschrte in wässrigen Lösungen (Fend *et al.*, 1999, Jin *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde für die exakte Bestimmung der einzelnen Melanomzellen vor der Laser Capture Microdissection H&E- und HMB 45-Färbungen an einzelnen Gewebsschnitten durchgeführt, sodass ebenfalls eine exakte Lokalisation bzw. Isolierung der Melanomzellen aus den Lymphknotenmetastasen und den Primärmelanomen möglich war.

Für die Isolierung der erwünschten Zellen, mit Hilfe der Laser Capture Microdissection, wurden 70000 Laserimpulse verwendet, d.h. 420000 Zellen wurden insgesamt isoliert. Eine so grosse Anzahl kann nur aus sehr grossen Tumoren isoliert werden. In dieser Arbeit waren die zur Verfügung gestellten Tumor sehr klein, sodass insgesamt je 4800-7200 reine Melanomzellen für die Primärmelanome und die Lymphknotenmetastasen isoliert werden konnten. Die RNA Extraktion erfolgte bei Diggle *et al.*, über einen Kit der Firma Flowgen, während die RNA Qualität über eine RT-PCR gemessen wurde und die RNA Quantität über Northern Blots bestimmt wurde. In der Regel lag die RNA Quantität zwischen 80-800ng. So hohe RNA Mengen können in der Regel nur aus grossen Tumoren isoliert werden.

Für die cDNA Herstellung, anhand des SMART-Kits, wurden 100 ng Gesamt-RNA verwendet (Diggle *et al.*, 2003). Nach der PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung wurden die cDNA's in den pGEM-T-Easy-Vektor kloniert und hundert gewonnene cDNA's wurden sequenziert (Diggle *et al.*, 2003). Dabei erwiesen sich 17% als Metabolismus-, 5% Zytoskelett-, 17% Zellsignal-, Zellwachstum- und Zelltransport-, 44% Translations-spezifische Gene und 15% der Gene waren in ihrer Funktion noch unbekannt.

Auch in dieser Arbeit wurden neben Translationsproteine, Transportproteine, Transkriptionsfaktoren, einem Adhäsionsprotein, einem Haushaltsgen, mitochondriale und ribosomale Produkte identifiziert. Bei den Translationsgenen waren unter anderem das L7 Ribosomenprotein vorhanden, dieses Protein wurde wie in dieser Arbeit ebenfalls als differentiell Genprodukt identifiziert. Zu den Metabolismus spezifischen Genen gehörten unter anderem das Cytochrom C Oxidase und die NADH Dehydrogenase 4, die ebenfalls in dieser Arbeit isoliert wurden.

Die differentielle Genexpression wurde anschliessend für zwei identifizierten Genen, Laminin Rezeptor 1 und TATI (*tumour-associated trypsin inhibitor*), anhand immunhistochemischen Färbungen, bestätigt. Dabei korrelierten beide Genexpressionen mit der Tumorprogression. Hierbei wurden 28 Tumore von 26 Patienten verwendet (Diggle *et al.*, 2003). Dies zeigt, dass durch Kombination dieser Methoden differentiell exprimierte Gene isoliert werden können.

Eine neue Methode, die zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene immer mehr Anwendung findet, ist die Microarray Analyse. Sie wurde bereits in einer Reihe von Karzinomen wie z.B. Brust, Lunge, Kolon und malignen Melanom zur Isolierung Tumor spezifischer Gene verwendet. Auch die Kombination aus Laser Capture Microdissection/SMART/PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung und Microarray Analyse wurde in vielen Studien angewendet, um schneller und effizienter differentiell exprimierte Gene zu identifizieren (Bangur *et al.*, 2002, Jiang *et al.*, 2002, Luzzi *et al.*, 2003 Alonso *et al.*, 2004). Der Nachteil einer Microarray Chip Analyse ist, dass die meisten erhältlichen Chips mit bekannten Oligonukleotiden gespottet sind, somit können keine neuen Gene identifiziert werden. Zusätzlich ist eine Microarray Analyse sehr kostenintensiv und die neuerworbene Datenfülle muss über einen Statistiker analysiert werden.

IV.4 Isolierung tumorrelevanter Gene im malignen Melanom

IV.4.1 Identifizierung differentiell exprimierte Gene in der Lymphknotenmetastase

Die Identifikation der differentiell exprimierten Lymphknotenmetastasen (LKM)-Transkripte war erfolgreich. Alle 11 differentiell bestätigten Klone, die bei der Hybridisierung mit den cDNA Sonden detektiert wurden, sind sequenziert worden. Zusätzlich wurden noch 23 differentiell bestätigt exprimierte Klone, die durch die Hybridisierung mit den Subtraktionssonden identifiziert wurden, sequenziert.

Es wurden in der LKM eine Reihe von Genen identifiziert, die im Metabolismus des malignen Melanoms eine tragende Rolle spielen. Anhand der hohen Teilungsrate und der erhöhten Transkription von Stoffwechselgenen bei den metastasierenden Zellen lässt sich dieser hohe Anteil an diesen Transkripten erklären. Es wurde für eine Reihe anderer Karzinome gezeigt, dass bei der Isolierung metastatisch relevanter Gene ebenfalls viele Gene identifiziert wurden, die im Stoffwechsel involviert sind (Vaarala *et al.*, 1998, Diggle *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurden mitochondriale und ribosomale Produkte, die beim Metabolismus eine Rolle spielen, identifiziert. Zu den identifizierten mitochondrialen Proteinen gehören: Cytochrom C oxidase I (MTCO1), NADH Dehydrogenase 4 (MTND4), 183- und 526- isolate Mitochondrium. MTCO1 und MTND4 spielen eine Rolle im Elektronentransport.

183- und 526- isolate Mitochondrium sind dagegen im Citratzyklus und im Fettsäureabbau beteiligt (Shoffner and Wallace *et al.*, 1995, Mishmar *et al.*, 2003, Popovic *et al.*, 2004 und Williams *et al.*, 2004).

In einer Studie von Lutz-Bonengel *et al.*, wurde MTND4 auf mögliche Polymorphismen untersucht, um variable Positionen zu identifizieren. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass in 1200 Basen des MTND4 Gens 28 Positionen variabel sind. Basenaustausche im MTND4 Gen waren dabei meist in den Regionen 11719, 11251, 11467 und 11812 zu beobachten (Lutz-Bonengel *et al.*, 2003). Dabei erwies sich der Basenaustausch in Position 11719 für SNP (*single nucleotide polymorphism*)-Analysen nützlich, um später bei Aufklärungen gerichtlicher Entscheidungen wie beispielsweise Vaterschaftsklagen zu helfen (Lutz-Bonengel *et al.*, 2003). Die Auswirkung dieser Basenaustausche wurde jedoch nicht untersucht.

Bei den ribosomalen Proteine handelt es sich um das L21 und L7, beide sind für die Cap-abhängige und Cap-unabhängige Translation verantwortlich. Bei der Cap-abhängigen Translation sind sie an der GTP Hydrolyse, Bindung der 60S Ribosomenuntereinheit an den Translationinitiationskomplex und bei der Freilassung der 40S- und der 60S Untereinheit aus

dem 80S Ribosom beteiligt. Hingegen sind bei der Cap-unabhängigen Translation L7 und L21 bei der Abkopplung der tRNA Polypeptidkette und der Bildung neuer Peptidbindungen beteiligt. Ausserdem unterstützt eine L7-Dimerisierung die DNA- und RNA Bindung (Bortoluzzi *et al.*, 2001, Petter *et al.*, 1994, Kasai *et al.*, 2003 und Hemmerich *et al.*, 1993). Es wurde gezeigt, dass das L7 Protein posttranslational modifiziert wird, dazu gehören Acetylierungen bzw. interne Methylierungen oder Hydroxylierungen (Odintsova *et al.*, 2003).

Daneben wurden Translationsproteinen, Transportproteine, Transkriptionsfaktoren, ein Adhäsionsprotein und ein Haushaltsgen isoliert. Zu den Translationsproteinen zählen das Cappingprotein muscle Z-line alpha 1 (CAPZA1) und der eukaryotische translation-elongation-factor-1alpha (EF1A1). Durch die Bindung an die Enden der Aktinfilamente reguliert CAPZA1 das Wachstum der Aktinfilamente (Barron-Casella *et al.*, 1995, Hutchings *et al.*, 2003).

EF1A ist an der Bindung von Aminoacyl-tRNAs an die 80S-Ribosomen involviert, dabei wird GTP zu GDP hydrolysiert (Brands *et al.*, 1986, Ditzel *et al.*, 2000). Ausserdem agiert EF1A als Bindungspartner für Exportin 5 (Calado *et al.*, 2002).

Als Transkriptionsfaktoren (TF) wurden YB-1, auch bekannt als NSEP-1 (*nuclease sensitive element binding protein-1*) oder dbpB (DNA-binding protein B) und der Nuklear Rezeptor Koaktivator 4 (Androgen rezeptor: ARA 70) gefunden.

YB-1 gehört zu einer Proteinfamilie, die durch eine Kälteschockdomäne gekennzeichnet ist (Sakura *et al.*, 1988). YB-1 spielt bei eine Reihe von zellulären Funktionen wie beispielsweise die Regulation der Transkription und Translation, DNA-Reparatur, Immunsuppression, Signaltransduktion, Zellproliferation, Apoptose, Zytostatikaresistenz (MDR), Invasion und Metastasierung zahlreicher Tumoren eine entscheidende Rolle (Ohga *et al.*, 1998, Swamynathan *et al.*, 2002, Jurchott *et al.*, 2003, Holm *et al.*, 2004). Im Mamma- und Lungenkarzinom liegt eine nukleäre Translokation von YB-1 vor. Hierbei korreliert die zunehmende nukleäre Proteinkonzentration mit einer schlechteren diagnostischen Prognose (Janz *et al.*, 2002, Saji *et al.*, 2003, Gessner *et al.*, 2004).

Inwiefern YB-1 mit der Melanomenstehung und -progression zusammenhängt, ist jedoch noch weitgehend unbekannt. YB-1 besitzt eine N-terminale Domäne, die die Transkription zahlreicher Gene reguliert, und eine C-terminale Domäne, die mit anderen Proteinen dimerisieren kann, wie beispielsweise mit AP-2 oder p53 (Mertens *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2003).

YB-1 bindet ausserdem an die Kontrollregion zahlreicher Gene, die bei der Tumorinitiation und Progression beteiligt sind z.B. EGF und MMP-2. YB-1 wird in einer Reihe Cisplatin-resistenter Tumorzelllinien überexprimiert, dabei bindet YB-1 an die cisplatinmodifizierte DNA und interagiert mit einem Protein aus dem DNA-Reparaturmechanismus (Shibahara *et al.* 2004). Zudem wirkt YB-1 inhibierend auf die MHC-Klasse-II-Expression (Didier *et al.*, 1988, McDonald *et al.*, 1995) und die Expression des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF, Coles *et al.*, 1996), was eine Immunsuppression bewirkt.

Der Nuklear Rezeptor Koaktivator 4 (Androgen Rezeptor ARA 70) ist ein Mitglied der Steroid Superfamilie, und in Gegenwart von Testosteron verstärkt der Androgen Rezeptor die transkriptionelle Androgen-Rezeptor-Aktivität. (Yeh *et al.*, 1996, Zhou *et al.*, 2002, Culig *et al.*, 2003, Cronauer *et al.*, 2003, Rahmann *et al.*, 2003 und Thin *et al.*, 2003). Der Androgen rezeptor ARA 70 kann sowohl an die C- als auch an die N-terminale Domäne von Androgen binden (Zhou *et al.*, 2002).

Sechs auf ihre Funktion unbekannte Gene wurden in dieser Arbeit identifiziert. Dazu gehört der Bac Klon RP 11-339 H12, Bac Klon RP 11-306 M1, OK/SW-cl.82 mRNA, IMAGE Klon: 3952593, IMAGE Klon: 3912859 und IMAGE Klon: 4769127.

IV.4.1.1 Bewertung der Bestätigung differentieller Genexpression durch Northern Blots

Vier der identifizierten differentiell exprimierten Genprodukte wurden aufgrund ihres zum Teil bekannten/unbekannten Funktionsprofils und interessanten Expressionsprofil anhand von Northern Blot Analysen näher untersucht. Da kein Nativgewebe in der verfügbaren Zeit vorhanden war, wurden die Northern Blot Analysen an Melanomzelllinien unterschiedlicher Wachstumsstadien durchgeführt.

Der Laminin Rezeptor 1 ist ein Adhäsionsmolekül und wurde in einer Vielzahl metastatischer Karzinome gefunden (Gehlsen *et al.*, 1989, Vacca *et al.*, 1993, Ding *et al.*, 2004). Dem LAMR1 wird eine essentielle Rolle bei der Zelladhäsion, Zellproliferation, Zellkommunikation, Angiogenese, Signaltransduktion, Tumorprogression und Metastasierung zugesprochen (Gloc *et al.*, 1999, Donadlson *et al.*, 2001, Fulop *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2002, Asano *et al.*, 2004). Jedoch ist die genaue Rolle des Laminin Rezeptors 1 beim malignen Melanom noch unbekannt.

Der 67kDa Laminin Rezeptor 1 konnte in jeder verwendeten Zelllinie: in den radial wachsenden Zelllinien WM 1552, WM 35 und IGR 39, in den vertikal wachsenden Zelllinien WM 793 und WM 115, in den metastatischen Zelllinien SK-Mel 19, SK-Mel 28 und M5 und in den hochaggressiven Zelllinien WM1205 LU und WM 451 LU detektiert werden.

Zusätzlich konnte eine RNA-Expression des Laminin Rezeptors 1 in den Fibroblasten und Keratinozyten beobachtet werden. Vacca *et al.*, zeigte, dass eine Laminin Rezeptor 1 Expression zwar in atypischen Nävi vorkommt, aber in der Regel mit der Tumorprogression des malignen Melanoms korreliert (Vacca *et al.*, 1993). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Das stärkste Signal war bei der vertikal wachsenden Tumorzelllinie WM 793 zu beobachten.

Der 37kDa-Laminin Rezeptor 1, welches auch als Ribosom assoziiertes Protein p40 bekannt ist, wird als Vorläuferprotein vom 67-kDa LAMR1 angesehen (Ardini *et al.*, 1998, Jackers *et al.*, 1996). Jedoch ist der genaue Mechanismus für die Bildung des 67-kDa LAMR1 aus dem Vorläuferprotein noch unbekannt (Rao *et al.*, 1989, Buto *et al.*, 1998). Die LAMR1-Expression wird durch p53 reguliert (Modugno *et al.*, 2002). Zudem wird der LAMR1 Rezeptor mit dem Integrin $\alpha 6$ koexprimiert und koreguliert (Ardini *et al.*, 1997). Dies führt zu der Vermutung, dass der LAMR1 in der Regulation oder Stabilisierung des Laminins mit den $\alpha 6\beta 4$ oder $\alpha 6\beta 1$ Integrinen beteiligt ist.

In urothelialen Karzinomen wurde der LAMR1 als überexprimiertes Gen isoliert, wobei die LAMR1-Expression mit der Tumorprogression korrelierte. Für die Analyse kamen die Methoden Laser Capture Microdissection, SMART-Kit und PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung zur Anwendung (Diggle *et al.*, 2003).

In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im Laminin Rezeptor 1-Gen für die rechte Herzkammer Dysplasie in Mäusen verantwortlich ist, indem es die Genexpression der Kardiomyzyten ändert. Für die Degenerierung der Kardiomyzyten interagiert der Laminin Rezeptor 1 dabei mit dem Heterochromatin Protein 1 (Asano *et al.*, 2004). Ausserdem konnte Givant-Horwitz *et al.*, zeigen, dass der Laminin Rezeptor 1 in neoplastischen Zellen überexprimiert ist, und dass die Laminin Rezeptor 1 Expression mit dem Invasions- und Metastasierungspotential korreliert (Givant-Horwitz *et al.*, 2004). Anhand einer Laminin Rezeptor 1 Transfektion an der metastatischen Melanomzelllinie A375SM konnte eine reduzierte Bindung an Laminin und eine reduzierte Invasion im Matrigel beobachtet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Laminin Rezeptor 1 die Dephosphorylierung von ERK, JNK und MAPK und die Aktivierung von MMP-2 induziert (Givant-Horwitz *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde aufgrund der bekannten Literaturangaben der Laminin Rezeptor 1 für nähere Analysen ausgesucht. Hierzu wurden auf Proteinebene die Laminin Expression in unterschiedlichen Melanomzelllinien anhand FACS-Analysen untersucht.

Für die Expressionsanalyse im Gewebe wurden immunhistologische Färbungen und *in situ* Hybridisierungen durchgeführt.

Für die FACS-Analyse wurden sowohl die radial wachsenden Zelllinien WM 1552 und IGR 39 als auch die hochaggressiven metastatischen Zelllinien WM 1205 LU und WM 451 LU verwendet. In der verfügbaren Zeit gab es keine IgM Isotypenkontrolle, zur Überprüfung unspezifischer Bindung und keine Positiv-Kontrolle. Lediglich 33% der Zellen der radial wachsenden Zelllinie WM 1552 zeigte eine Laminin Rezeptor 1 Proteinexpression, bei den anderen Zelllinien konnte kaum Protein detektiert werden. An sich kann keine konkrete Aussage über die Laminin Rezeptor 1 Proteinanalyse getroffen werden. Es kann sein, dass die verwendeten Melanomzelllinien IGR 39, WM 1205 LU und WM 451 LU keinen Laminin Rezeptor 1 aufweisen. Die IgM-Antikörper (AK) weisen eine geringere Affinität als z.B. IgG-AK auf. Zusätzlich könnte die ungewöhnlichen Quartärstruktur des Laminin Rezeptor 1-IgM's, fünf aneinandergelagerte Antikörper der allgemeinen Struktur bilden ein Pentamer, eventuell die Bindung des IgM-Moleküls an die Zelloberfläche erschwert haben.

Für den Nachweis der Lokalisation des Laminin Rezeptors 1 im Gewebe wurden immunhistochemische Färbungen an Paraffin eingebettetem Gewebe wie z.B. Haut, Nävi (compound- und dysplastischer Nävi), Melanome (noduläres-, akralentiginöses- und superfiziell spreitende- Melanome) und Hautmetastasen angefertigt. Als Positiv-Kontrolle diente in Paraffin eingebettetes Gewebe eines Mamma-Karzinoms. An sich kann auch hier keine konkrete Aussage getroffen werden, da lediglich die Haarfollikelzellen in allen Geweben unspezifisch angefärbt wurden. Ansonsten waren über das gesamte Gewebe Farbstoffpräzipitate zu sehen. Die immunhistochemische Analyse konnte in der verfügbaren Zeit nur zweimal durchgeführt werden, somit konnte die Immunfärbung nicht etabliert werden.

Für die Analyse der Laminin Rezeptor 1-RNA Expression im Gewebe wurden *in situ* Hybridisierungen an unterschiedlichen Gewebsschnitten wie beispielsweise gesunde Haut, compound Nävi, akralentiginöses-, noduläres- Nävus, superfiziell spreitendes Melanom und Hautmetastasen angefertigt. Bei der *in situ* Hybridisierung konnte keine Laminin Rezeptor 1 Expression in den einzelnen Geweben detektiert werden. Auch hier zeigten die einzelnen Gewebsschnitte unspezifische Farbstoffpräzipitate. In der verfügbaren Zeit konnte die *in situ* Hybridisierung nur einmal durchgeführt werden, somit konnte die *in situ* Hybridisierung nicht etabliert werden.

Auch die anderen 3 Gene zeigten im Northern Blot Expressionsprofile, welche die Ergebnisse der cDNA Array Hybridisierung bestätigen. Das Protein YWHAQ, auch bekannt unter dem Namen 14-3-3 theta, spielt eine Rolle bei der GTPasen vermittelten Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle und bei der Apoptose (Petrocelli *et al.*, 2000, Zimmermann *et al.*, 2000). Die stärkste Expression für dieses Protein konnte in der metastatischen Zelllinie WM 451 LU detektiert werden. Zusätzlich wurde YWHAQ stark in den Zelllinien der radialen- bzw. vertikalen Wachstumsphase exprimiert.

Das Protein YWHAQ ist ein Mitglied der 14-3-3 Familie, welche Tyrosin- und Tryptophan-Hydroxylasen aktivieren und Protein Kinase C inhibieren (Chaudhary *et al.*, 2000). Das 14-3-3 theta Gen wird im malignen Melanom durch DNA-Schäden induziert, und ist für einen stabilen G2 Zellzyklusarrest in den Epithelzellen verantwortlich (Petrocelli *et al.*, 2000). Das 14-3-3 theta Gen wird durch *p53* reguliert, wobei seine Expression durch Methylierung der CpG-Inseln im Promotor in einer Vielzahl von Karzinomen herunterreguliert wird (Hermeking *et al.*, 2003).

In einer Studie von Nomura *et al.*, konnte gezeigt werden, dass das zytoplasmatische 14-3-3 theta Protein an Bax bindet und nach einem apoptotischen Signal Bax wieder freigibt. Zusätzlich inhibierte eine 14-3-3 theta Überexpression die Bax-induzierte Apoptose (Nomura *et al.*, 2003). Es ist bekannt, dass die Protein kinase C-zeta (PKC-zeta) Raf-1 phosphorylieren und somit aktivieren kann, dabei werden die Interaktionen zwischen PKC-zeta und Raf-1 durch 14-3-3 theta, beta und zeta *in vivo* und *in vitro* vermittelt (van Dijk *et al.*, 1997, van der Hoeven *et al.*, 2000).

Weitere Studien belegten, dass ein Mitglied der 14-3-3 Familie, nämlich 14-3-3 σ , in einer chemoresistenten Mewo-Zelllinie überexprimiert wird (Sinha *et al.*, 2000). Ein Verlust der 14-3-3 σ Expression führt dazu, dass Tumorzellen sensitiver gegen Chemotherapeutika werden. Somit könnte eine Inhibition der 14-3-3 σ -Expression einen neuen Therapieansatz darstellen. Hierzu wird bereits UCN-01, ein 14-3-3 σ Inhibitor, klinisch geprüft (Hermeking *et al.*, 2003). Die 14-3-3 σ -Expression ist auf die Epithelzellen beschränkt, und steigt im Laufe der Differenzierung. Zudem führt eine Inaktivierung von 14-3-3 σ zu einer Immortalisierung der Keratinozyten. Dies führt zu der Vermutung, dass 14-3-3 σ als Tumorsuppressor agieren könnte (Hermeking *et al.*, 2003). Eine weitere Studie zeigte, dass durch die Bindung der 14-3-3 Proteine an p27 Akt die Zellzyklusprogression verstärken kann (Fujita *et al.*, 2002).

Importin 11 agiert als Transportprotein von verschiedenen Substraten in den Nukleus (Scott *et al.*, 2000) und konnte in allen untersuchten Zelllinien exprimiert werden. Tendenziell konnte eine leichte Korrelation der Expression mit der Tumorprogression detektiert werden.

Am stärksten wurde Importin 11 in den metastatischen Zelllinien exprimiert, dabei war das stärkste Signal in der Zelllinie M5 zu beobachten.

Der Transport von Proteinen und RNA's vom Kern ins Zytoplasma durch die Kernporenkomplexe (NPC = *nuclear pore complex*) ist ein komplexer signalabhängiger Prozess, dabei besitzen alle Importine ein Kernlokalisierungssignal (NLS = *nuclear localization signal*, Gorlich *et al.*, 1997). Der Transport wird überwiegend von Mitgliedern der Importin β -Familie nukleärer Transportrezeptoren, zu denen auch Importin 11 gehört, vermittelt. Diese Rezeptoren verfügen über die Eigenschaft über ihre N-terminalen Domäne mit GTP gebundenem Ran zu interagieren. Diese Eigenschaft ist grundlegend für die Kontrolle des im jeweiligen Kompartiment spezifischen Bindens bzw. Freisetzens von Transportsubstraten.

Eine wichtige Voraussetzung für die Funktion eines Importrezeptors ist seine Fähigkeit, den Transportliganden im Zytoplasma spezifisch zu binden, und in Abhängigkeit von der Bindung des Ran-GTP im Kern wieder zu dissoziieren, um rezyklisieren zu können. Es konnte gezeigt werden, dass das ribosomale Protein L12 durch Importin 11 in den Nukleus *in vivo* und *in vitro* transportiert wird. Hierbei inhibiert UbcM2 die Bindung von L12 an Importin 11 und den Transport in den Nukleus (Plafker *et al.*, 2002).

Der unbekannte Bac Klon RP11-339 H12 war in den metastatischen Zelllinien stark exprimiert, wie aus dem vorangegangenen Screening zu erwarten war, da es aus Lymphknotenmetastasengewebe isoliert wurde. Dabei war sein stärkstes Signal in der Zelllinie radial wachsenden Zelllinie IGR 39 und in der metastatischen Zelllinie SK-Mel 19. Aus der Datenbank ist jedoch bekannt, dass es eine Vielzahl homologe Gene zum Bac Klon RP11-339 H12 gibt, die in vielen Geweben exprimiert werden. Zusätzlich wurden Northern Blots an den unbekanntenen Klonen: IMAGE 4769127, IMAGE 3912859 und Bac RP11-306 M1 durchgeführt. Die Signale waren für eine Auswertung allerdings zu schwach. Dies konnte nicht an der Qualität bzw. Integrität der RNA liegen, da eine Hybridisierung zwischen der 28S-Sonde aller aufgetragenen RNA's aus den verschiedenen Zelllinien und der 28S- bzw. 18S-RNA möglich war. Somit lag der Grund für die schwache Expression-Detektion bei den entsprechenden Sonden.

Beim IMAGE Klon: 4769127 konnte ein Signal bei ca. 4,18kb detektiert werden, jedoch war nach Literaturangabe aber eine Bande bei 2,1kb zu erwarten. Nach Überprüfung der Sequenz konnte der Klon als IMAGE: 4769127 bestätigt werden, eventuell handelt es sich hier um eine weitere Spleissvariante. Tendenziell konnte für den möglichen IMAGE Klon: 4769127 gezeigt werden, dass es in einigen Zelllinien stärker exprimiert wird wie in anderen. Die stärkste Expression war in den metastatischen Zelllinien WM 451 LU und SK-Mel 28 zu sehen. Zusätzlich konnte eine Expression in den Keratinozyten, Melanozyten und in den Zelllinien IGR 39, WM 1552, WM 793, WM 115 detektiert werden.

Beim Bac Klon RP11-306 M1 konnte ein Signal bei 3,4kb in den metastatischen Zelllinien M5, WM 1205 LU und WM 451 LU detektiert werden.

Für alle unbekannte Klone der Lymphknotenmetastase gibt es bis dato noch keine Daten bezüglich ihrer Funktion bei der Progression des malignen Melanoms. Bei keinem der hier identifizierten Gene konnte eine direkte Beteiligung an der Progression des malignen Melanoms nachgewiesen werden.

Für die Aufklärung ihrer möglichen Beteiligung als pathogenetische Faktoren beim malignen Melanom sind umfangreichere Analysen der einzelnen für Lymphknotenmetastasen spezifischen Kandidatengen notwendig.

Zudem muss zur Bestätigung der differentiellen Genexpression der hier ermittelten Kandidatengen ihr Expressionsmuster in verschiedenen Geweben wie beispielsweise Haut, Nävi und Melanom detektiert werden. Die Expressionsprofile der einzelnen Gene im Gewebe konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht analysiert werden.

Ziel sollte es sein, die interessanten Gene in bestehende Konzepte der Tumorprogression des malignen Melanoms einzugliedern. Dadurch könnten neue Mechanismen aufgezeigt werden, welche dem Tumor unkontrolliertes Wachstum, Invasion, Angiogeneseinduktion, Metastasierung und Resistenz gegen die Immunabwehr ermöglichen. Dies kann zu einem besseren Verständnis über die komplexe Biologie des malignen Melanoms und eventuelle neue Therapieansätze führen.

IV. 4.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene im Primärmelanom

Es sind keine Ergebnisse zu den Melanomsequenzen vorhanden, obwohl die eingesetzte DNA-Konzentration stets ausreichend war. Dies wurde über geeignete Restriktionsverdau an den verschiedenen Minipreps überprüft und in der Regel wurden 200ng-1µg DNA für die Sequenzreaktionen eingesetzt. Insgesamt war jedoch in dieser Arbeit eine niedrige Klonierungseffizienz bei den Melanomklonen zu beobachten.

Wie bereits in der Kolonie-PCR gezeigt waren die Insertgrößen bei den meisten Primärmelanomklonen gleich, dabei lagen die Insertgrößen in der Regel zwischen 200-300 Basenpaaren. Nur sehr wenige Klone zeigten unterschiedliche grosse Transkripte. Zusätzlich waren die Klone auf der LB-Agarplatte nach der Transformation sehr klein und die Platte war dicht bewachsen, was auf Microsatelitenbildung hindeutet. Es könnte sein, dass die verwendete Primärmelanom-RNA für die Identifikation differentieller Gene nicht in Ordnung gewesen ist. Eine weitere Vermutung ist, dass nur wenige unterschiedlichen Transkripte im Primärmelanom versus Lymphknotenmetastase vorhanden sind. Bis heute sind keine Daten über die Identifikation differentieller Genexpressionen im Primärmelanom versus Lymphknotenmetastasen bekannt.

IV.5 Zusammenfassung

Die Progression des malignen Melanoms wird von spezifischen Veränderungen der Genexpressionsmusters begleitet. Somit dient die Analyse der differentiellen Genexpression der Aufklärung molekularer Mechanismen in der Pathogenese des malignen Melanoms.

In dieser Arbeit gelang unter Verwendung der Laser Capture Microdissections Methode die Isolierung reiner Melanomzellen aus Primärtumor- bzw. Lymphknotenmetastasen Gewebe für die anschließende Identifizierung differentiell exprimierter Gene. Durch das Poolen von isolierter RNA aus je vier Primärmelanom bzw. aus je vier Lymphknotenmetastasen können individuelle Expressionsschwankungen ausgeglichen bzw. kompensiert werden. So können Gene identifiziert werden, die bei einer Mehrzahl der Patienten differentiell exprimiert sind. Eine ausreichende cDNA Quantität wurde mit Hilfe des SMART-Kit erreicht. Die PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung wurde in zwei verschiedenen Richtungen durchgeführt, d.h. einmal agierten die aus Lymphknotenmetastasen isolierten cDNA's als Tester und die aus Primärmelanom gewonnen cDNA's als Treiber. Beim zweiten Ansatz fungierten die aus Primärmelanomen gewonnenen cDNA's als Tester und die aus Lymphknotenmetastasen isolierten cDNA's als Treiber. Die PCR-Amplifikate wurden kloniert, und je 320 Klone generiert. Aufgrund der geringen Klonierungseffizienz konnten keine Primärmelanom spezifischen Gene isoliert werden. In einem zweifachen Screeningverfahren mittels Dot Blot bestätigten sich 34 Lymphknotenmetastasen Klone als differentiell exprimiert. Die 34 Lymphknotenmetastasen spezifischen Sequenzen, repräsentierten 21 verschiedene differentiell bestätigt exprimierte Genen. Die meisten Gene waren dabei am Metabolismus des malignen Melanoms beteiligt. Die identifizierten Gene sind potentielle Faktoren bei der Pathogenese des Melanoms: die essentielle Rolle des 67kDa Laminin Rezeptor 1 bei der Metastasierung und Invasion in verschiedenen Karzinomen ist in einer Reihe von Studien belegt worden. Jedoch sind genaue Daten über die Funktion des LAMR1 beim malignen Melanom bisher unbekannt. Das Protein YWHAQ spielt eine Rolle bei der Signaltransduktion, Importin 11 agiert als Transportprotein von Substraten in den Nukleus und das unbekannte Bac Klon RP11-339 H12 war, wie aus dem vorangegangenen Screening zu erwarten war, stark in der metastatischen Zelllinie SK-Mel 19 exprimiert. Sechs Gene zeigten jedoch noch unbekannte Expressions- und/oder Funktionsprofile. Vier Gene wurden ausgewählt, um die Ergebnisse in Northern Blots zu verifizieren, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Regulation der Genexpression der einzelnen Gene und der Progression des malignen Melanoms aufzudecken. Alle Gene zeigten dabei keine deutliche Korrelation mit der Tumorprogression bei den verwendeten Melanomzelllinien.

V Literatur

- Abendroth A.**, Slobedman B., Lee E., Mellins E., Wallace M., Arvin AM (2000). Modulation of major histocompatibility class II protein expression by varicella-zoster virus. *J. Virol.* **74**: 1900-1907
- Adjei AA (2001)**. Blocking oncogenic Ras signalling for cancer therapy. *J. Nat. Cancer Instit.* **83**: 1062-1074
- Akasaka T.**, van Leeuwen RL., Yoshinaga IG., Mihm MC., Byers HR (1995). Focal adhesion kinase (p125^{FAK}) expression correlates with motility of human melanoma cell lines. *J. Invest. Dermatol.* **16**: 104-108
- Akiyoshi S.**, Inoue H., Hanai J., Kusanagi K., Nemoto N., Miyazono K., Kawabata M (1999). c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through interaction with smads. *J. Biol. Chem.* **274**: 35269–35277
- Alonso SR.**, Ortiz P., Pollan M., Perez-Gomez B., Sanchez L., Acuna MJ., Pajares R., Martinez-Tello FJ., Hortelano CM., Piris MA., Rodriguez-Peralto JL (2004). Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: A tissue microarray-based study. *J. Pathol.* **164**: 193-203
- Altschul SF.**, Madden TL., Schaffer AA, Zhang J., Zhang K., Miller W., Lipman DJ., Gappes (1997). BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* **25**: 3389-3407
- Ambrosini G.**, Adida C., Sirugo G., Altieri DC (1998). Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J. Biol. Chem.* **273**: 11177-111782
- Anderson, S.**, Bankier, AT., Barrell, BG., de Bruijn, MHL., Coulson, AR., Drouin, J., Eperon, IC, Nierlich, DP., Roe, BA., Sanger, F., Schreier, PH., Smith, AJH., Staden, R., Young, IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465
- Andrews, RM.**, Kubacka, I., Chinnery, PF., Lightowlers, RN., Turnbull, DM. and Howell, N (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **23**: 147
- Aoyagi K.**, Tatsuta T., Nishigaki M., Akimoto S., Tanabe C., Omoto Y., Hayashi S., Sakamoto H., Sakamoto M., Yoshida T., Terada M., Sasaki H (2003). A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem. Biophys. Res.* **300**: 915-920
- Ardini E.**, Tagliabue E., Magnifico A., Buto S., Castronovo V., Colnaghi MI., Menard S (1997). Co-regulation and physical association of the 67-kDa monomeric laminin receptor and the alpha6beta4 integrin. *J. Biol. Chem.* **272**: 2342-2345
- Ardini E.**, Pesole G., Tagliabue E., Magnifico A., Castronovo V., Sobel ME., Colnaghi MI., Menard S (1998). The 67-kDa laminin receptor originated from a ribosomal protein that acquired a dual function during evolution. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1017-1025
- Armstrong BK.**, Kricker A (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **63**: 8-18
- Arnaut MA (2002)**. Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion. *Immunological Reviews* **186**: 125-140
- Asano Y.**, Takashima S., Asakura M., Shintani Y., Liao Y., Minamino T., Asanuma H., Sanada S., Kim J., Ogai A., Fukushima T., Oikawa Y., Okazaki Y., Kaneda Y., Sato M., Miyazaki J., Kitamura, S., Tomoike H., Kitakaze M., Hor, M. (2004). Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nature Genet.* **36**: 123-130
- Baldi A.**, Santini D., Russo P., Caricala C., Amantea A., Picaro M., Tatangelo F., Botti G., Dragonetti E., Murace R., Tonini G., Natali PG., Baldi F., Paggi MG (2004). Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Exp. Dermatol.* **13**: 93-97
- Bale SJ.**, Dracopoli NC., Tucker MA (1989). Mapping the gene for hereditary cutaneous melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. *N. Eng. J. Med.* **320**: 1367-1372
- Bangur CS.**, Switzer A., Fan L., Marton MJ., Meyer MR., Wang T (2002). Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinomas using suppression subtractive hybridisation and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene* **21**: 3814-3825
- Bar-Eli M (1997)**. Molecular mechanisms of melanoma metastasis. *J. Cell Physiol.* **173**: 275-278
- Bar-Eli M (1999)**. Role of interleukin-8 in tumour growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* **67**: 12-18
- Bar-Eli M (1999)**. Role of AP-2 in tumour growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **18**: 377-385

- Bar-Eli M (2001).** Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor *Pigment Cell Res.* **14:** 78-85.
- Barnes WM (1994).** PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc. Acad. Sci. USA* **91:** 2216-2220
- Barnhill RL., Xiao M., Graves D., Antoniades HN (1996).** Expression of platelet-derived growth factor (PGGF)-A, PDGF-B and the PDGF-alpha receptor, but not the PDGF-beta receptor, in human malignant melanoma in vivo. *Br. J. Dermatol.* **135:** 898-904
- Barron-Casella EA., Torres MA., Scherer SW., Heng HHQ., Tsui LC and Casella JF (1994).** Sequence Analysis and Chromosomal Localization of human cap z. *Biol. Chem.* **270:** 21472-21479
- Bastian B., LeBoit P., Pinkel D (2000).** Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am. J. Pathol.* **157:** 967-972
- Battle E., Sancho E., Franci C., Domínguez D., Monfar M., Baulida J., de Herreros AG (2000).** The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Cell Biol.* **2:** 84-89
- Bauer J., Garbe C (2003).** Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res.* **16:** 297-306
- Bauer J., Carbe C (2004).** Risk estimation for malignant transformation of melanocytic nevi. *Arch. Dermatology* **140:** 127
- Baugh LR., Hill AA., Brown EL., Hunter CP (2001).** Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nuc. Acids. Res.* **29:** 1-9
- Becker B., Roesch A., Hafner C., Stolz W., Dugas M., Landthaler M., Vogt T (2004).** Discrimination of melanocytic tumours by cDNA array hybridization of tissues prepared by laser pressure catapulting. *J. Invest. Dermatol.* **122:** 361-168
- Becker D., Meier CB., Heryln M (1989).** Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligonucleotides targeted against basic fibroblast growth factor. *EMBO J.* **8:** 3685-3691
- Becker D., Johnson DE., Lee PL., Rodeck U., Herlyn M (1997).** Inhibition of the FGF receptor 1 (FGFR-1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition or proliferation and signs indicative of differentiation. *Oncogene* **7:** 2303-2313
- Bedogni B., O'Neil MS., Welford SM., Bouley DM., Giaccia AJ., Denko NC., Powell MB (2004).** Topical treatment with inhibitors of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt and Raf/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway reduces melanoma development in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* **64:** 2552-2560
- Berking C., Takemoto R., Satyamoorthy K., Elensitsas R., Herlyn M (2001).** Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin. *American J. Pathol.* **158:** 943-953
- Berking C., Takemoto R., Schaidt H., Showe L., Satyamoorthy K., Robbins P., Herlyn M (2001).** Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodelling. *Cancer Res.* **61:** 8306-8316
- Berking C., Takemoto R., Satyamoorthy K., Shirakawa T., Eskandarpour M., Hansson J., VanBelle PA., Elder DE., Herlyn M (2004).** Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B. *Cancer Res.* **64:** 807-811
- Bermont L., Lamielle F., Lorchel F (2001).** Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86:** 363-368
- Berryman M., Bretscher A (2001).** Digital image analysis for rapid quantification of total RNA and cDNA for SMARTTM-PCR. *BioTechniques* **31:** 746-752
- Bhoomik A., Huang TG., Ivanov V., Gangi L., Qiao RF., Woo SLC., Chen SH., Ronai Z (2002).** An ATF2-derived peptide sensitizes melanomas to apoptosis and inhibits their growth and metastasis. *J. Clin. Invest.* **110:** 643-650
- Bhoomik A., Jones N., Ronai Z (2004).** Transcriptional switch by activating transcription factor 2-derived peptide sensitizes melanoma cells to apoptosis and inhibits their tumorigenicity. *PNAS* **101:** 4222-4227
- Birck A., Ahrenkiel V., Zeuthen J., Hou-Jensen K., Guldberg P (2000).** Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies. *J. Invest. Dermatol.* **114:** 277-280

- Birkedal-Hansen H.**, Moores WG., Bodden MK., Windsor LJ., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler JA (1993). Matrix Metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**: 197-250
- Bittner M.**, Meltzer P., Chen Y., Jinag Y., Seftor E., Hendrix M., Radmacher M., Simon R., Yakhini Z., Bendor A., Sampas N., Dougherty E., Wang E., Marincola F., Gooden C., Lueders J., Glatfelter A., Pollock P., Carpten J., Gillanders E., Leja D., Dietrich K., Beaudry C., Berens M., Alberts D., Sondak V., Hayward N., Trent J (2001). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* **406**: 536-540
- Blanco MJ.**, Moreno-Bueno G., Sartio D., Locassio A., Cano A., Palacios J., Nieto MA (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* **21**: 3241-3246
- Blesh A.**, Bosserhoff AK., Apfel R., Behl C., Hessdoerfer B., Schmitt A., Jachimczak P., Lottspecih F., Buettner R., Bogdahn U (1994). Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res.* **54**: 5965-5701
- Bliss JM.**, Ford D., Swerdlow AJ., Armstrong BK., Cristofolini M., Elwood JM., Green A., Holly EA., Mack T., MacKie RM., Osterlind A., Walter SD., Peto J., Easton DF (1995). Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int. J. Cancer* **62**: 367-276
- Bohm M.**, Moellmann G., Cheng E (1995). Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser 133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ.* **6**: 291-302
- Boni R.**, Zhuang Z., Burg G., Vortmeyer A (1999). Die Mikrodissektion: Anwendung in der molekularen onkologischen Dermatologie. *Hautarzt* **50**: 98 – 102
- Bortoluzzi S.**, d'Alessi F, Romualdi C, Danieli GA (2001). Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. *Bioinformatics* **17**:1152-1157
- Boss JL** (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**: 4682-2689
- Bosserhoff AK.**, Kaufmann M., Kaluza B., Bartke I., Zirngibl H., Hein R., Stolz W., Buettner R (1997a). Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res.* **57**: 3149-3153
- Bosserhoff AK.**, Golob M., BuettnerR., Landthaler M., Hein R (1998). MIA („melanoma inhibitory activity“): Biologische Funktionen und klinische Relevanz beim malignen Melanom. *Hautarzt* **49**: 762–769
- Bouffard D.**, Duncan LM., Howard CA., Martin C., Byers HR (1994). Actin-binding protein expression in benign and malignant melanocytic proliferations. *Hum. Pathol.* **25**: 709-714
- Bourguignon LY.**, Zhu H., Shao L., Zhu D., Chen YW (1999). Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumour cell migration in metastatic breast cancer cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **43**: 269-287
- Brands JH.**, Maassen JA., van Hemert FJ., Amons R., Moller W (1986). The primary structure of the alpha subunit of human elongation factor 1. Structural aspects of guanine nucleotide binding site. *Eur. J. Biochem.* **155**: 167- 171
- Brown JD.**, Moon RT (1998). Wnt signalling: why is everything so negative? *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 182-187
- Broome PM.**, Gause PR., Hyman P (1999). Induction of melanoma in TPras transgenic mice. *Carcinogenesis* **20**: 1747-1753
- Brooks PC.**, Strombald S., Sanders LC., von Schalscha TL., Aimes RT., Stetler Stevenson WG., Quigley JP., Chersesh DA (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* **85**: 683-693
- Broude NE** (2002). Trouble with differential display. *Trends Biotechnol.* **20**: 181
- Bullani RR.**, Wehrli P., Viard-Leveugle I., Rimordi D., Cerottini JC., Saurat JH., Thschopp J., French LE (2002). Frequent downregulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma. *Melanoma Res.* **12**: 263-270
- Burgess JK.**, Hazelton RH (2000). New developments in the analysis of gene expression. *Redox. Rep.* **5**: 63-73
- Burrige K.**, Fath K., Kelly T (1988). Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**: 487-525

- BurrIDGE K.**, Nuckolls G., Otey C (1990). Actin-membrane interaction in focal adhesions. *Cell Differ. Dev.* **32**: 337-342
- Busca R.**, Abbe P., Mantoux F., Aberdam E., Peysonnaux C., Eychene A., Ortonne JP., Balotti R (2000). Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO* **19**: 2900-2910
- Bustin SA** (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**: 23-39
- Buto S.**, Tagliabue E., Ardini E (1998). Formation of the 67-kDa laminin receptor by acetylation of the precursor. *J. Cell Biochem.* **69**: 244-251
- Cairns P.**, Mao L., Merlo A., Lee DJ., Schwab D., Eby Y., Tokino K., van der Riet P., Blaugrund JE., Sidransky D (1994). Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* **265**: 415-417
- Calado A.**, Treichel N., Muller EC., Otto A and Kutay U (2002). Exportin 5 mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *EMBO J.* **21**: 6216-6224
- Callard D.**, Lescure B., Mazzolini L (1994). A method for elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *BioTechniques* **16**: 1096-1097
- Cano A.**, Pérez-Moreno MA., Rodrigo I., Locascio A., Bianco MJ., del Barrio MG., Postillo F., Nieto MA (2000). *Cell Biol.* **2**: 76-83
- Capowski EE.**, Esnault S., Bhattacharya S., Malter S (2001) Y box-binding factor promotes eosinophil survival by stabilizing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA. *J. Immunol.* **167**: 5970-5976
- Castronovo V** (1993). Laminin Receptors and Laminin-Binding Proteins during tumour Invasion and Metastasis. *Invasion Metastasis* **13**: 1-30
- Chandler DP.**, Wagon CA., Bolton H (1998). Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 669-677
- Chaudhary J.**, Skinner MK (2000). Characterization of a novel transcript of 14-3-3 theta in Sertoli cells. *J. Androl.* **21**: 730-738.
- Chen A.**, Ganor Y., Rahimipour S., Ben-Aroya N., Koch Y., Levite M (2002). The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nature Med.* **8**:1421-1426.
- Chen D.**, Xu W., Bales E., Colmenares C., Conacci-Sorrell M., Ishii S., Stavnezer E., Campisi J., Fisher DE., Ben-Ze'ev A., Medrano EE (2003). SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma. *Cancer Res.* **63**: 6626-6634
- Chen YT.**, Stockert E., Tsang S., Coplan KA., Old LJ (1994). Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8125-8129
- Chenchik A.**, Zhu YY., Diatschenko L., Li R., Hill J., & Siebert PD (1998). Generation and use of high quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR* (Bio Techniques Books; MA) 305-319
- Cheng S.**, Fockler C., Barnes WM. & Higuchi (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5695-5699
- Chin L.**, Pomerantz J., Polsky D., Jacobson M., Cohen C., Cordon-Cardo C., Horner JW., DePinho RA (1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev.* **11**: 2822-2834
- Chin L., Tarn A.**, Pomerantz J. (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* **400**: 468-472
- Chiodino C.**, Cesinaro AM., Ottani D (1999). Expression of the novel inhibitor of apoptosis survivin in normal and neoplastic skin. *J. Invest. Dermatol.* **113**: 415-418
- Ciavatta V.**, Cairney J (1999). Isolation of full-length cDNA clones using SMARTTM cDNA and a biotin-streptavidin bead system. *BioTechniques* **29**: 444-450
- Claffey KP.**, Brown LF., del Aguila LF (1996). Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumour growth, angiogenesis and experimental metastasis. *Cancer Res.* **56**: 172-181
- Claffey KP.**, Abrams K., Shih SC., Brown LF., Mullen A., Keough M (2001). Fibroblast growth factor 2 activation of stromal cell vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Lab. Invest.* **81**: 61-75

- Clark EA.,** Golub TR., Lander ES., Hynes RO (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role RhoC. *Nature* **406**: 532-535
- Clark WH Jr. (1991).** Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **10**: 83-88
- Coles LS.,** Diamond P., Occhiodoro F., Vadas MA., Shannon MF (1996). Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter. *Nucleic. Acids. Res.* **24**: 2311-2317
- Conner SR.,** Scott G., Aplin AE (2003). Adhesion-dependent activation of the ERK1/2 cascade is by-passed in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 34548-34554
- Copois V.,** Bret C., Bibeau F., Brouillet JP., del Rio M., Berhe ML., Maudelond T., Boulle N (2003). Assessment of RNA quality extracted from laser-captured tissues using miniaturized capillary electrophoresis. *Lab. Invest.* **83**: 599-602
- Cronauer MV.,** Schulz WA., Burchardt T., Anastasiadis AG., de la Taille A., Ackermann R., Burchardt M (2003). The androgen receptor in hormone-refractory prostate cancer: relevance of different mechanisms of androgen receptor signaling. *Int. J. Oncol.* **23**: 1095-1102
- Culig Z.,** Klocker H., Bartsch G., Steiner H., Hobisch A (2003). Androgen receptors in prostate cancer. *J. Urol.* **170**: 1363-1369
- Curran S.,** Murray GI (1999). Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J. Pathol.* **189**: 300-308
- Czajkowski R.,** Placek W., Drewa G., Czajkowska A., Uchanska G (2004). FAMM syndrome: pathogenesis and management. *Dermatol. Surg.* **30**: 291-296
- Dahlin-Hupe K.,** Berglund EO., Ranscht B., Stallcup WN (1997). Mutational analysis of the L1 neuronal cell adhesion molecules identifies membrane-proximal amino acids of the cytoplasmic domain that are required for cytoskeletal anchorage. *Mol. Cell Neurosci.* **9**: 144-156
- Dai D.,** Makretsov N., Campos EI., Huang C., Zhou Y., Huntsman D., Martinka M., Li G (2003). Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival. *Clin. Cancer Res.* **9**: 4409-4414
- Danen EH.,** Yamada KM (2001). Fibronectin, integrins, and growth control. *J. Cell Physiol.* **189**: 1
- Danielsen T.,** Rofstad EK (1998). VEGF, bFGF and EGF in the angiogenesis of human melanoma xenograft. *Int. J. Cancer* **76**: 836-841
- Davies H.,** Bignelli GR., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett MJ., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hail S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson BA., Cooper C., Shipley J., Hargrave H., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevis-Trench G., Riggins GJ., Bigner DD., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho JWC., Leung SY., Yuen ST., Weber BL., Seigler HF., Darrow TL., Paterson H., Marais R., Marshall CJ., Wooster R., Stratton MR., Futreal P (2002). Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* **417**: 949-954
- Deichmann M.,** Polychronidis M., Wacker J., Thome M., Naher H (2001). The protein phosphatase 2A subunit Bgamma gene is identified to be differentially expressed in malignant melanomas by subtractive suppression hybridization. *Melanoma Res.* **11**: 477-585
- Degen WG.,** van Kempen LC., Gijzen EG., van Groningen JJ., van Kooyk Y., Bloemers HP (1998). MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am. J. Pathol.* **152**: 805-813
- Demetrick DJ.,** Zhang H., Beach DH (1994). Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4 and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet. Cell Genet.* **66**: 72-74
- Demunter A.,** Stas M., Degreef H., De Wolf-Peeters C., van den Oord J (2001). Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumour progression phases of melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **117**: 1483-1489
- Dettmar M (2000).** Tumour angiogenesis. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **5**: 20-23
- De Vries TJ.,** Smeets D., de Graaf R., Hou-Jensen K., Brocker EB., Renard N., Eggermont AR., van Muijen GN., Ruiter (2001). Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group. *J. Pathol.* **193**: 13-20

- De Wit NJ.**, Burtscher HJ., Weidle UH., Ruiter DJ., van Muijen GNP (2002). Differentially expressed genes identified in human melanoma cell lines with different metastatic behaviour using density oligonucleotide arrays. *Melanoma Res.* **12**: 57-69
- Diatchenko L.**, Lau Y-FC., Campbell P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov ED. & Sibert PD (1996). Suppression subtractive hybridisation: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6025-6030
- DiCristofani A.**, Pandolfo PP (2000). The multiple roles of PTEN in tumour suppression. *Cell* **100**: 387-390
- Didier DK.**, Schiffenbauer J., Woulfe SL., Zacheis M., Schwartz BD (1988). Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7322-7326
- Diehl JA.**, Cheng M., Roussel MF., Sherr CJ (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**: 3499-3511
- Diggle CP.**, Cruickshank S., Olsburgh JD., Pellegrin S., Smith B., Banks RE., Selby PJ., Knowles, Southgate J., Harnden (2003). Identifications of genes up-regulated in urothelial tumours: the 67-kd laminin receptor and tumour-associated trypsin inhibitor. *Am. J. Pathol.* **163**: 493-504
- Ding SJ.**, Li Y., Shao XX., Zhou H., Zeng R., Tang ZY., Xia QC (2004). Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. *Proteomics.* **4**: 982-994
- Ditzel HJ.**, Masaki Y., Nielsen H., Farnaes L., Burton DR. (2000). Cloning and expression of a novel human antibody-antigen pair associated with Felty's syndrome. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97**: 9234-9239
- Dolter KE.**, Braman JC (2001). Small-sample total RNA purification: laser capture microdissection and cultured cell applications. *BioTechniques* **30**: 1358-1361
- Donaldson EA.**, McKenna DJ., MC Mullen CB., Scott N., Stitt AW, Nelson J (2000). The expression of membrane associated 67-kDa laminin receptor (67LR) is modulated in vitro by cell-contact inhibition. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **3**: 53-59
- Ehrig T.**, Abdulkadir SA., Dintzis SM., Milbrabdt J., Watson MA (2001). Quantitative amplification of genomic DNA from histological tissue sections after staining with nuclear dyes and laser capture microdissection. *J. Mol. Diagn.* **3**: 22-25
- Eisen T.**, Easty DJ., Bennett C., Goding CR (1995). The POU domain transcription factor Brn-2: elevated expression in malignant melanoma and regulation of melanocyte-specific gene expression. *Oncogene* **11**: 2157-2164
- Elder DE.**, Clark WH Jr., Elenitsas R., Guerry D., Halpern AC (1993). The early and intermediate precursor lesions of tumour progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. *Semin. Diagn. Pathol. J.* **315**: 549-554
- Eleveld-Trancikova D.**, Kudela P., Majerciak V., Regendova M., Zelnik V., Pastorek J., Pastorekova S., Bizik J (2002). Suppression subtractive hybridisation to isolate differentially expressed genes involved in invasiveness of melanoma cell line cultured under different conditions. *Int. J. Oncol.* **20**: 501-508
- Emmert-Buck M.**, Bonner RF., Smith PD., Chuaqui RF., Zhuang Z., Goldstein R., Weiss A., and Liotta LA (1996). Laser Capture Microdissection. *Science* **274**: 998-1001
- Endege WO.**, Steinmann KE., Boardman LA (1999). Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *BioTechniques* **26**: 542-548
- Engers R.**, Gabbert HE (2000). Mechanisms of tumour metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J. Cancer Clin. Oncol.* **126**: 682-692
- Erives A.**, Corbo JC., Levine M (1998). Lineage-specific regulation of the snail gene in the embryonic mesoderm and neuroectoderm. *Dev. Biol.* **194**: 213-225
- Erhard H.**, Rietveld FJ., van Altena MC., Brocker EB., Ruiter DJ., de Waal RM (1997). Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res.* **7**: 19-26
- Ernst T.**, Hergenbahn M., Kenzelmann M., Cohen CD., Klären R., Gröne EF., Wiesel M., Gudemann C., Küster J., Schott W., Staehler G., Kretzler M., Hollstein M., Gröne HJ (2002). A gene expression analysis on total and microdissected prostata tissue. *Am. J. Pathol.* **160**: 2169-2180
- Esteve (1993).** Background mortality in clinical survival studies. *Lancet.* **29**: 1416-1417

- Farrow B.,** Sugiyama Y., Chen A., Uffort E., Nealon W., Mark Evers B (2004). Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann. Surg.* **239**: 763-769
- Fears TR.,** Bird CC., Guerry D., Sagebiel RW., Gail MH., Elder DE., Halpern A., Holly EA., Hartge P., Tucker MA (2002). Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk. *Cancer Res.* **63**: 3992-3996
- Fend F.,** Emmert-Buck MR., Chuaqui R., Cole K., Lee J., Liotta LA., Raffeld M (1999). Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *J. Pathol.* **154**: 61-66
- Felding-Habermann B.,** Fransvea E., O'Toole TE., Manzuk L., Faha B., Hensler M (2002). Involvement of tumour cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **19**: 427-436
- Ferrara N** (2000). Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Rec. Progr. Hormone Res.* **55**: 15-35
- Fidler IJ.** (1998). The biology of melanoma metastasis. In: Balch, C.M., Houghton, A.N., Sober, A.J., Soong, S.J. Cutaneous Melanoma, 3rd edition, J.B. Lipinott Company, **31**: 493-509
- Fink L.,** Seeger W., Emmert L., Hanze J., Stahl U., Grimminger F., Kummer W., Bohle RM (1998). Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat. Med.* **4**: 1329-1333
- FitzGerald MG.,** Harkin DP., Silva AS (1996). Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinical-based population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8541-8545
- Fogel M.,** Gutwein P., Mechttersheimer S., Riedle S., Stoeck A., Smirnov A., Edler L., Ben-Arie A., Huszar M., Altevogt P (2003). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet.* **362**: 869-875
- Fogel M.,** Mechttersheimer S., Huszar M., Smirnov A., Abu-Dahi A., Tilgen W., Reichrath J., Georg T., Altevogt P., Gutwein P (2003). L1 adhesion molecule (CD171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Letters.* **189**: 237-246
- Fountain JW.,** Bale SJ., Housman DE., Dracopoli NC (1990). Genetics of melanoma. *Cancer Surv.* **9**: 645-671
- Frigerio JM.,** Dagorn JC., Iovanna JL (1995). Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochem. Biophys. Acta.* **1262**: 64-68
- Fujita H.,** Katoh H., Hasegawa H., Yasui H., Aoki J., Yamaguchi Y., Negishi M (2000). Molecular decipherment of Rho effector pathways regulating tight-junctions permeability. *Biochemical Journal* **246**: 617-622
- Fujita N.,** Sato S., Katayama K., Tsuruo T (2002). Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J. Biol. Chem.* **277**: 28706-28713
- Fukuda T.,** Ashizuka M., Nakamura T., Shibahara K., Maeda K., Izumi H., Kohno K., Uchiumi T (2004). Characterization of the 5'-untranslated region of YB-1 mRNA and autoregulation of translation by YB-1 protein. *Nucleic Acids Res.* **32**: 611-622
- Fuller AP.,** Palmer-Toy D., Erlander MG., Sgroi DC (2003). Laser capture microdissection and advanced molecular analysis of human breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **8**: 335-345
- Fulop T.,** Larbi A (2002). Putative role of 67 kDa elastin-laminin receptor in tumour invasion. *Semin. Cancer Biol.* **12**: 219-229
- Fults D.,** Pedone C (1993). Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer* **7**: 173-177
- Fumagalli S.,** Doneda L., Nomura N., La rizza L (1993). Expression of the c-ski proto-oncogene in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.* **3**: 23-27
- Gallagher RP.,** McLean DL., Yang CP., Coldman AJ., Silver HK., Spinelli JJ., Beagrie MS (1990). Sunburn, and pigmentation factors and the frequency of acquired melanocytic nevi in children. Similarities to melanoma: the Vancouver Mole Study. *Arch. Dermatol.* **126**: 770-776
- Garbe C.,** Thiess S., Nurnberger F., Ehlers G., Albrecht G., Lindlar F., Bertz J (1991). Incidence and mortality of malignant melanoma in Berlin (West) from 1980 to 1986. *Acta. Derm. Venereol.* **71**: 506-11
- Garbe C.,** Buttner P., Ellwanger U., Brocker EB., Jung EG., Orfanos CE., Rassner G., Wolff HH (1995). The Malignant Melanoma Central Register of the German Society of Dermatology 1983-1993. Epidemiologic developments and current therapeutic management of malignant melanoma of the skin. *Hautarzt* **46**: 683-92

- Gately S (2000).** The contribution of cyclooxygenase-2 to tumour angiogenesis. *Cancer Metast. Rev.* **19**: 19-27
- Gehlsen KR.,** Dickerson K., Argraves WS., Engvall E., Rouslathi E (1989). Subunit structure of a laminin-binding integrin and localization of its binding site on laminin. *J. Biol. Chem.* **14**: 19034-19038
- Gershenwald JE.,** Summer W., Calderone T., Wang Z., Huang S., Bar-Eli M (2001). Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumour growth in vivo. *Oncogene* **20**: 3363-3375
- Gessner C.,** Woischwill C., Schumacher A., Liebers U., Kuhn H., Stiehl P., Jurchott K., Royer HD., Witt C., Wolff G (2004). Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer. *Eur. Respir. J.* **23**: 14-19
- Ghiorzo P.,** Villaggio B., Sementa AR., Hansson J., Platz A., Nicoló G., Spina B., Canepa M., Palmer JM., Hayward N., Bianchi-Scarrà B (2004). Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic lesions from familial melanoma patients. *Hum. Pathol.* **35**: 25-33
- Givant-Horwitz V.,** Davidson B., Reich R (2004). Laminin-induced signalling in tumour cells: the role of the Mr 67,000 laminin receptor. *Cancer Res.* **64**: 3572-3579
- Gitay-Goren H.,** Halaban R., Neufeld G (1993). Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**: 702-709
- Gloc T.,** Riedmayr S., Sohn HY., Pohl U (1998). The 67kDa laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression. *J. Biol. Chem.* **274**: 15996-16002
- Goldsworthy SM.,** Stockton PS., Trempus CS., Foley JF., Maronpot RR (1999). Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol. Carcinog.* **25**: 86-91
- Golob M.,** Buettner R., Bosserhoff AK (2000). Characterization of a transcription factor binding site, specifically activating MIA transcription in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 42-47
- Gomez DE.,** Alfonso DF., Yoshiji H., Thorgeirsson UP (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* **74**: 11-122
- Good DJ.,** Polverini PJ., Rastinejad F., Le Beau MM., Mlemons RS., Frazier WA., Bouck NP (1990). A tumour suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**: 6624-6628
- Goodall J.,** Martinozzi S., Dexter TJ., Champeval D., Carreira S., Larue L., Goding CR (2004). Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by beta-catenin. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 2915-2922
- Goodall J.,** Wellbrock C., Dexter TJ., Roberts K., Marais R., Goding R (2004). The Brn-2 transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 2923-2931
- Gorlich D.,** Dabrowski M., Bischoff F.R., Kutay U., Bork P., Hartmann E., Prehn S., Izaurralde E (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell Biol.* **138**: 65-80
- Greene MH.,** Clark WH J., Tucker MA., Kraemer KH., Elder DE., Fraser MC (1985). High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann. Intern. Med.* **102**: 458-465
- Gradilone A.,** Gazzaniga P., Rituffo D., Scarpa S., Cigna E., Vasaturo F., Battoni U., Innocenzi D., Calmieri S., Scuderi N., Frati L., Agliano AM (2003). Survivin, bax, and bcl-X gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients. *J. Clin. Oncol.* **21**: 306-312
- Greene MH (1999).** The genetics of hereditary melanoma and nevi – 19989 update. *Cancer* **86**: 1644-1657
- Grosshans H.,** Hurt E., and Simons G (2000a). An aminoacylation dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev.* **14**: 830-840
- Grossman D.,** McNiff JM., Li F., Altieri DC (1999). Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **113**: 1076-1081
- Grossman D.,** Altieri DC (2001). Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev.* **20**: 3-11
- Grugel S.,** Finkenzeller G., Weindel K., Barleon B., Marme D (1995). Both v-Ha-ras and v-raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 25915-25919
- Guba M.,** Bosserhoff AK., Steinbauer M., Abels C., Anthuber M., Buettner R., Jauch KW (2000). Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Br. J. Cancer* **83**: 1216-1222

- Guldberg P.**, ThorStraten P., Birck A., Ahrenkiel V., Kirkin AF., Zeuthen J (1997). Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res.* **57**: 3660-3663
- Gumbiner BM (1995)**. Signal transduction of beta-catenin. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 634-640
- Gurskaya NG.**, Diatschenko L., Chenchik A., Siebert PD. Khaspekov GL., Lukyanov KA., Vagner LL., Ermolaeva OD., Lukyanov SA., and Sverdlov ED (1996). Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* **240**: 90-97
- Gutman M.**, Even-Sapir E., Merimsky O., Trejo L., Klausner JM., Lev-Chelouche D (2002). The role of interleukin-8 in the initiation and progression of human cutaneous melanoma. *Anticancer Res.* **22**: 3395-3398
- Güttgemann A.**, Golob M., Müller S., Buettner R., Bosserhoff AK (2001). Isolation of invasion-associated cDNA's in melanoma. *Arch. Dermatol. Res.* **293**: 283-290
- Hadjeb N.**, Berkowitz GA (1996). Preparation of T-over-hang vectors with high PCR product cloning efficiency. *Bio Techniques* **20**: 20-22
- Hahne M.**, Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French LE., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., Tschopp J (1996). Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumour immune escape. *Science* **271**: 1363-1366
- Han YP.**, Tuan TL., Hughes M., Wu H., Garner WL (2000). Transforming growth factor- β - and tumour necrosis factor- α - mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J. Biol. Chem.* **22**: 22341-22350
- Hart MC.**, Korshunova YO., Cooper JA (1997). Vertebrates have conserved capping protein alpha isoforms with specific expression patterns. *Cell Motil. Cytoskeleton* **38**: 120- 132
- Healey E.**, Rehmann I., Angus B., Rees JL (1995). Loss of heterozygosity in sporadic primary cutaneous melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* **12**: 152-156
- Heere-Ress E.**, Thallinger C., Lucas T., Schlagbauer-Wadl H., Wacheck V., Monia BP., Wolff K., Pehamberger H., Jansen B (2002). Bcl-X(L) is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy. *Int. J. Cancer.* **99**: 29-34
- Helmbach H.**, Rossmann E., Kern MA., Schadendorf D (2001). Drug-resistance in human melanoma. *Int. J. Cancer.* **93**: 617-622
- Hemmerich P.**, von Mikecz A., Neumann F., Sozeri O., Wolff-Vorbeck G., Zoebelin R., Krawinkel U (1993). Structural and functional properties of ribosomal protein L7 from humans and rodents. *Nucleic. Acids Res.* **21**: 223-231
- Hemler ME.**, Elices MJ., Parker C (1990). Structure of the integrins VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol. Rev.* **114**: 45-65
- Henriet P.**, Blavier L., DeClerck YA (1999). Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* **107**: 11-119
- Herbst RA.**, Weiss J., Ehnis A., Cavenee WK., Arden KC (1994). Loss of heterozygosity for 10q22-10qter in malignant melanoma progression. *Cancer Res.* **54**: 3111-3114
- Herlyn M. (1993)**. Molecular and Cellular Biology of Melanoma. *CRC Press, Boca Raton, USA*: 1-102
- Hermeking H (2003)**. THE 14-3-3 cancer connection. *Nature Reviews Cancer* **3**: 931-943
- Herrmann PC.**, Gillespie JW., Charboneau L., Bichsel VE., Pawletz CP., Calvert VS., Kohn EC., Emmert-Buck MR., Liotta LA., Petricoin EF 3rd (2003). Mitochondrial proteome: altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer. *Proteomics.* **3**: 1801-1810
- Herrler M. (2001)**. Use of SMART generated cDNA for differential gene expression studies. *Bio Techniques* **30**: 158-163
- Hipfel R.**, Garbe C., Schitteck B (1998). RNA Isolation from human skin tissues for colorimetric differential display. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **37**: 131-135
- Hipfel R.**, Schitteck B., Garbe C (2000). Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues by subtractive hybridization. *Br. J. Cancer* **82**: 1149-1157

- Hoeven PC.**, van der Wal JC., Ruurs P., van Blitterswijk WJ (2000). Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3. *Biochem. J.* **3**: 781-785
- Hofmann UB.**, Westphal JR., van Kraats AA., Ruiter DJ., Van Muijen GN (2000). Expression of integrin alpha(v)beta(3) correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer.* **87**: 12-19
- Holm PS.**, Bergmann S., Jurchott K., Lage H., Brand K., Ladhoff A., Mantwill K., Curiel DT., Dobbstein M., Dietel M., Gansbacher B. and Royer HD (2002). YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *J. Biol. Chem.* **277**: 10427-10434
- Holm PS.**, Lage H., Bergmann S., Jurchott K., Glockzim G., Bernshausen A., Mantwill K., Ladhoff A., Wichert A., Mymryk JS., Ritter T., Dietel M., Gansbacher B., Royer HD (2004). Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: Impact for cancer gene therapy. *Cancer Res.* **64**: 322-328
- Holthofer H.**, Kretzler M, Haltia A, Solin ML, Taanman JW, Schagger H, Kriz W, Kerjaschki D, Schlondorff D (1999). Altered gene expression and functions of mitochondria in human nephrotic syndrome. *FASEB J.* **13**: 523-532.
- Hoon DS.**, Fujimoto A., Shu S., Taback B (2002). Assessment of genetic heterogeneity in tumours using laser capture microdissection. *Methods Enzymol.* **356**: 302-309
- Hortsch M** (1996). The L1 family of neural cell adhesions molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* **17**: 587-593
- Houghton A.**, Flannery J., Viola MV (1980). Malignant melanoma in Connecticut and Denmark. *Int. J. Cancer* **25**: 95-104
- Hsu MY.**, Shih DT., Meier F (1998). Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *Am. J. Pathol.* **153**: 1435-1442
- Hsu MY.**, Meier FE., Nesbit M., Hsu JY., Van Belle P., Elder DE., Herlyn M (2000). E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocytes mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am. J. Pathol.* **156**: 1515-1525
- Huang J.**, Asawa T., Takato T., Sakai R (2003). Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *J. Biol. Chem.* **278**: 48367-48376
- Huang X.**, Eriksson KF, Vaag A, Lehtovirta M, Hansson M, Laurila E, Kanninen T, Olesen BT, Kurucz I, Koranyi L, Groop L (1999). Insulin-regulated mitochondrial gene expression is associated with glucose flux in human skeletal muscle. *Diabetes.* **48**: 1508-14
- Hundt C.**, Peyrin JM., Haik S., Gauczynski S., Leucht C., Rieger R., Riley ML., Deslys JP., Dormont D., Lasmézas CI., Weiss S (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO* **20**: 5876-5886
- Hutchings, NJ.**, Clarkson, N., Chalkley, R., Barclay, AN. and Brown, MH (2003). Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *J. Biol. Chem.* **278**: 22396-22403
- Hwang PH.**, Yi HK., Kim DS., Nam SY., Kim JS., Lee DY (2001). Suppression of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Cancer Lett.* **172**: 83-91
- Hyder SM.**, Huang JC., Nawaz Z., Boettger-Tong H., Makela S., Chiappetti GM (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogen and progestins. *Health Perspect.* **108**: 785-790
- Hynes RO** (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25
- Iervolino A.**, Trisciuglio D., Ribatti D., Candiloro A., Biroccio A., Zupi G., Del Bufalo D (2002). Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *FASEB J.* **16**: 1453-1455
- Ihara K.**, Muraguchi S., Kato M., Shimizu T., Shirakawa M., Kuroda S., Kaibuchi K., Hakoshima T (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem.* **273**: 9656
- Irmeler M.**, Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer JL., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French LE., Tschopp J (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190-195
- Isshiki K.**, Elder DE., Guerry D., Linnenbach AJ (1993). Chromosome 10 allelic loss in malignant melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **69**: 108-112

- Itoh K.** and Shichijo S (2001). Shigeiki Shichijo, Kurume University School of Medicine, Department of Immunology, Japan. *Int. J. Cancer* **97**: 287-282
- Ittmann M** (1996). Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res.* **56**: 2143-2147
- Imokova G.**, Kobayasi T., Miyagishi M (2000). Intracellular signalling leading to synergistic effects of endothelian-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor. *J. Biol. Chem.* **275**: 33321-33328
- Ivanov VN.**, Bhoumik A., Ronai Z (2003). Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* **22**: 3152-3161
- Jackers P.**, Minoletti F., Belotti D., Clause N., Sozzi G., Sobel, ME., Castronovo V (1996). Isolation from a multigene family of the active human gene of the metastasis-associated multifunctional protein 37LRP/p40 at chromosome 3p21.3. *Oncogene* **13**: 495-503
- Janji B.**, Melchior C., Gouon V., Vallar L., Kieffer N (1999). Autocrine TGF- β -regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int. J. Cancer* **83**: 255-262
- Janz M.**, Harbeck N., Dettmar P., Berger U., Schmidt A., Jurchott K., Schmidt M., Royer HD (2002). Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumour biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int. J. Cancer* **97**: 278-282
- Jean D.**, Bar-Eli M (2001). Targeting the ATF-1/CREB transcription factors by single chain Fv fragment in human melanoma: potential modality for cancer therapy. *Crit. Rev. Immunol.* **21**: 275-286
- Jemal A.**, Devesa SS., Hartge P., Tucker MA (2001). Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *Cancer Inst.* **93**: 678-683
- Jiao W.**, Miyazajki K., Kitajima Y (2002). Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* **86**: 98-101
- Jiang Y.**, Harlocker SL., Molesh DA., Dillon DC., Stolk JA., Houghton RL., Repasky EA., Badaro R., Reed SG., Xu J (2002). Discovery of differentially expressed genes in human breast cancer using subtracted cDNA libraries and cDNA microarrays. *Oncogene* **21**: 2270-2282
- Jin L.**, Thompson CA., Qian X. (1999). Analysis of anterior pituitary hormone mRNA expression in immunophenotypically characterized single cells after laser capture microdissection. *Lab. Invest* **79**:511-512
- Johnson JP** (1992). Cell adhesion molecules in neoplastic disease. *Int. J. Clin. Lab Res.* **22**: 69-72
- Jones CE.**, Mueser TC., Nossal NG (2004). Bacteriophage T4 32 protein is required for helicase-dependent leading strand synthesis when the helicase is loaded by the T4 59 helicase-loading protein. *J. Biol. Chem.* **279**: 12067-12075
- Jung FA.**, Buzaid AC., Ross MI., Woods KV., Lee JJ., Albitar M (1997). Evaluation of Tyrosinase mRNA as a tumour marker in the blood of melanoma patients. *J. Clin. Oncol.* **15**: 2826-2831
- Jurchott K.**, Bergmann S., Stein U., Walther W., Janz M., Manni I., Piaggio G., Fietze E., Dietel M., and Royer HD (2003). YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating Cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**: 27988-27996
- Kadenbach B.**, Jarausch J., Hartmann R., Merle P (1983). Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal. Biochem.* **129**: 517-521
- Kahari VM.**, Saarialho-Kere U (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* **6**: 199-213
- Kamb A** (1995). Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet.* **11**:136-140
- Karelina TV.**, Bannikov GA., Eisen AZ (2000). Basement membrane zone remodeling during appendageal development in human fetal skin. The absence of type VII collagen is associated with gelatinase-A (MMP2) activity. *J. Invest. Dermatol.* **114**: 371-375
- Kasai H.**, Nadano D, Hidaka E, Higuchi K, Kawakubo M, Sato TA, Nakayama J (2003). Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J. Histochem. Cytochem.* **51**: 567-74.
- Katayama M.**, Iwamatsu A., Masutani H., Furuke K., Takeda K., Wada H (1997). Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Strc. Funct.* **22**: 511-516
- Kaziro Y** (1978). The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. *Biochem. Biophys. Acta.* **505**: 95-127

- Kefford RF.**, Newton-Bishop JA., Bergman W., Tucker MA (1999). Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma: a consensus statement of the Melanoma Genetics Consortium. *J. Clin. Oncol.* **17**: 3245-3251
- Kemler R (1993).** From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* **9**: 317-321
- Kenmochi N.**, Kawaguchi T., Rozen T., Davis E., Goodman N., Hudson TJ., Tanaka T., and Page DC (1998). A Map of 75 Human Ribosomal Protein Genes. *Genome Research* **8**: 509-523
- Kennedy C.**, ter Huurne J., Berkhout M., Gruis N., Bastiaens M., Bergman W., Willemze R., Bavnick JN (2001). Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J. Invest. Dermatol.* **117**: 294-300
- Kieser A.**, Weich HA., Brandner G., Marme D., Kolch W (1994). Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* **9**: 963-969
- Kimitoshi K.**, Hiroto I., Schiumi T., Legumi A., Michihiko K (2003). The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *BioEssays* **25**: 691-698
- Kishida S.**, Yamamoto H., Kikuchi A (2003). Wnt-3a and Dvl induce neurite retraction by activating Rho-associated kinase. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 4487-4501
- Kobayashi M.**, Miura M., Asou H., Uyemura K (1991). Molecular cloning of cell adhesion molecule L1 from human nervous tissue: a comparison of the primary sequence of L1 molecules of different origin. *Biochem. Biophys. Acta.* **1090**: 238-240
- Kohda Y.**, Murakmai H., Moe OW., Star RA (2000). Analysis of segmental renal gene expression by laser capture microdissection. *Kidney Int.* **57**: 321-331
- Korinek V.**, Barker N., Morin PJ., van Wichen D., de Weger R., Kinzler KW., Vogelstein B., Clevers H (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* **275**: 1784-1787
- Kunz M.**, Koczan D., Ibrahim SM., Gillitzer R., Gross G., Thijssen TJ (2002). Differential expression of thrombospondin 2 in primary and metastatic malignant melanoma. *Acta. Derm. Venerol.* **82**: 163-169
- Kurschat P.**, Wickenhauser C., Groth W., Krieg T., Mauch C (2002). Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J. Pathol.* **197**: 179-187
- Larhammar D.**, Gustafsson K., Claesson L., Bill P., Wiman K., Schenning L., Sundelin J., Widmark E., Peterson PA., and Rask L. (1982). Alpha chain of HLA-DR transplantation antigens is a member of the same protein superfamily as the immunoglobulins. *Cell* **30**: 153-161
- Larsen CJ (1996).** p16INK4a: a gene with a dual capacity to encode unrelated proteins that inhibit cell cycle progression. *Oncogene* **12**: 2041-2044
- Lechner S.**, (2002). A novel differential gene expression analysis strategy in laser-microdissected cell populations. *Qiagen News* **6**: 4-6
- Lee JS.**, Trowsdale J., Travers PJ., Carey J., Grosveld F., Jenkins J. and Bodmer WF (1982). Sequence of an HLA-DR alpha-chain cDNA clone and intron-exon organization of the corresponding gene. *Nature* **299**: 750-752
- Leiter J.**, Schmid RM., Kaskel P (2000). Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch. Dermatol. Res.* **292**: 225-232
- Lewis TS (1998).** Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* **74**: 49-139
- Li G.**, Herlyn M (2000). Dynamics of intracellular communications during melanoma development. *Mol. Med. Today* **6**: 163-169
- Li G.**, Sayamoorthy K., Herlyn M (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* **61**: 3819-1825
- Li G.**, Satyamoorthy K., Herlyn M (2002). Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **13**: 62-70
- Li J.**, Brown LF., Hibberd MG., Grossman JD., Morgan JP., Simons M (1996). VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* **270**: 1803-1811

- Liang P.,** Pardee A (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-970
- Linnemann D.,** Raz A., Bock E (1989). Differential expression of cell adhesion molecules in variants of K1735 melanoma cells differing in metastatic capacity. *Int. J. Cancer* **43**: 709-712
- Luca MR.,** Bar Eli M (1998). Molecular changes in human melanoma metastasis. *Histol. Histopathol.* **13**: 1225-1231
- Lund A.,** Knudsen SM., Visssing H., Clark B., and Tommerup N (1996). Assignment of human elongation factor 1 Alpha genes: EEF1A maps to chromosome 6q14 and EEF1A2 to 20q13.3. *Genomics* **36**: 359-361
- Luo K.,** Stroschein SL., Wang W., Chen D., Martens E., Zhou S., Zhou Q (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF- β signaling. *Genes Dev.* **13**: 2196-2206
- Luo L.,** Salunga SC., Guo H., Bittner A., Joy KC., Galindo JE., Xiao H., Rogers KE., Wan JS., Jackson MR., Erlander MG (1999). Gene expression profiles to laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat. Med.* **5**: 117-122
- Lutz-Bonengel S.,** Schmidt U., Schmitt T., Pollak S (2003). Sequence polymorphism within the human mitochondrial genes MTATP6, MTATP8 and MTND4. *Int. J. Legal. Med.* **117**: 133-142
- Luzzi V.,** Mahadevappa M., Raja R., Warrington JA., Watson MA (2003). Accurate and reproducible gene expression profiles from laser capture microdissection, transcript amplification, and high density oligonucleotide microarray analysis. *J. Mol. Diagn.* **5**: 9-14
- Maitra A.,** Gazdar AF., Moore TO., Moore AY (2002). Loss of heterozygosity analysis of cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi: laser capture microdissection demonstrates clonal genetic changes in acquired nevocellular nevi. *Hum. Pathol.* **33**: 191-197
- Maity A.,** Pore N., Lee J., Solomon D., O'Rourke DM (2000). Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulate endothelial growth factor expression in human glioblastoma cell pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct induced by hypoxia. *Cancer Res.* **60**: 5879-5886
- Mansson-Brahme E.,** Johansson H., Larsson O., Rutqvist LE., Ringborg U (2002). Trends in incidence of cutaneous malignant melanoma in a Swedish population 1976-1994. *Acta. Oncol.* **41**: 138-146
- Mao L.,** Merlo A., Bedi G (1995). A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res.* **55**: 2995-2997
- Mareel M.,** Boterberg T., Noe V., Van Hoorde L., Vermeulen S., Bruyneel E., Bracke M (1997). E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *J. Cell Physiol.* **173**: 271-274
- Marrett LD.,** Nguyen HL., Armstrong BK (2001). A proposal for cervical screening information systems in developing countries. *Int. J. Cancer* **92**: 457-462
- Massague J.,** Blain SW., Lo RS (2000). TGF- β signalling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**: 295-309
- Matz MV.,** Lukyanov SA (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res.* **16**: 5537-5543
- Matz MV.,** Lukyanov SA., Bogdanova E., Diatschenko L., & Chenchik A (1998). Amplification of cDNA ends on template switching effect and step out PCR. *Nucleic Acids Res.* **27**: 1558-1560
- McDonald GH.,** Itoh-Lindstrom Y., Ting JP (1995). The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *J. Biol. Chem.* **270**: 3527-3533
- McGary EC.,** Lev DC., Bar-Eli M (2002). Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol. Ther.* **1**: 459-465
- McGill GG.,** Horstmann M., Widlund HR., Du J., Motyckova G., Nishimura EK., Lin YL., Ramaswamy S., Avery W., Ding HF., Jordan SA., Jackson IJ., Korsmeyer SJ., Golub TR., Fisher DE (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* **109**: 707-718
- Meade-Tollin LC.,** Pipes BL., Anderson SJ., Seftor EA., Hendrix MJ (1990). A comparison of levels of intrinsic single strand breaks/alkali labile sites associated with human melanoma cell invasion. *Cancer Lett.* **53**: 45-54
- Meier F.,** Satyamoorthy K., Nesbit M., Hsu MY., Schitteck B., Garbe C., Herlyn M (1998). Molecular events in melanoma development and progression. *Frontiers in Bioscience* **3**: 1005-1010

- Meier F.**, Nesbit M., Hsi MY., Martin B., van Belle P., Elder DE., Schaumburg-Lever G., Garbe C., Walz TM., Donatien P., Crombleholme M., Herlyn M (2000). Human melanoma progression in skin reconstructs: biological significance of bFGF. *Am. J. Pathol.* **156**: 193-200
- Meier F.**, Will S., Ellwanger U., Schlagenhauff B., Schitteck B., Rassner G., Garbe C (2002). Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br. J. Dermatol.* **147**: 62-70
- Meier F.**, Caroli U., Sayamoorthy K., Schitteck B., Bauer J., Berking C., Möller H., Maczey E., Rassner G., Herlyn M., Garbe C (2003). Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or $\beta 3$ integrin promotes progression of melanocytes to melanoma. *Exp. Dermatol.* **12**: 296-306
- Mertens PR.**, Alfonso-Jaume MA., Stenmann K., Lovett DH (1998). A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **273**: 32957-32965.
- Mertens PR.**, Steinmann K., Alfonso-Jaume MA., En-Nia A., Sun Y., Lovett DH (2002). Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 24875-24882
- Mesri M.**, Wal NR., Li J., Kim RW., Altieri DC (2001). Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J. Clin. Invest.* **108**: 981-990
- Meurisse M.**, Defechereux T., Meurisse N., Bataille Y., Hamoir E (2002). New challenges in the treatment of early breast cancer or surgery for early breast cancer ... can less be more? *Acta. Chir. Belg.* **102**: 97-109
- Michel C.**, Desdouets C., Sacre-Salem B., Gautier JC., Roberts R., Boitier E (2003). Liver gene expression profiles of rats treated with clofibrate: comparison of whole liver and laser capture microdissected liver. *Am. J. Pathol.* **163**: 2191-2199
- Mikulowska-Mennis A.**, Taylor TB., Vishnu P., Michie SA., Raja R., Horner N., Kunitake ST (2002). High-quality RNA from cells isolated by laser capture microdissection. *BioTechniques* **33**: 176-179
- Mills L.**, Tellez C., Huang S., Baker C., McCarty M., Green L., Gudas JM., Febg X., Bar-Eli M (2002). Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumour growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res.* **62**: 5106-5114
- Mishmar D.**, Ruiz-Pesini E., Golik P., Macaulay V., Clark AG., Hosseini MB., Easley K., Chen E., Brown MD., Sukernik RI., Olckers A and Waallace DC (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *PNAS* **100**: 171- 176
- Modugno M.**, Tagliabue E., Ardini E., Berno V., Galmozzi E., De Bortoli M., Castronovo V. and Menard S (2002). p53-dependent downregulation of metastasis-associated laminin receptor. *Oncogene* **21**: 7478-7487
- Mohler T.**, Scheibenbogen C., Haefle J., Willhauck M., Keilholz U (1996). Regulation of interleukin-8 mRNA expression and protein secretion in a melanoma cell line by tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Melanom Res.* **6**: 307-311
- Montuori N.** and Sobel EL (1996). The 67 kDa Laminin Receptor and Tumour Progression. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **213**: 205-214.
- Mueller MD.**, Vigne JL., Minchneko A., Lebovic DI., Leitman DC., Taylor RN (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10972-10977
- Muller A.**, Homey B., Soto H (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**: 50-56
- Murphy G.**, Ward R., Hembry RM., Reynolds JJ., Kuhn K., Tryggvason K (1989). Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. *Biochem. J.* **258**: 463-472
- Nagata Y.**, Yamashiro S., Yodoi J., Lloyd, K.O., Shiku H., Furukawa K (1992). Expression cloning of $\beta 1,4$ -N-acetylgalactosaminyltransferase cDNAs that determine the expression of GM2 and GD2 gangliosides. *J. Biol. Chem.* **267**: 12082-12089
- Naoki K.**, Chen TZ., Richards WG., Sugarbaker DJ., Meyerson M (2002). Missense mutation of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* **62**: 7001-7003
- Natali PG.**, Nicotra MR., Di Renzo MF., Prat M., Bigotti A., Ullrich A (1992). Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit protooncogene receptor. *Int. J. Cancer* **52**: 197-201

- Nelson WJ., Nusse R (2004).** Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherins pathways. *Science* **303**: 1483-1487
- Nesbit M., Nasbit HK., Bennett J., Andl T., Hsu MY., Dejesus E., McBrain M., Gupta AR., Eck SL., Herlyn M (1999).** Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene* **18**: 6469-6476
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S (1999).** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. *FASEB J.* **13**: 9-22
- Nicol R., and Stavnezer E (1998).** Transcriptional repression by v-Ski and c-Ski mediated by a specific DNA binding site. *J. Biol. Chem.* **273**: 3588–3597
- Niu G., Bowman T., Huang M., Shivers S., Reintgen D., Daud A., Chang A., Kraker A., Jove R., Yu H (2002).** Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* **21**: 7001-7010
- Nomura M., Shimizu S., Sugiyama T., Narita M., Ito T., Matsuda H., Tsujimoto Y (2003).** 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* **278**: 2058-2065
- Norris W (1820).** A case of fungoid disease. *Edinb. Med. Surg. J.* **16**: 562-565
- Noonan FP., Otsuka T., Bang S., Anver MR., Merlino G (2000).** Accelerated ultraviolet radiation-induced carcinogenesis in hepatocyte growth factor/scatter factor transgenic mice. *Cancer Res.* **60**: 3738-3743
- Noonan FP., Dudek J., Merlino G., De Fabo EC (2003).** Animal models of melanoma: an HGF/SF transgenic mouse model may facilitate experimental access to UV initiating events. *Pigment Cell Res.* **16**:16-25
- Nyormoi O., Bar-Eli M (2003).** Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma. *Clin. Exp. Metastasis* **20**: 251-263
- Odintsova TL., Muller EC., Ivanov AV., Egorov TA., Bienert R., Vladimirov SN., Kostka S., Otto A., Wittmann-Liebold B., Karpova GG (2003).** Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. *J. Protein Chem.* **22**: 249-258
- Ohashi A., Funasaka Y., Ueda M (1996).** C-KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi. *Melanoma Res.* **6**: 25-30
- Ohga T., Uchiumi T., Makino Y., Koike K., Wada M., Kuwano M., Kohno K (1998).** Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J. Biol. Chem.* **273**: 5997-6000
- Ohnishi Y., Tajima S., Ishibashi A (2001).** Coordinate expression of membrane type-matrix metalloproteinase-2 and 3 (MT2-MMP and MT3-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in primary and metastatic melanoma cells. *Eur. J. Dermatol.* **11**: 420-423
- Ohyama H., Zhang X., Kohno Y., Alevizos I., Posner M., Wong DT., Todd R (2000).** Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridisation. *BioTechniques* **29**: 530-536
- Olie RA., Hafner C., Kuttel R., Sigrist B., Willers J., Dummer R., Hall J., Stahel RA., Zangenmeister-Wittke U (2002).** Bcl-2 and bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages. *J. Invest. Dermatol.* **118**: 505-512
- Oliva AA., Swann JW (2000).** Increased yield of PCR products by addition of T4Gene 32 Protein to the SMARTTM PCR cDNA synthesis system. *BioTechniques* **31**: 81-86
- Oliver, NA., Wallace, DC (1982).** Assignment of two mitochondrially synthesized polypeptides to human mitochondrial DNA and their use in the study of intracellular mitochondrial interaction. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 30-41
- Oltvai Z., Millmann C., Korsmeyer SJ (1993).** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **774**: 609-619
- O'Reilly MS., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal RA., Moses M., Lane WS., Cao Y., Sage EH., Folkman J (1994).** Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediated the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell* **79**: 315-326
- O'Reilly MS., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane WS., Flynn E., Birkhead JR., Olsen BR., Folkman J (1997).** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Cell* **88**: 277-285

- Orfanos CE.,** Jung EG., Rassner G., Wolff HH., Garbe C (1994). Position and recommendations of the Malignant Melanoma Committee of the German Society of Dermatology on diagnosis, treatment and after-care of malignant melanoma of the skin. Status 1993/94. *Hautarzt* **45**: 285-91
- Osborne JE (2002).** Skin cancer screening and surveillance. *Br. J. Dermatol.* **146**: 745-754
- Osterlind A.,** Moller Jensen O (1986). Trend in incidence of malignant melanoma of the skin in Denmark 1943-1982. *Recent. Results. Cancer Res.* **102**: 8-17
- Palmantier R.,** George MD., Akiyama SK., Wolber FM., Olden K., Roberts JD (2001). Cis-polyunsaturated fatty acids stimulate beta1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type IV collagen by activating protein kinases C-epsilon and -mu. *Cancer Res.* **61**: 2445-2452
- Palmer JS.,** Duffy DL., Box NF., Aitken JF., O’Gorman LE., Green AC., Hayward NK., Martin NG., Sturm RA (2000). Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 176-186
- Pancock JD.,** Reisfeld RA., Varki N., Vitiello A., Fox RI., Montgomery AM (1997). Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J. Immunol.* **158**: 4413-4421
- Pant K.,** Karpel RI., Williams MC (2003). Kinetic regulation of single DNA molecule denaturation by T4 gene 32 protein structural domains. *J. Mol. Biol.* **327**: 571-578
- Papp T.,** Pemsel F., Zimmermann R (1999). Mutational analysis of N-ras, p53, p16INK4a, CDK4 and MC1R genes in human congenital melanocytic naevi. *J. Med. Genet.* **36**: 610-614
- Parmiter AH.,** Balaban G., Clark Jr WH., Nowell PC (1998). Possible involvement of the chromosome region 10q24-q26 in early stages of melanocytic neoplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **30**: 313-317
- Paznekas WA.,** Okajima K., Schertzer M., Wood S., Jabs EW (1999). Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAIL1) and a related processed pseudogene (SNAIL1P). *Genomics* **62**: 42-49
- Pearson G (2001).** Mitogen-activated protein kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* **22**: 153-183
- Pennati M.,** Coltella G., Folini M., Citti L., Dandone MG., Zaffarano N (2002). Ribozyme-mediated attenuation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *J. Clin. Invest.* **109**: 285-286
- Penninger JM.,** Woodgett J (2001). Stem cells. PTEN--coupling tumour suppression to stem cells? *Science* **294**: 2116-2118
- Perreira M.,** Simpsons-Haidaris PJ (2001). Fibrinogen modulates gene expression in wounded fibroblasts. *Am. NY Acad. Sci.* **936**: 438
- Peterson LL.,** Woodward WR., Fletcher WS., Palmquist M., Tucker MA., Ilias A (1988). Plasma 5-S-cysteinyl-dopa differentiates patients with primary and metastatic melanoma from patients with dysplastic nevus syndrome and normal subjects. *J. Am. Acad. Dermatol.* **19**: 509-515
- Petrocelli T.,** Slingerland J (2000). UVB induced cell cycle checkpoints in an early stage human melanoma line, WM35. *Oncogene* **19**: 4480-4490
- Petter R.,** Moshitschs S., Rozenblatts S., Nuchamowitz Y., Mirelman D (1994). Characterization of two distinct gene transcripts for ribosomal protein L21 from pathogenic and nonpathogenic strains of *Endamoeba histolytica*. *Gene* **150**: 181-186
- Plafker SM.,** Macara IG (2002). Ribosomal protein L12 uses a distinct nuclear import pathway mediated by importin 11. *Mol. Cell Biol.* **22**: 1266-1275
- Philip S.,** Kundu GC (2003). Osteopontin induces nuclear factor kappa B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I kappa B alpha /IKK signaling pathways, and curcumin (diferulolylmethane) down-regulates these pathways. *J. Biol Chem.* **278**: 14487-14497
- Piccinini S.,** Doglioni C., Maestro R (1997). p16/CDKN2 and CDK 4 gene mutations in sporadic melanoma development and progression. *Int. J. Cancer* **74**: 26-30
- Pollock PM.,** Spurr N., Bishop T (1998). Haplotype analysis of two recurrent CDKN2A mutations in 10 melanoma families: evidence for common founders and independent mutations. *Hum. Mutat.* **11**: 424-431

- Pomyje J., Zivny JH., Stopka T (2001).** Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in tumour and non-tumour tissues during growth of experimental melanoma. *Melanoma Res.* **11:** 639-643
- Popovic DM., Stuchebrukhov AA (2004).** Proteon pumping mechanism and catalytic cycle of cytochrome c oxidase: coulumb pump model with kinetic gating. *FEBS Letter* **566:** 126-130
- Poser I., Domínguez D., de Herreros AG., Varnai A., Buettner R., Bosserhoff AK (2001).** Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J. Biol. Chem.* **27:** 25661-24666
- Poser I., Golob M., Buettner R., Bosserhoff AK (2003).** Upregulation of HMG1 leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype. *Mol. Cell. Biol.* **23:** 2991-2998
- Poser I., Bosserhoff AK (2004).** Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histo. Histopathol.* **19:** 173-188
- Puskas LG., Zvara A., Hackler L., van Hummelen P (2002).** RNA Amplification results in reproducible microarray data with slight ratiom bias. *BioTechniques* **32:** 1330-1340
- Rahman MM., Miyamoto H., Takatera H., Yeh S., Altuwajri S., and Chang C (2003).** Reducing the agonist activity of antiandrogens by a dominant-negative androgen receptor coregulator ARA70 in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **278:** 19619-19626
- Rao CN., Barsky SH., Terranova VP., Liotta LA (1983).** Isolation of a tumour cell laminin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111:** 804-808
- Rao CN., Castronovo V., Schmitt MC (1989).** Evidence for precursor of the high-affinity metastasis-associated murine laminin receptor. *Biochemistry* **28:** 7476-7486
- Raza SL., Cornelius LA (2000).** Matrix metalloproteinases: pro- and anti- angiogenic activities. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **5:** 47-54
- Redondo P., Bandres E., Solano T., Okroujnov I., Garcia-Foncillas J (2000).** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and melanoma. N-acetylcysteine downregulates VEGF production in vitro. *Cytokine* **12:** 374-378
- Reed JA., Loganzo F., Shea CR., Waker GJ., Flores FJ., Glendening JM., Bogdany JK., Shiel MJ., Haluska FG., Fountain JW (1995).** Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumour suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumour progression. *Cancer Res.* **55:** 2713-2718
- Reed JA., Bales E., Xu W., Okan NA., Bandyopadhyay D., Medrano EE (2001).** Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.* **61:** 8074-8078
- Reifenberger J., Wolter M., Boström J., Büschges R., Schulte KW., Megahed M., Ruzicka T., Reifenberger G (2000).** Allelic losses in chromosome arm 10q and mutation of the PTEN (MMAC1) tumour suppressor gene in primary and metastatic malignant melanomas. *Virchows Arch.* **436:** 487-493
- Ridley AJ (2001).** Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11:** 471-477
- Rigel DS (1997).** Malignant melanoma: incidence issues and their effect in diagnosis and treatment in the 1990s. *Mayo. Clin. Proc.* **72:** 367-371
- Röckmann H., Schadendorf D (2003).** Drug resistance in human melanoma: mechanisms and therapeutic opportunities. *Onkologie* **26:** 581-587
- Rofstad EK., Danielsen T (1998).** Hypoxia-induces angiogenesis and vascular endothelial growth factor secretion in human melanoma. *Br. J. Cancer* **77:** 897-902
- Rofstad EK., Halsor EF (2000).** Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res.* **60:** 4932-4938
- Romberger DJ (1997).** Fibronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29:** 939
- Ronai Z., Yang YM., Fuchs SY., Adler V., Sardana M., Herlyn M (1998).** ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells. *Oncogene* **16:** 523-531
- Rosivatz E., Becker I., Specht K., Fricke E., Lubert B., Busch R., Höfler H., Becker KF (2002).** Differential expression of the epithelia-mesenchymal transition regulators Snail, SIP1, and Twist in gastric cancer. *Am. J. Pathol.* **161:** 1881-1891

- Rubinfeld B.**, Robbins P., El-Gamil M., Albert I., Porifiri E., Polakis P (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* **275**: 1790-1792
- Rumpler G.**, Becker B., Hafner C., McClelland M., Stolz W., Landthaler M., Schmitt R., Bosserhoff A., Vogt T (2003). Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp. Dermatol.* **12**: 761-771
- Rummel MM.**, Sers C., Johnson JP (1996). Phorbol ester and cyclic AMP-mediated regulation of the melanoma-associated cell adhesion molecule MUC18/MCAM. *Cancer Res.* **56**: 2218-2223
- Ryan AK.**, Reosenfeld MG (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and development codes. *Genes Dev.* **11**: 1207-1225
- Sahai E.**, Marshall CJ (2002). RHO-GTPases and Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2**: 133-142
- Saiki RK.**, Gelfand DH., Stoffel S., Scharf SJ., Higuchi R., Horn GT., Mullis KB., and Erlich HA (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase *Science* **239**: 487-491
- Saji H.**, Toi M., Saji S., Koike M., Kohno K. and Kuwano M (2003). Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast carcinoma. *Cancer Lett.* **190**: 191-197
- Sakura H.**, Maekawa T., Imamoto F., Yasuda K., Ishii S (1988). Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene* **73**: 499-507
- Sambrook J.**, Gething MJ (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **16**: 224-225
- Sander CA.**, Flaig MJ., Yazdi AS (2003). IL-20 Laser capture microdissection, an overview and application on pigment cell research. *Pigment Cell Res.* **16**: 581
- Sanger Centre**, and The Washington University Genome Sequencing Center (1998). Toward a Complete Human Genome Sequence. *Genome Research* **8**: 1097-1108
- Sanger F.**, Nicklen S., and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Satoh K.**, Narumi K., Sakai T., Abe T., Kikuchi T., Matsushima K., Sindoh S., Motomiya M (1992). Cloning of 67-kDa laminin receptor cDNA and gene expression in normal and malignant cell lines of the human lung. *Cancer Lett.* **62**: 199-203
- Satyamoorthy K.**, Li G., Gerrero MR., Brose MS., Volpe P., Weber BL., Van Belle P., Elder DE., Herlyn M (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* **63**: 756-759
- Schaart FM.**, Garbe C., Orfanos CE (1993). Disappearance of the ozone layer and skin cancer: attempt at risk assessment. *Hautarzt* **44**: 63-68
- Scheibenbogen C.**, Möhler T., Haefele J., Hunstein W., Keilholz U (1995). Serum interleukin-8 (IL-8) is elevated in patients with metastatic melanoma and correlates with tumour load. *Melanoma Res.* **5**: 179-181
- Schmid P.**, Itin P., Ruffli T (1995). In situ analysis of transforming growth factor-beta s (TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3), and TGF-beta type II receptor expression in malignant melanoma. *Cancerogenesis* **126**: 1499-1503
- Scott HS.**, Chrast R (2001). Global transcript expression profiling by serial analysis of gene expression (SAGE). *Genet. Eng. (NY)* **23**: 201-219
- Scott M.**, Plafker and Ian G. Macara (2000). Importin-11, a nuclear import receptor for the ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2. *EMBO Journal* **19** : 5502–5513
- Sgroi DC.**, Teng S., Robinsons G., LeVangie R., Hudson JR., Elkahloun AG (1999). *In vivo* gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res.* **59**: 5656-5661
- Shabazi M.**, Pravica V., Nasreen N., Fakhoury H., Fryer AA., Strange RC., Hutchinson PE., Osborne JE., Lear JT., Smith AG., Hutchinsin IV (2002). Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet.* **359**: 397-401
- Sharpless NE.**, Kannan K., Xu J., Bosenberg MW., Chin L (2003). Both products of mouse Ink4a/ARF locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene* **7**: 5055-5059
- Shibahara K.**, Uchiumi T., Fukuda T., Kura S., Tominaga Y., Maehara Y., Kohno K., Nakabeppu Y., Tsuzuki T., Kuwano M (2004). Targeted disruption of one allele of the Y-box binding protein-1 (YB-1) gene in mouse embryonic stem cells and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C. *Cancer Sci.* **95**: 348-353

- Shih IM.,** Elder DE., Hsu MY., Herlyn M (1994). Regulation of MelCAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumour progression by normal keratinocytes. *J. Pathol.* **145:** 837-845
- Shih IM.,** Speicher D., Hsu MY., Levine E., Herlyn M (1997). Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic Mel-Cam/ligand adhesion. *Cancer Res.* **57:** 3835-3840
- Shiojima I.,** Walsh K (2002). Role of Akt-signalling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ. Res.* **90:** 1243-1250
- Shimizu T.,** Ihara K., Maesaki R., Kuroda S., Kaibuchi K., Hakoshima T (2000). An open conformation of switch I revealed by crystal structure of a Mg²⁺-free form of RhoA complexed with GDP. *J. Biol. Chem.* **275:** 18311-18317
- Shoffner JM.,** Kaufmann A., Koontz D., Krawiecki N., Smith E., Topp M., Wallace DC (1995). Oxidative phosphorylation diseases and cerebellar ataxia. *Clin. Neurosci.* **3:** 43-53
- Siemeister G.,** Schirner M., Weindel K (1999). Two independent mechanisms essential for tumour angiogenesis: inhibition of human melanoma xenografts growth by interfering with either vascular endothelial growth factor receptor pathway or the TGF- β pathway. *Cancer Res.* **59:** 3185-3191
- Simone NL.,** Bonner RF., Gillespie JW., Emmert-Buck MR., Liotta LA (1998) Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet.* **147:** 272-276
- Simone NL.,** Remaley AT., Charboneau L., Petricoin EF., Glickman JW., Emmert-Buck MR., Fleisher T., Liotta LA (2000). Sensitive immunoassay of tissue cell proteins procured by laser capture microdissection. *J. Pathol.* **156:** 445-156
- Simonetti O.,** Lucarini G., Brancorsini D., Nita P., Bernardini ML., Bigini G., Offidani A (2002). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *American Cancer Society* **3:** 1963-1970
- Singh RK.,** Gutman M., Reich R., Bar-Eli M (1995). Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8. *Cancer Res.* **55:** 3669-3674
- Singh RK.,** Varney ML (2000). IL-8 expression in malignant melanoma: implications in growth and metastasis. *Histol. Histopathol.* **15:** 843-849
- Sinha P.,** Kohl S., Fischer J., Hutter G., Kern M., Kottgen E., Dietel M., Lage H., Schnolzer M., Schadendorf D (2000). Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **21:** 3048-3057
- Smalley KSM (2003).** A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int. J. Cancer* **104:** 527-532
- Soengas MS.,** Capodici P., Polsky D., Mora J., Esteller M., Opitz-Araya X., McCombie R., Herman JG., Gerald WL., Lazebnik YA., Cordon-Cardo C., Lowe SW (2001). Inactivation of the apoptosis effector *Apaf-1* in malignant melanoma. *Nature* **409:** 207-211
- Soengas MS.,** Lowe SW (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22:** 3138-3151
- Soubrane C.,** Mouawad R., Antoine EC., Verola O., Gil-Delgado M., Khayat D (2000). A comparative study of Fas and Fas-ligand expression during melanoma progression. *Br. J. Dermatol.* **143:** 307-312
- Sulston JE.,** and Waterson R. (1998). Toward a complete human genome sequence. *Genome Res.* **8:** 1097-1108
- Stott FJ.,** Bates S., James MC (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* **17:** 5001-5014
- Strausberg RL.,** Feingold EA., Grouse LH., Derge JG., Klausner RD., Collins FS., Wagner L., Shenmen CM., Schuler GD., Altshul SF., Zeeberg B., Buetow KH., Schaefer CF., Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA., Rubin GM., Hong L., Stapleton M., Soares MB., Bonaldo MF., Casavant TL., Scheetz TE., Brownstein MJ., Usdin TB., Toshiyuki S., Carninci P., Prange C., Raha SS., Loquellano NA., Peters GJ., Abramson RD., Mullahy SJ., Bosak SA., McEwan PJ., McKernan KJ., Malek JA., Gunaratne PH., Richards S., Worley KC., Hale S., Garcia AM., Gay LJ., Hulyk SW., Villalon DK., Muzny DM., Sodergren EJ., Lu X., Gibbs RA., Fahey J., Helton E., Ketteman M., Madan A., Rodrigues S., Sanchez A., Whiting M., Madan A., Young AC., Shevchenko Y., Bouffard GG., Blakesley RW., Touchman JW., Green ED., Dickson MC., Rodriguez AC., Grimwood J., Schmutz J., Myers RM., Butterfield YS., Krzywinski MI., Skalska U., Smailus DE., Schnerch A., Schein JE., Jones SJ., Marra MA., Mammalian Gene Collection Program Team (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99:** 16899-903

- Streit M.,** Stephen AE., Hawighorst T., Matsuda K., Lange-Asschenfeldt B., Broen LF., Vacanti JP., Detman M (2002). Systemic inhibition of tumour growth and angiogenesis by Thrombospondin-2 using cell-based antiangiogenic gene therapy. *Cancer Res.* **62**: 2004-2012
- Streit M.,** Detmar M (2003). Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* **22**: 3172-3179
- Sturm RA.,** O'Sullivan BJ., Thomson JA., Jamshida N., Pdeley J., Parsons PG (1994). Expression studies of pigmentation and POU-domain genes in human melanoma cells. *Pigment Cell Res.* **7**: 235-240
- Sturm RA.,** Satayamoorthy K., Meier F., Gardiner BB., Smit DJ., Vaidya L., Herlyn M (2002). Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta (3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Res.* **62**: 226-232
- Su JM.,** Perlaky L., Li XN., Leung HC., Antalffy B., Armstrong D., Lau CC (2004). Comparison of ethanol versus formalin fixation on preservation of histology and RNA in laser capture microdissected brain tissues. *Brain Pathol.* **14**: 175-18
- Sulston IA.,** Anderson KV (1998). Altered patterns of gene expression in *Tribolium* segmentation mutants. *Dev. Genet.* **23**: 56-64
- Sun Y.,** Liu X., Eaton EN., Lane WS., Lodish HF., Weinberg, RA (1999). Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF- β signaling. *Mol. Cell.* **4**: 499-509
- Sviderskaya EV.,** Gray-Schopfer VC., Hill SP., Smit NP., Evans-Whipp TJ., Bond J., Hill L., Bataille V., Peters G., Kipling D., Wynford-Thomas D., Bennett DC (2003). p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: possible implications for melanoma progression. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**: 723-732
- Swamynathan SK.,** Varma BR., Weber KT., Guntaka RV (2002). Targeted disruption of one allele of the Y-box protein gene, Chk-YB-1b, in DT40 cells results in major defects in cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**: 451-577
- Tachibana M** (2000). MITF: A stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res.* **13**: 230-240
- Tamura S** (1997). The E-cadherin-mediated cell-cell adhesion system in human cancers. *Br. J. Surg.* **84** : 899-900
- Tang L.,** Tron VA., Reed JC (1998). Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* **4**: 1865-1871
- Tellez C.,** Bar-Eli M (2003). Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene* **22**: 3130-3137
- Terheyden P.,** Siedel C., Merkel A., Kampgen E., Brocker EB., Becker JC (1999). Predominant expression of Fas (CD95) ligand in metastatic melanoma revealed by longitudinal analysis. *J. Invest. Dermatol.* **112**: 899-902
- Thin, TH.,** Kim, E., Yeh, S., Sampson, ER., Chen, YT., Collins, LL., Basavappa, R. and Chang, C (2002). Mutations in the helix 3 region of the androgen receptor abrogate ARA70 promotion of 17 β -estradiol-induced androgen receptor transactivation. *J. Biol. Chem.* **277**: 36499-36508
- Thomson JA.,** Murphy K., Baker E., Sutherland GR., Parsons PG., Sturm RA (1995). The *brn-2* gene regulates the melanocytic phenotype and tumorigenic potential of human melanoma cells. *Oncogene* **11**: 690-700
- Tomlinson IP.,** Bodmer WF (1995). The HLA system and the analysis of multifactorial genetic disease. *Trends Genet.* **11**: 493-498
- Tsao H.,** Benoit E., Sober AJ., Thiele C., Haluska FG (1998). Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the cyclin-dependent kinase-4 gene. *Cancer Res.* **58**: 109-113
- Tsao H.,** Zhang X., Benoit E., Haluska FG (1998). Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene* **16**: 1800-1804
- Tsujimoto Y.,** Cossmann J., Jaffe E (1995). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**: 1440-1443
- Tucker MA.,** Goldstein AM (2002). Melanome etiology: where are we? *Oncogene* **22**: 3042-3052
- Uetsuki T.,** Naito A., Nagata S., and Kaziro Y (1989). Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor 1 alpha. *J. Bio. Chem.* **264**: 5791-5798

- Vaarala MH.**, Porvari KS., Kyllonen AP., Mustonen MV., Lukkarinen O., Vihko PT (1998). Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-cancer tissue samples. *Int J Cancer*. **78**: 27-32
- Vacca A.**, Ribatti D., Roncali L., Lospalluti M., Serio G., Carrel S., Dammacco F (1993). Melanocyte tumour progression is associated with changes in angiogenesis and expression at the 67 kilodalton laminin receptor. *Cancer* **72**: 455-461
- Vaheri A** (1978). High molecular weight, cell surface-associated glycoprotein (fibronectin) lost in malignant transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **516**: 1
- Vajkoczy P.**, Farhadi M., Gaumann A (2002). Microtumour growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-1, and angiopoietin-2. *J. Clin. Invest.* **109**: 777-785
- Valverde P.**, Healey E., Jackson I., Rees JL., Thody AJ (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* **11**: 328-330
- Van Belle P.**, Rodeck U., Nuamah I., Halpern AC., Elder DE (1996). Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms. *Am. J. Pathol.* **148**: 1887-1894
- Van de Broek I.**, Vanderkerken K., de Greef C., Asosingh K., Straetmans N., Van Camp B., Van Riet I (2001). Laminin 1 induced migration of multiple myeloma cells involves the high affinity 67 kDa laminin receptor. *Br. J. Cancer* **2**: 1387-1395
- Van den Brule FA.**, Berchuck A., Bast RC., Liu FT., Gilet C., Sobel ME., Castronovo V (1994). Differential expression of the 67-kDa laminin receptor and 31-kDa human laminin binding protein in human ovarian carcinomas. *Eur. J. Cancer* **30A**: 1096-1099
- van Dijk MC.**, Hilkmann H., van Blitterswijk WJ (1997) Platelet-derived growth factor activation of mitogen-activated protein kinase depends on the sequential activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C, protein kinase C-zeta and Raf-1. *Biochem. J.* **325**: 303-307
- Van Der Hoeven PC.**, Van Der Wal JC., Ruurs P., Van Dijk MC., Van Blitterswijk J (2000). 14-3-3 isotypes facilitate coupling of protein kinase C-zeta to Raf-1: negative regulation by 14-3-3 phosphorylation. *Biochem. J.* **345**: 297-306
- Van Kempen LCLT.**, van den Oord JJ., van Muijen GN., Weidle UH., Bloemers HP., Swart GW (2000). Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumour progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am. J. Pathol.* **156**: 769-774
- Van Kempen LCLT.**, Meier F., Egeblad M., Kersten-Niessen MJF., Garbe C., Weidle UH., van Muijen GNP., Herlyn M., Bloemers HPJ., Swart GWM (2004). Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule a gateway to melanoma metastasis. *J. Invest. Dermatol.* **122**: 1293-1301
- Varlamov DA.**, Kudin AP., Vielhaber S., Schroder R., Sassen R., Becker A., Kunz D., Haug K., Rebstock J., Heils A., Elger CE. and Kunz WS (2002). Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 1797-1805
- Velasco P.**, Lange-Asschenfeldt (2002). Dermatological aspects of angiogenesis. *Br. J. Dermatol.* **147**: 841-852
- Vernon SD.**, Unger ER., Rajeevan M., Dimulescu IM., Nisenbaum R., Campbell CE (2000). Reproducibility of alternative probe synthesis approaches for gene expression profiling with arrays. *J. Mol. Diagn.* **2**: 124-127
- Villalva C.**, Touriol C., Seurat P., Trempat P., Delsol G., Brousset P (2001). Increased yield of PCR products by addition of T4 gene 32 protein to the SMART PCR cDNA synthesis system. *BioTechniques* **31**: 81-86
- Vivanco I.**, Sawyers CL (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**: 489-501
- Vlahovic G.**, Crawford J (2003). Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist.* **8**: 531-538
- Vu TH.**, Werb Z (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* **14**: 2123-2133
- Walker GJ.**, Flores JF., Gelndening JM., Lin AH., Markl ID., Fountain JW (1998). Virtually 100% of melanoma cell lines harbour alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* **22**: 157-163
- Wang J.**, Hu L., Hamilton SR., Coombes KR., Zhang W (2003). RNA amplification strategies for cDNA microarray experiments. *BioTechniques* **34**: 394-400

- Wang X.**, Nakamura M., Mori I., Takeda K., Nakamura Y., Utsunomiya H., Yoshimura G., Sakurai T., Kakudo K (2004). Calcitonin receptor gene and breast cancer: quantitative analysis with laser capture microdissection. *Breast Cancer Res. Treat.* **83**: 109-117
- Wang Y.**, Becker D (1997). Antisense targeting of basic fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoural angiogenesis and tumour growth. *Nat. Med.* **3**: 887-893
- Wang Y.**, Becker D (1996). Differential expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p16 and p21 in the human melanocytic system. *Oncogene* **12**: 1069-1075
- Wang YL.** and Brown DD (1991). A gene expression screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 11505-11509
- Watanabe M.**, Isobe T., Ichimura T., Kuwano R., Takahashi Y., Kondo H., Inoue Y (1994). Molecular cloning of rat cDNAs for zeta and theta subtypes of 14-3-3 protein and differential distributions of their mRNAs in the brain. *Molec. Brain Res.* **25**: 113-121
- Welsh J.**, Chada K., Dalal SS., Ralph D., Cheng L., McClelland M (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic. Acids. Res.* **20**: 1965-1970
- Wellbrock C.**, Weisser C., Geissinger E., Troppmair J., Scharl M (2002). Activation of p59(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* **277**: 6443-6454
- Wellbrock C.**, Ogilvie L., Hedley D., Karasarides M., Martin J., Niculescu-Duvaz D., Springer CJ., Marais S (2004). ^{V599}EB-RAF is an oncogene in melanocyte. *Cancer Res.* **64**: 2338-2442
- Welle S.**, Thornton C, Bhatt K, Krym M (1997). Expression of elongation factor-1 alpha and S1 in young and old human skeletal muscle. *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* **52**: B235-239
- Weeraratna AT.**, Jiang Y., Hostetter G., Rosenblatt K., Duray P., Bittner M., Trent JM (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* **1**: 279-288
- Westermarck JF.**, Kähäri VM (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumour invasion. *FASEB J.* **13**: 781-792
- Widlund HR.**, Fisher DE (2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* **22**: 1035-3041
- Wiecker TS.**, Luther H., Buettner P., Bauer J., Garbe C (2003). Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood. *Cancer* **97**: 628-638
- Williams SL.**, Valnot I, Rustin P, Taanman JW (2004). Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J. Biol. Chem.* **279**: 7462-7469
- Wintzer M.**, Mladinic M., Lazarevic D., Casseler C., Cattaneo A., Nicholls J (2004). Strategies for identifying genes that play a role in spinal regeneration. *J. Anat.* **204**: 3-11
- Wölfel T.**, Hauer M., Schneider J (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **169**: 1281-1284
- Wollina U.**, Hipler UC., Knoll B., Graefe T., Kaatz M., Kirsch K (2001). Serum matrix metalloproteinase-2 in patients with malignant melanoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**: 631-635
- Woods D.**, Cherwinski H., Venetsanakos E., Bhat A., Gysin S., Humbert M., Bray PF., Saylor VL., McMahon M (2001). Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signalling pathway. *Mol. Cell Biol.* **21**: 3192-3205
- Worm J.**, Christensen C., Gronbaek K., Tulchinsky E., Guldberg P (2004). Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene* **10**: Epub
- Wu H.**, Goel V., Haluska FG (2003). PTEN signalling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**: 3113-3122
- Xiong S.**, Grijalva R., Zhang L (2001). Up-regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer by the heregulin-beta 1 activated p38 signalling pathway enhance endothelial cell migration. *Cancer Res.* **15**: 1727-1732
- Xu W.**, Angelis K., Danielpour D., Haddad MM., Bischof O., Campisi J., Stavnezer E., Medrano EE (2000). Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type-β transforming growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5924-5929
- Yaffe MB.**, Riitinger K., Volinia S., Caron PR., Aitken A., Leffers H., Gambelin SJ., Smerdon SJ., Cantley LC (1997). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**: 961-971

- Yamada KM.,** Araki M (2001). Tumour suppressor PTEN: modulator of cell signalling, growth, migration and apoptosis. *J. Cell Sci.* **114:** 2375-2382
- Yamamoto M.,** Wakatsuki T., Hada A., Ryo A (2001). Use of serial analysis of genes expression (SAGE) technology. *J. Immunol. Meth.* **250:** 45-66
- Yamashiro S.,** Ruan S., Furukawa K., Tai T., Lloyd K., K. O., Shiku H., Furukawa K (1993). Genetic and enzymatic basis for the differential expression of GM2 and GD2 gangliosides in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **53:** 5395-5400
- Yang XC.,** Hao F., Song ZQ., Cheng B., Yang WB., Zhong BY., Xiang MM (2004). Identification of differentially expressed genes in anagen dermal papilla by suppression subtractive hybridization. *Chin. Med.* **117:** 371-375
- Yap AS.,** Briher WM., Gumbiner BM (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13:** 119-146
- Yeh S,** Chang C (1996). Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93:** 5517-5521
- Yokoyama H.,** Harigae H., Takahashi S., Takahashi S., Furuyama K., Kaku M., Yamamoto M. and Sasaki T (2003). Regulation of YB-1 gene expression by GATA transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303:** 140-145
- Yokohama K.,** Kamata N., Hayashi E., Hoteiya T., Ueda N., Fujim L (2001). Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol.* **37:** 65-71
- Yoshinori I.,** Masahiro G., Michie S., Kiyomi T., Setsuo H (2002). Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis. *PNAS* **99:** 365-370
- Yu JL.,** Rak JW., Klement G., Kerbel RS (2002). Vascular endothelial growth factor isoform expression as a determinant of blood vessel patterning in human melanoma xenografts. *Cancer Res.* **62:** 1838-1846
- Yuan J.,** Slice L., Walsh JH., Rozengurt E (2000). Activation of protein kinase D by signaling through the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G(q). *J. Biol. Chem.* **275:** 2157-2164
- Yuen ST.,** Davies H., Chan TS., Ho JW., Bignell GR., Cox C., Stephens P., Edkins S., Tsui WW., Chan AS., Futreal A., Stratton MR., Wooster R., Leung SY (2002). Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS Mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res.* **62:** 6451-6455
- Zhang B.,** Zheng Y (1998). Regulation of RhoA GTP hydrolysis by the GTPase-activating proteins p190, p50RhoGAP, Ber and 3BP-1. *Biochemistry* **37:** 5249-5257
- Zhang H.,** Zhang R., Liang P (1996). Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic. Acids. Res.* **24:** 2454-2455
- Zhang H,** Schneider J, Rosdahl I (2002). Expression of p16, p27, p53, p73 and Nup88 proteins in matched primary and metastatic melanoma cells. *Int. J. Oncol.* **21:** 43-48
- Zhang H.,** Rosdahl I (2004). Deletion in p16INK4a and loss of p16 expression in human skin primary and metastatic melanoma cells. *Int. J. Oncol.* **24:** 331-335
- Zhang L.,** Zhou W., Velculescu VE., Kern SE., Hruban RH., Hamilton SR., Vogelstein B., Kinzler KW (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* **276:** 1268-1272
- Zhang YF.,** Homer C., Edwards SJ., Hananeia L., Lasham A., Royds J., Sheard P and Braithwaite AW (2003). Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53. *Oncogene* **22:** 2782-2794
- Zhou ZX.,** He B., Hall SH., Wilson EM., French FS (2002). Domain interactions between coregulator ARA(70) and the androgen receptor (AR). *Mol. Endocrinol.* **16:** 287-300
- Zhu G.,** Reynolds L., Crnogorac-Jurcevic T., Gillett CE., Dublin EA., Marshall JF., Barnes D., D'Arrigo C., Van Trappen PO., Lemoine NR., Hart IR (2003). Combination of microdissection and microarray analysis to identify gene expression changes between differentially located tumour cells in breast cancer. *Oncogene* **22:** 3742-3748
- Zhu YY.,** Machleder EM., Chenchik A., Li R., Siebert PD (2001). Reverse transcriptase templates switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques* **30:** 892-897
- Zhumabayeva B.,** Diatchenko L., Chenchik A., Siebert PD (2001). Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumours. *BioTechniques* **30:** 158-163

Zhou ZX., He B., Hall SH., Wilson EM., and French FS (2002). Domain interactions between coregulator ARA(70) and the androgenreceptor (AR). *Mol. Endocrinol.* **16** (2): 287-300

Zimmermann TS., Schmidt U., and Silver PA (2000). Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal Subunit *In Vivo* **11**: 3777-3789

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2001 bis Juli 2004 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. C. Garbe und Frau PD Dr. rer. nat. B. Schittek in der Sektion Dermatologische Onkologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen angefertigt. Bedanken möchte ich mich bei ihnen für die Aufnahme in das molekularbiologische Labor, das sehr gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wurde aus Mitteln des DFG-Graduiertenkollegs 686/1 unterstützt.

Danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. N. Blin für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Betreuung während der Promotionszeit.

Herzlichen Dank gilt allen Mitarbeiter der Sektion Dermatologische Onkologie, insbesondere Frau Dr. rer. nat. S. Busch, Frau S. Ghirmay, Frau E. Maczey, Frau O. Maksimovic, Frau PD Dr. med. F. Meier, Frau H. Möller, Frau S. Kronschnabel, Frau K. Psenner, Frau B. Sauer, T. Sinnberg und H. Steffen für die wunderschöne Zeit, das viele Lachen, die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und vor allem für die leckeren Zwischenmahlzeiten.

Danken möchte ich auch allen Stipendiaten und assoziierten Wissenschaftlern des Graduiertenkollegs für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderes Dankeschön gilt den Mitarbeitern der Abteilung Experimentelle Virologie (Prof. Dr. rer. nat. T. Iftner), der Abteilung Toxikologie (Prof. Dr. rer. nat. M. Schwarz), sowie der Frauenklinik (Dr. rer. nat. H. Neubauer) und der Tropenmedizin (Prof. Dr. med. P. Kreamsner) für ihre sehr gute Kooperation.

Es sei allen gedankt, die durch Diskussionen oder praktische Tipps zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Mann Nelson aussprechen, der mich während der gesamten Promotionszeit tatkräftig unterstützt hat.

Lebenslauf

Name: Fonseca da Cruz Lopes

Vorname: Olga Isabel

Wohnort: Schmidenerstr. 171
70374 Stuttgart

Geburtsdatum: 24.06.1975

Geburtsort: Sindelfingen

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 1981 – 1985 Grundschule in Böblingen
1985 – 1986 Hauptschule in Böblingen
1986 – 1991 Realschule in Böblingen
1991 – 1994 Gymnasium im Böblingen
(Naturwissenschaftliche Richtung)
April 1994 Abitur

Hochschulstudium: 10/1994 – 01/2001 Studium der Biologie an der
Universität Hohenheim in Stuttgart

Studienschwerpunkte: molekulare Genetik, Biochemie,
Mikrobiologie und Parasitologie

Diplomarbeit: 03/2000 – 01/2001 in der Abteilung molekulare Genetik in
Stuttgart bei Prof. Dr. A. Preiß

Thema: Untersuchung der Funktion der Pax-6 Gene *eyeless* und *twin of eyeless* in *Drosophila melanogaster*

Promotionsstudium: 02/2001 – 08/2004 Promotion in Biologie in der Sektion
dermatologische Onkologie der
Universitäts-Hautklinik bei Prof. Dr.
med. C. Garbe

Thema: Identifikation von differentiell exprimierten Genen beim
metastasierenden Melanom im Vergleich zum Primärtumor

Im Selbstverlag herausgegeben von
Olga Isabel Fonseca da Cruz Lopes
Schmidenerstr. 171
70374 Stuttgart