

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen
Sektion für Dermatologische Onkologie
Leiter: Professor Dr. C. Garbe

**Die Rolle von AP-2 α bei
der Melanomentstehung und Progression**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Cornelia Grieb, geb. Feike
aus
Sindelfingen

2006

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen
Sektion für Dermatologische Onkologie
Leiter: Professor Dr. C. Garbe

**Die Rolle von AP-2 α bei
der Melanomentstehung und Progression**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Cornelia Grieb, geb. Feike
aus
Sindelfingen

2006

Dekan:	Professor Dr. Claus D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Claus Garbe
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. P. Bossart

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DEPC-H ₂ O	Diethyl-Pyrocbonat-H ₂ O
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
N	Normal

Abkürzungen

NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer (Maß der Wellenlänge des Lichts)
NGS	normal goat serum (Ziegenserum)
NHS	normal horse serum (Pferdeserum)
NRS	normal rabbit serum (Kaninchenserum)
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethyldiamin
Tris-Base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-Base, mit HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit(s) (Enzymneinheit)
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht

SI-Einheiten

g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
m	Milli-

min	Minute(n)
μ	Mikro-
M	Molar
n	Nano-
sec	Sekunde(n)
V	Volt
°C	Grad Celcius

Verwendete Anglizismen

Anglizismen sind Begriffe englischsprachigen Ursprungs, die jedoch inzwischen weitgehend Eingang in den deutschen Sprachgebrauch gefunden haben. In der vorliegenden Arbeit werden sie in ihrer ursprünglichen Form verwendet und daher kurz erläutert.

Blot	Transfer einer bestimmten Substanz auf eine Membran
Kit	Kommerziell erhältliches Materialienset zur Durchführung eines Versuchsansatzes
Primer	kurzes synthetisches Oligonukleotid

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das melanozytäre System der Haut	1
1.2. Entwicklung und Progression des malignen Melanoms	4
1.3. Molekulare Veränderungen im malignen Melanom	13
1.3.1. Moleküle im malignen Transformationsprozess	14
1.4. Der Transkriptionsfaktor AP-2 α	27
1.4.1. Genetische Veränderungen von AP-2 α in Tumoren	29
1.4.2. Genetische Veränderungen von AP-2 α im malignen Melanom	31
1.5. Zielsetzung der Arbeit	34
2. Material und Methoden	35
2.1. Molekularbiologische Methoden	35
2.1.1. RNA-Isolierung	35
2.1.1.1. Herstellung RNase freier Lösungen und Arbeitsmaterialien	35
2.1.1.2. RNA-Isolierung.....	35
2.1.1.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA ..	36
2.1.2. Northern-Blot	37
2.1.2.1. RNA-Gel	37
2.1.2.2. Herstellung einer AP-2 α A-Digoxigenin- markierten AP-2 α A-Sonde	39
2.1.2.3. Herstellung einer 28-S-Oligo-Sonde	40
2.1.2.4. Herstellung einer β -Actin-Sonde.....	40
2.1.2.5. Northern Blot Hybridisierung und Detektion	41
2.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
2.1.3.1. Verwendete Primer	42
2.1.3.2. Reverse Transkription der RNA	43
2.1.3.3. Amplifizierung von AP-2 α A und AP-2 α B	43

Inhaltsverzeichnis

2.1.3.4.	Semiquantitative PCR	44
2.1.3.5.	Detektion der PCR-Produkte durch Agarosegel-Elektrophorese	45
2.1.3.6.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
2.1.4.	Klonierung von AP-2 α A cDNA in Plasmide	47
2.1.4.1.	Verwendete Vektoren und Klonierungsschema von AP-2 α A cDNA	47
2.1.4.2.	Klonierung von AP-2 α A in pBluescript II Sk Vektor	49
2.1.4.3.	Klonierung von AP-2 α A in pCR [®] 3.1-Uni Vektor	51
2.1.5.	Gewinnung von Plasmid-DNA	53
2.1.5.1	Minipräparation	53
2.1.5.2	Midipräparation	54
2.1.5.3	Analytischer Restriktionsverdau	55
2.1.6.	Sequenzierung	57
2.2.	Proteinanalytische Methoden	57
2.2.1.	Western-Blot Analyse	57
2.2.1.1.	Herstellung von Zellysaten	57
2.2.1.2.	Herstellung von nukleären Extrakten	58
2.2.1.3.	Western-Blot Analyse mit AP-2 α A spezifischen Antikörpern	58
2.2.1.4.	Western-Blot Analyse mit AP-2 α A und AP-2 α B spezifischen Antikörpern	60
2.2.1.5.	Western-Blot mit β -Actin Antikörpern	60
2.2.1.6.	Semiquantitative Auswertung des Western-Blots	61
2.3.	Histologische Methoden	61
2.3.1.	Immunhistologie	61
2.3.1.1.	Verwendete Schnitte und Schneidetechnik	61
2.3.1.2.	Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten	62
2.3.1.3.	Austestung der immunhistologischen Färbungen	62
2.3.2.	Konfokale Laserscanningmikroskopie	63
2.4.	Programme zur Auswertung	63

3. Ergebnisse	64
3.1. Expressionsanalyse von AP-2 α auf RNA-Ebene	64
3.1.1. Amplifikation und Klonierung von AP-2 α A	64
3.1.2. Expressionsanalyse von AP-2 α auf RNA-Ebene in verschiedenen Tumorzelllinien	74
3.1.3. Semiquantitative RT-PCR von AP-2 α A und AP-2 α B in verschiedenen Zelllinien	77
3.2. Expressionsanalyse von AP-2 α auf Proteinebene	86
3.2.1. Western-Blot Analyse von AP-2 α A	86
3.2.2. Vergleichende Western-Blot-Untersuchung zur Expression von AP-2 α A und AP-2 α B	91
3.3. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	94
3.3.1. Immunhistologischer Nachweis von AP-2 α im Melanomgewebe	94
3.3.2. Nachweis von AP-2 α im Melanomgewebe über Konfokale Laserscanningmikroskopie	98
4. Diskussion	104
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	104
4.2. Expressionsprofil von AP-2 α A und AP-2 α B in verschiedenen Zelllinien	105
4.3. Vergleich der Expression von AP-2 α in Melanomzelllinien und in situ Melanompräparaten	108
4.4. AP-2 α als mögliche molekulare Zielstruktur bei der Melanomtherapie?	110
4.5. Perspektive	111
5. Zusammenfassung	112
6. Literatur	114

1 Einleitung

1.1 Das melanozytäre System der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen. Sie besteht aus drei Schichten:

- 1) Zu oberst kommt die Epidermis, ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel. Der basale Teil der Epidermis bildet laufend neue Zellen, die innerhalb von drei Wochen an die Oberfläche wandern. Dabei differenzieren sie sich und werden schließlich an der Oberfläche als Hornschuppen (Korneozyten) abgestoßen. Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten, enthält jedoch auch Melanozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen.
- 2) Die Dermis (Lederhaut, Korium), die sich an die Epidermis anschließt, besteht aus Bindegewebe und liegt der Subcutis auf. Die Dermis lässt sich in zwei Schichten aufteilen, in das Stratum papillare und in das Stratum retikulare. Diese beiden Schichten unterscheiden sich in der Anordnung und der Dichte der Bindegewebsfasern voneinander. In der oberen Dermis (Stratum papillare) sind die Kollagenfasern lockerer gewebt als in der tiefen Epidermis (Stratum retikulare). Die Dermis dient der Stabilisierung der Haut, der Regulierung des Hautturgors und hat wichtige Funktionen bei der immunologischen Abwehr. Zwischen den Maschen des Fasernetzes liegen Immunzellen (Fibroblasten, Mastzellen, Makrophagen und Lymphozyten), die Haut versorgende Gefäße und Nerven.
- 3) Die Subkutis (Unterhaut) besteht aus lockerem Bindegewebe und läppchenartig aufgebautem Fettgewebe, das die Haut verschieblich mit den darunter gelegenen Strukturen (z.B. Faszien, Muskulatur) verbindet. Adnexorgane (Anhangsgebilde) wie Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen befinden sich ebenfalls in der Subkutis, obwohl sie epidermaler Herkunft sind (Fritsch, 1998; Rassner, 2002; Junqueira et al., 1996).

Die Haut erfüllt Sinnesfunktionen sowie Kontakt- und Schutzfunktionen (Fritsch, 1998; Rassner, 2002). Sie bietet Schutz vor mechanischer Belastung, Austrocknung, Hitze und Kälte, gegenüber Mikroorganismen und vor der Melaninpigmentierung durch UV-Strahlung.

Das Pigment Melanin wird von Melanozyten produziert und ist hauptverantwortlich für die Eigenfarbe der Haut. Die Melanozyten sind neuroektodermaler Herkunft. Sie liegen physiologischerweise im Stratum basale der Epidermis bzw. des Haarfollikels und synthetisieren Melanin auf verschiedene Stimuli (z.B. UV-Licht). Außerhalb der Haut findet man Melanozyten in der Aderhaut des Auges, in einigen mukösen Membranen und in den Hirnhäuten. Die Vorläufer der Melanozyten entstehen in der Neuralleiste, wandern als Melanoblasten in die embryonale Dermis und lagern sich schließlich in die Epidermis ein.

Die Melanozyten besitzen einen runden Zelleib und etwa 10-20 dendritische Ausläufer, durch die sie mit etwa 30 Keratinozyten in Kontakt stehen. Die Biosynthese des Melanins läuft in speziellen Zellorganellen, den Melanosomen ab. Hier wird Tyrosin zum Polymerisationsprodukt Melanin umgewandelt.

Melanin kommt in den zwei Hauptformen Eumelanin und Phäomelanin vor. Eumelanin ist ein braunes bis schwarzes, Phäomelanin ein gelb-rotes Pigment. Melanozyten können beide Formen bilden. Valverde et al. konnten 1995 einen Rezeptor **MC1R** (*melanocortin-1 receptor*) identifizieren, der maßgeblich an der Determinierung des Hauttyps beteiligt ist. Genetische Variationen des MC1R-Gens sind bei Menschen mit rotem Haar und/oder heller Haut häufig. Bindet der Ligand Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH) an seinen Rezeptor MC1, wird cAMP überexprimiert und induziert dadurch die Melanozytendifferenzierung sowie die Eumelaninbildung (Busca et al., 2000). Bei Menschen mit rotem Haar und/oder heller Haut besteht eine geringe Tyrosinase-Enzymaktivität oder es fehlt das MSH. Dadurch wird verstärkt Phäomelanin und weniger Eumelanin gebildet (Burchill et al., 1988; Burchill et al., 1986). Das Verhältnis der beiden Melanintypen zueinander legt unsere Haut- und Haarfarbe fest. In stark pigmentierter Haut überwiegt das Eumelanin gegenüber dem Phäomelanin (Jimbow et al., 1993). Palmer et al. konnten 2000

bei MC1R-Variationen durch die Verminderung der Eumelaninproduktion zeigen, dass ein erhöhtes Risiko besteht, am malignen Melanom zu erkranken (Palmer et al., 2000; Kennedy et al., 2001).

Die reifen Melaningranula wandern in die Fortsätze der Melanozyten. Sie gelangen von dort in die angrenzenden Keratinozyten. Bei UV-Exposition wird in ruhenden Melanozyten zunächst die Tyrosinase heraufreguliert und mit der Melaninsynthese begonnen. Die Anzahl der Melanosomen und deren Reifegrad steigt an. Sie wandern in die Dendriten, wo der Pigmenttransfer stattfindet. Gleichzeitig werden die Zellen größer und die Dendriten zahlreicher. Die Melanozyten werden durch den UV-Stimulus zur Proliferation angeregt.

Neben der Stimulierung durch UV-Licht bewirken auch Hormone (melanozytenstimulierendes Hormon - MSH, Androgene, Gestagene), Neuropeptide, Entzündungsmediatoren und bFGF eine Steigerung der Proliferation von Melanozyten (Junqueira et al., 1996; Fritsch, 1998; Rassner, 2002).

Während das maligne Melanom eine Neoplasie von Melanozyten darstellt, können melanozytäre Nävi, bzw. Nävuszellnävi, als benigne Neoplasie der Melanozyten betrachtet werden (Elder et al., 1993). Nävuszellnävi zeigen sich klinisch als runde, kleine, gut abgegrenzte, flache Läsionen von rötlich-brauner bis schwarzer Farbe. Sie bestehen aus zu Nestern zusammengeballten Nävuszellen. Diese Pigmentzellen unterscheiden sich von normalen Melanozyten durch folgende Merkmale. Nävuszellen liegen im Gegensatz zu Melanozyten in der Junktionszone und in der Dermis. Sie haben die Fähigkeit weitgehend verloren, Melanin zu produzieren. Histologisch kann man die Nävuszellnävi - je nach Lage der Nävuszellnester - in Junktionsnävi (in der unteren Epidermis), Compoundnävi (in der tiefen Epidermis und intradermal) und dermale Nävi unterscheiden (Fritsch, 1998). Es wird angenommen, dass Nävuszellen das Produkt defekter Melanoblasten sind, die gemeinsam mit den normalen Melanoblasten die Haut besiedeln. Die Proliferation in utero führt zur Bildung von kongenitalen Nävuszellnävi. Den weitaus größeren Anteil stellen die erworbenen Nävi dar, die im Laufe der Jahre auftreten und sich langsam durch peripheres Wachstum vergrößern. Eine Sonderform unter den

Nävuszellnävi nehmen atypische (dysplastische) Nävi ein. Sie sind meist größer als 5 mm mit unregelmäßiger Begrenzung und Pigmentierung. Sie manifestieren sich meist um das 20. Lebensjahr und sind spontan rückbildungsfähig. Alle Nävuszellnävi müssen als potentielle Vorläuferläsionen des Melanoms betrachtet werden, wobei kongenitale und atypische Nävi ein höheres Entartungsrisiko besitzen. Der Übergang zum Melanom ist jedoch, gemessen an der Häufigkeit der Nävuszellnävi, sehr selten.

1.2 Entwicklung und Progression des malignen Melanoms

In einem gesunden Organismus stehen spezialisierte Zellen in einem Gleichgewicht aus Proliferation und Zelltod. Dabei liefern die sogenannten Stammzellen Nachkommen, die frühere Generationen ersetzen. Wird dieses Gleichgewicht zerstört, kommt es zur unkontrollierten Proliferation von Zellen und damit zur Tumorentstehung. Während Zellen eines benignen Tumors ihre ursprünglichen Grenzen respektieren, wachsen Zellen eines malignen Tumors invasiv, d.h. in benachbarte Gewebe und Strukturen ein. Durch die Fähigkeit maligner Tumore Metastasen über Blut- und Lymphbahnen abzusiedeln, werden auch entfernte Organe befallen.

Die Inzidenz und die Mortalität des malignen Melanoms haben in den letzten drei Jahrzehnten stark zugenommen. Während die Inzidenz in den siebziger Jahren noch etwa 3 pro 100.000 Einwohner betrug, treten heute allein in Deutschland pro Jahr und 100.000 Einwohner 10 bis 12 neue Melanome auf (Garbe et al., 1991). Unter allen malignen Neubildungen weist das maligne Melanom neben dem Lungenkrebs bei Frauen den stärksten Anstieg der Inzidenz auf (Rigel, 1997; Herlyn, 1993). Seit den 50er Jahren steigt die Mortalität am malignen Melanom in Deutschland um 3% jährlich an (Garbe et al., 1986). Dies alles verdeutlicht die Sonderstellung des malignen Melanoms, wobei sich die Situation in Zukunft noch verschärfen wird, da zunehmend jüngere Menschen betroffen sind (Karlsson et al., 1998). Somit zählt das maligne Melanom inzwischen zu den zwölf häufigsten Krebserkrankungen der

EU (Esteve, 1993; Jemal et al., 2001; Marrett et al., 2001; Mansson-Brahme et al., 2002).

Clark und Elder lieferten ein Modell für die stufenweise Progression des malignen Melanoms (Abb. 1). Dabei wird die Entstehung eines metastasierenden Melanoms als einen Prozess beschrieben, der wahrscheinlich über fünf Stadien der Tumorprogression verläuft, die histologisch voneinander unterscheidbar sind (Clark, Jr. et al., 1991a; Clark, Jr. et al., 1991b; Elder et al., 1993).

Aus reifen gutartigen Melanozyten bilden sich gewöhnliche Nävi, die sich wiederum weiter zu atypischen Nävi entwickeln können. Dabei werden melanozytäre Nävi als gutartige Neoplasien von Melanozyten bewertet. Danach verläuft die Progression über Melanome in situ (Melanozyten ohne Invasionspotential, aber mit deutlichen Dysplasiezeichen) und RGP-Melanomen (Radial Growth Phase), die noch keine Möglichkeit zur Metastasierung besitzen. Der kritische Schritt bei der Melanomprogression ist der Übergang vom RGP-Melanom zum VGP (*vertical growth phase*)-Melanom, da hier die Fähigkeit zur Metastasierung erworben wird. RGP-Melanome zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht in die Dermis einwandern (Herlyn et al., 1987a). Am Ende des Progressionsprozesses stehen VGP-Melanome (Vertical Growth Phase), die aggregieren können, ein fokales Wachstum aufweisen und fähig sind, in die Dermis einzuwandern und zu metastasieren. An letzter Stelle des Progressionsprozesses steht schließlich das metastasierende Melanom.

Die Tumorprogression muss jedoch nicht linear verlaufen. Es können auch Stadien übersprungen werden. So kann ein Melanom auch ohne seine direkte Vorläuferläsion beispielsweise direkt aus Melanozyten oder einem Nävus entstehen (Clark, Jr. et al., 1984; Lopansri und Mihm, Jr., 1979). Umgekehrt ist auch ein Stillstand der Progression möglich, so dass nicht jedes Melanom notwendigerweise die komplette Entwicklung bis hin zur Metastasierung durchlaufen muss.

- 2) Beim nodulären malignen Melanom (NMM) handelt es sich um die aggressivste Variante des Melanoms, da ein fast ausschließlich vertikales und schnelles Wachstum einsetzt.
- 3) Das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) entsteht auf dem Boden eines in situ Melanoms, der Lentigo maligna, deren Wachstumsrichtung zunächst ausschließlich radial erfolgt. Nach Jahren bis Jahrzehnten geht die Lentigo maligna in ein Lentigo-maligna-Melanom mit vertikalem Wachstum über. Die späte Metastasierung beschränkt sich meist nur auf die regionären Lymphknoten, wodurch sich eine gute Prognose ergibt.
- 4) Eine relativ schlechte Prognose hat dagegen das Akral-lentiginöse Melanom (ALM), da die radiale Wachstumsphase schneller einsetzt und eine schnellere Metastasierung erfolgt. Seiner Lokalisation an Handflächen und Fußsohlen gibt dieser Form den Namen.

Neben den vier histologischen Hauptformen kommen noch seltenerere Formen wie das Melanom der Aderhaut oder der Schleimhäute vor (Fritsch, 1998).

Für die Einteilung der Stadien und der Prognose ist die Eindringtiefe nach Clark (Abb. 2) und die Tumordicke nach Breslow (Abb. 3) entscheidend. Mit Hilfe des Invasionslevels nach Clark wird die Invasionstiefe des Melanoms relativ in Bezug auf die Hautschichten angegeben. Mit der Tumordicke nach Breslow wird das Tiefenwachstum absolut in Millimetern bestimmt.

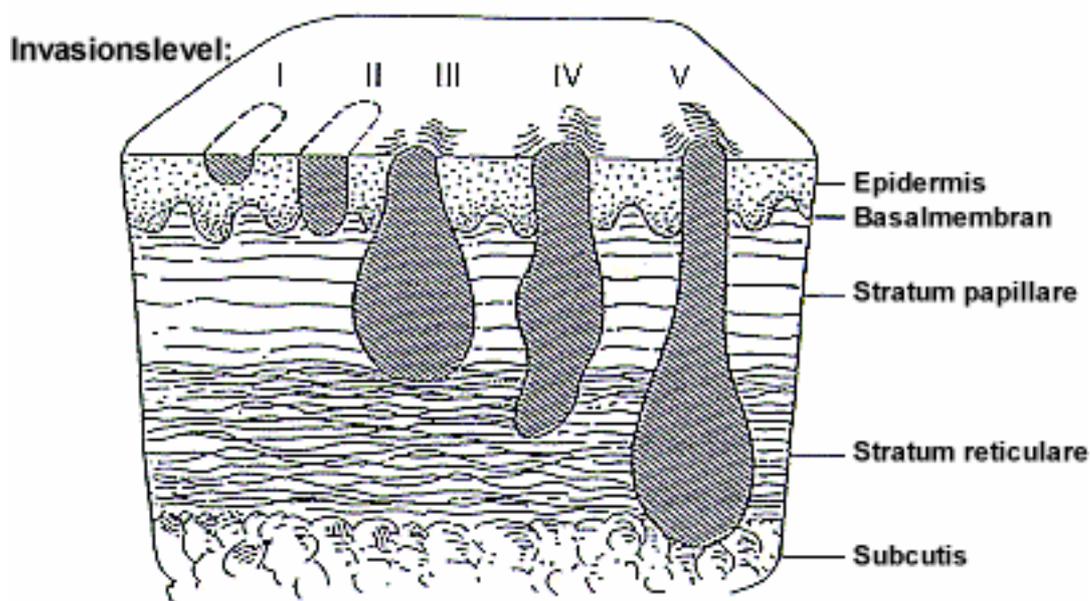


Abb. 2: Schichten der Haut und Invasionslevel nach Clark

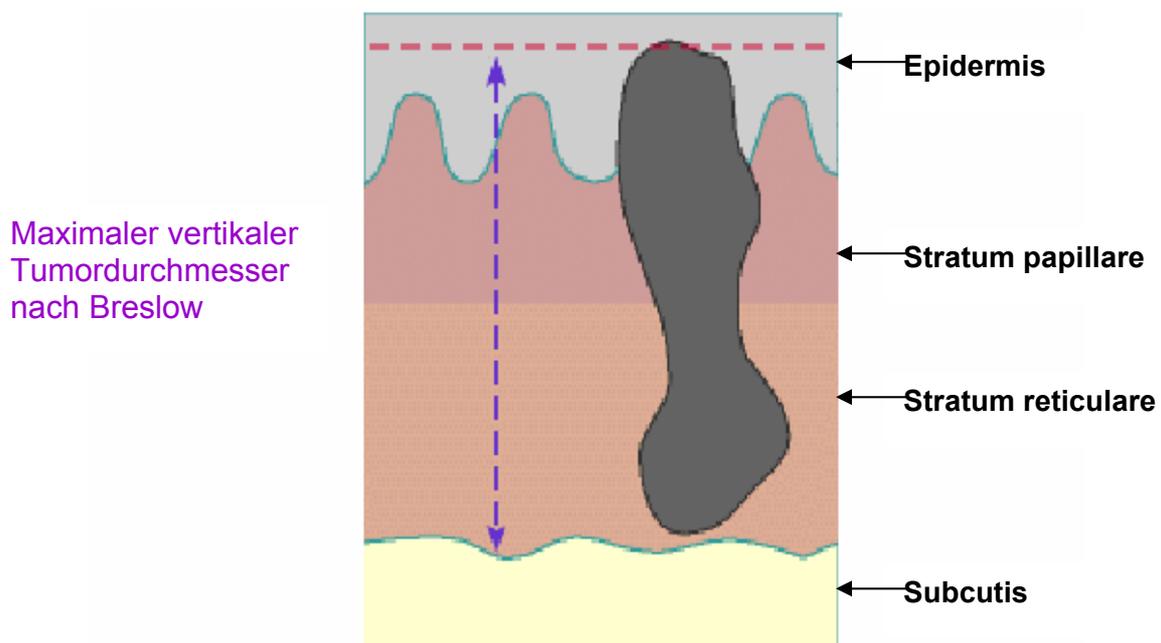


Abb. 3: Tumordicke nach Breslow

Die Ausbreitungsdiagnostik orientiert sich an der TNM-Klassifikation (nach der AJCC 2001). Dabei werden die Tumordicke, der Befall von Lymphknoten (N) und Fernmetastasen (M) erfasst (Tab. 1):

Primärer Tumor (T)		Lymphknoten (N)	
• T0	Kein Primärtumor	• N1	1 LKS
• pTis	Melanoma in situ (Clark Level I)	a	Mikrometastase
		b	Makrometastase
• T1	Melanom <1,0 mm	• N2	2 - 3 LKS
a	ohne Ulzeration, Clark II/III	a	Mikrometastase
b	mit Ulzeration oder Clark IV/V	b	Makrometastase
		c	In-transit/Satelliten ohne metastatische LKS
• T2	Melanom 1,01 – 2,0 mm	• N3	4 oder mehr LKS oder verbackene Knoten oder In-transit-MTS oder Satelliten-MTS mit LKS-MTS
a	ohne Ulzeration		
b	mit Ulzeration		
• T3	Melanom 2,01 – 4,0 mm		
a	ohne Ulzeration		
b	mit Ulzeration		
• T2	Melanom < 4 mm		
a	ohne Ulzeration		
b	mit Ulzeration		
• pTX	Primärtumor nicht beurteilbar		
Fernmetastasen (M)			
• M1a	Fern-MTS (LKS oder subkutan), LDH normal		
• M1b	Lungen-MTS, LDH normal		
• M1c	Alle anderen viszeralen MTS bei normalem LDH oder jede Fernmetastase mit erhöhtem LDH		

Tab. 1: Staging-Einteilung für kutane Melanome nach AJCC 2001

Neben der immer noch gültigen UICC-Klassifikation finden sich noch weitere gebräuchliche Klassifikationen, wie von der American Joint Committee on Cancer (AJCC, 1998) oder der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG, 1994). Wobei die neue Klassifikation des American Joint Committee on Cancer von 2001 prognostisch relevante Faktoren berücksichtigt, wie zum Beispiel die Ulzeration des Tumors oder die Wertung von Mikrometastasen, um auf diese Weise den Patienten bestmöglich in seinem Risikoprofil zu erfassen (Balch et al., 2001a; Merkel et al., 2002).

UICC 1997				AJCC 1998				DDG 1994			
Stadium I	pT1 (<0,75 mm, Level II)	N0	M0	Stadium I	pT1 (<0,75 mm, Level II)	N0	M0	Stadium IA	pT1 (<0,75 mm)	N0	M0
	pT2 (>0,75- 1,5 mm, Level III)	N0	M0		pT2 (>0,75- 1,5 mm, Level III)	N0	M0	Stadium IB	pT2 (>0,76-1,5 mm)	N0	M0
Stadium II	pT3a (>1,5-3 mm, Level VI)	N0	M0	Stadium II	pT3a (>1,5-3 mm, Level VI)	N0	M0	Stadium IIA	pT3 (>1,51-4 mm)	N0	M0
	pT3a (>3-4 mm, Level VI)	N0	M0		pT3a (>3-4 mm, Level VI)	N0	M0				
Stadium III	pT4a (>4 mm, Level V)	N0	M0		pT4a (>4 mm, Level V)	N0	M0	Stadium IIB	pT4 (>4 mm)	N0	M0
	pT4b Jedes pT	N0 N2b	M0 M0	Stadium III	pT4b Jedes pT	N0 N2b	M0 M0	Stadium IIIA	pTa pTb	N0 N0	M0 M0
	Jedes pT	N1/N2	M0		Jedes pT	N1/N2a	M0	Stadium IIIB	Jedes pT	N1/N2	M0
Stadium IV	Jedes pT	Jedes N	M1 a/b	Stadium IV	Jedes pT	Jedes N	M1 a/b	Stadium IV	Jedes pT	Jedes N	M1 a/b

Tab. 2: Klinische Stadieneinteilung des Melanoms

Der Prozess der Metastasierung verläuft in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Verschiedene Risikofaktoren wie das Invasionslevel, die Tumordicke und die je nach Geschlecht prozentual unterschiedlich verteilte Tumorlokalisation bestimmen den Ablauf der Metastasierung entscheidend mit. Dabei scheint die Lokalisation des Primärtumors (ungünstige Prognose insbesondere für oberen Stamm, Oberarme, Hals) der wichtigste Faktor zu sein (Meier et al., 2002). Die Nährstoffversorgung durch Diffusion ist nur bis zu einer bestimmten Dicke des Primärtumors, meist etwa zwei Millimeter, gewährleistet. Wächst der Tumor darüber hinaus, müssen zur Tumorversorgung induziert durch diverse Angiogenesefaktoren neue Blutgefäße gebildet werden. Weiteres Wachstum ermöglicht die Invasion der Melanomzellen in die Blut- bzw. Lymphbahnen. Die Verteilung der malignen Zellen in das umliegende Gewebe oder ferner gelegene Organe wird durch die Interaktion der Tumorzellen mit den Blutzellen ermöglicht. Das maligne Melanom metastasiert hauptsächlich in Lunge, Gehirn und Leber (Meier et al., 2002). Dies geschieht durch Extravasation der Tumorzellen aus dem Kapillarbett des Zielorgans, ihre Migration ins Parenchymgewebe und anschließende dortige Proliferation. Entkommen die Tumorzellen dem Angriff des Immunsystems, wird wiederum die Angiogenese eingeleitet. Der Sekundärtumor kann an seinem neuen Absiedlungsort weiter wachsen (Fidler et al., 1998).

Die Entwicklung von Metastasen senkt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten in drastischer Weise. Nach Ausbildung von Lymphknotenmetastasen sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate auf 19%, bei Fernmetastasen liegt sie sogar nur noch bei 3% (Orfanos et al., 1994). Eine frühzeitige Exzision des Primärtumors steigert die Überlebensrate entscheidend, solange seine Tumordicke unter einem Millimeter vorliegt. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt bei diesen Patienten immerhin 90% (Orfanos et al., 1994). Das Metastasierungsmuster ist jedoch nicht einheitlich. Bei 50 % der Patienten kommt es zunächst zur Metastasierung in die regionären Lymphknoten, 20% bilden primär Satellitenmetastasen aus. 30 % der Patienten bilden ohne vorangehende lymphatische Metastasierung direkt hämatogene Fernmetastasen (Meier et al., 2002, Leiter et al., 2004a).

Abbildung 4 zeigt die einzelnen Stufen vom Primärmelanom bis zur Melanommetastase nach Fiedler et al., 1998.

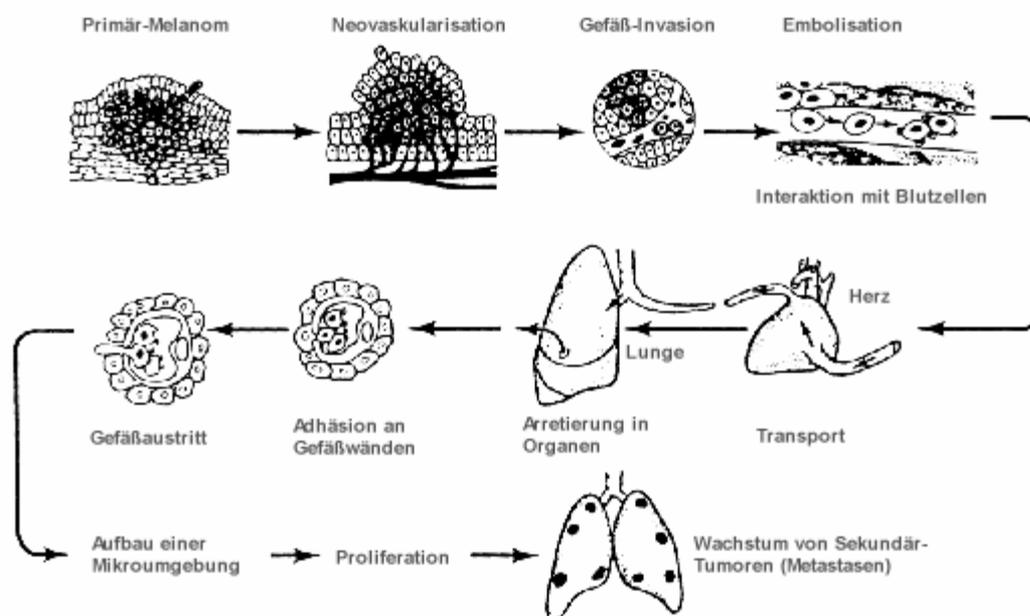


Abb. 4: Der Metastasierungsprozess des malignen Melanoms (nach Fidler, 1998)

Als Risikofaktoren für die Melanomentstehung gelten verschiedenen prädisponierende Faktoren. Das UV-Licht ist dabei der wichtigste Faktor. Schwach pigmentierte Personen und Menschen mit hoher Sonnenlichtexposition (Crombie, 1979) weisen ebenso ein höheres Melanomrisiko auf, als Menschen mit vielen Nävi (Gallagher et al., 1990). Ebenso wichtig erscheinen Sonnenbrände in der Kindheit (Bauer und Garbe, 2003; Bauer und Garbe, 2004; Wiecker et al., 2003). Zahlreiche Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen Melanomentstehung und UV-Belastung. Durch UV-Licht, vor allem durch UV-B Strahlung mit einer Wellenlänge von 290 bis 320 nm, werden Veränderungen in der Haut verursacht, die eine Erhöhung der genetischen Instabilität (DNA-Schäden), Hemmung des endogenen Anti-Oxidationssystems (Fuchs und Packer, 1990), Veränderung der Expression von Proto-Onkogenen und

Tumorsuppressorgenen (Ronai et al., 1988), Modulation von Wachstumsfaktoren (Libow et al., 1988) und Suppression der zellvermittelten Immunantwort (Noonan et al., 1988) zur Folge haben.

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung eines malignen Melanoms sind neben physikalischen Merkmalen wie helle Haare, Augen und Haut die erbliche Prädisposition (Czajkowski et al., 2004) sowie die Anzahl von atypischen Nävi (Titus-Ernstoff et al., 2005).

Bei ca. 10% der Melanome besteht eine familiäre Häufung (Clark et al., 1978). Durch Kopplungsanalysen konnten Hinweise gefunden werden, dass in einigen Familien ein potentiell Melanomgen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p36), in andern Familie auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p21) liegen könnte (Bale et al., 1989; Cannon-Albright et al., 1992). Gene, die auf Chromosom 9p21 liegen, sollen weiterhin für die Prädisposition für das FAMMM-Syndrom (familial atypical multiple mole syndrome) verantwortlich sein (Slade et al., 1995). In den folgenden Jahren wurden einige Kandidatengene wie p15, p16 und p14ARF isoliert, die sich auf Chromosom 9p21 befinden und bei Melanomen und familiären Melanompatienten häufig nicht funktionell sind.

1.3 Molekulare Veränderungen im malignen Melanom

Es wird allgemein angenommen, dass ein einzelner Gendefekt nicht für eine maligne Transformation von Melanozyten ausreicht. Das maligne Melanom scheint eher ein genetisch heterogener Tumor zu sein, da es sowohl Hinweise für die Heterogenität in der malignen Transformation von Melanozyten gibt, als auch bei der folgenden Entdifferenzierung von Melanomzellen in den verschiedenen Metastasen des gleichen Patienten (Happle et al., 1982). Dies bedeutet, dass einerseits mehrere Gene an der Pathogenese beteiligt sind, und andererseits die einzelnen Gendefekte nicht zwingend für die Tumorentstehung notwendig sind. Als alleiniger Verursacher des malignen Melanoms konnte jedoch keines der über 100 identifizierten Gene gelten. Die meisten der untersuchten Gene sind zwar auf verschiedene Weise in die Entwicklung und Progression des Tumors involviert, aber kein einzelnes Gen ist für die Entstehung eines Tumors verantwortlich (Herlyn, 1993). Im Folgenden werden

nun die wichtigsten Gene genannt, die in der Entwicklung des malignen Melanoms eine wichtige Rolle spielen.

1.3.1 Moleküle im malignen Transformationsprozess

Signaltransduktionswege und deren Komponenten

Bei der Melanomentstehung sind vier Signaltransduktionswege von Bedeutung:

- **Src**-Kinase-Weg
- **PI-3**-Kinase- Weg
- **RAS-RAF-MEK-ERK**-Signalweg
- **Wnt- β -Catenin-Tcf** Signalweg

Verschiedene Studien zeigen, dass die Familie der **Src**-Tyrosin-Kinasen (*cytoplasmic tyrosin kinases*) eine entscheidende Rolle in Integrin-vermittelten Prozessen, wie z.B. bei der Zellmigration spielt (Huang et al., 2003). Darüber hinaus fördert Src die Zellproliferation und -adhäsion und hemmt die Zelldifferenzierung (Niu et al., 2002; Huang et al., 2003).

Der **PI-3**-Kinase-Signaltransduktionsweg (*phosphatidylinositol-3-kinase, lipid kinase*) reguliert in Zellen die Beweglichkeit (Motilität), die Proliferation, das Überleben sowie den intrazellulären Transport. Die PI-3-Kinase liegt in vielen transformierten Zellen konstitutiv aktiviert vor (Bedogni et al., 2004). Essentiell beim PI-3-Kinase-Signalweg ist die Aktivierung von Akt, einer Serin/Threonin-Proteinkinase (Diehl et al., 1998; Shiojima und Walsh, 2002; Vivanco und Sawyers, 2002). Aktiviertes Akt phosphoryliert nachfolgend Bad und unterdrückt so dessen pro-apoptotische Funktion. Des Weiteren wird das anti-apoptotisch wirkende Bcl-X_L freigesetzt. Bcl-X_L bildet nun Heterodimere mit dem pro-apoptotisch wirkenden Bax und setzt die apoptotische Funktion von Bax auf diese Weise außer Kraft. So resultiert die Aktivierung der PI-3-Kinase-Kaskade letztlich im Überleben von Zellen (Blume-Jensen et al., 1998). Es scheint allerdings, dass dieser Signaltransduktionsweg hauptsächlich in der Keimzellentwicklung eine Rolle spielt und die Melanozytenentwicklung von diesem Signalweg unabhängig ist (Blume-Jensen et al., 2000).

Der **RAS-RAF-MEK-ERK**-Signaltransduktionsweg spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Überlebens und des Wachstums von Zellen, darüber hinaus

im Zellzyklus und der Zelldifferenzierung (Lewis et al., 1998; Pearson et al., 2001). Ras, ein kleines G-Protein, welches in der Zellmembran verankert ist und an Signalübertragungen von Tyrosinkinase mitwirkt (Polsky und Cordon-Cardo, 2003), ist in aktivierter Form wiederum in der Lage, den PI-3-Kinase-Signalweg (s. oben) oder die Proteinkinase RAF zu aktivieren. Verschiedene Versuche mit transgenen Mäusen konnten nachweisen, dass RAS für die Melanomentstehung bedeutungsvoll ist (Broome et al., 1999; Chin et al., 1997; Chin et al., 1999). In Melanomzellen konnte die Expression der Onkogene **N** (*neuroblastoma*)-ras, **K** (*Kirsten*)-ras und **H** (*Harvey*)-ras nachgewiesen werden (Bos, 1989).

Das durch RAS aktivierte RAF stimuliert die **MEK**-Kinasen MEK 1 und MEK 2 (*mitogen activated ERK-activating kinases*), welche nachfolgend **ERK** 1 und ERK 2 (*extracellular signal-regulated kinases*) aktivieren und damit eine Reihe von Signalen auslösen können, wie etwa die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Smalley, 2003).

Die RAF-Isoform B-RAF liegt in 60 bis 70 % der malignen Melanome sowie in 80 % der Nävi mutiert vor (Davies et al., 2002; Wellbrock et al., 2004). Meist handelt es sich dabei um eine einzelne Punktmutation, die zu einem Austausch von Valin gegen Glutaminsäure an Position 599 (V599E) innerhalb der Kinasedomäne von Exon 15 führt (Pollock et al., 2003). B-RAF Mutationen konnten in nur 10% radial wachsender Melanome gefunden werden, wohingegen 70% vertikal und metastatischer Melanomzellen für diese B-RAF Mutationen positiv getestet wurden (Dong et al., 2003). Inzwischen liegen jedoch auch Studien vor, deren Ergebnisse einen weitaus geringeren Zusammenhang zwischen der B-RAF-Mutation und dem malignen Melanom vermuten lassen (Yazdi et al., 2003).

Festzuhalten bleibt, dass die B-RAF-Aktivierung zwar nicht die alleinige Komponente bei der Melanozytentransformation sein kann, da der Mutationsanteil in Nävi hoch ist. Jedoch könnte sie ein Initiationsschritt in der Transformationskaskade sein.

Der **Wnt-β-Catenin-Tcf** Signalweg scheint ein sehr wichtiger Faktor bei der Entwicklung von vielen weiteren Tumoren, einschließlich Kolorektal-, Ovarial-

und Prostata-Karzinom zu sein. Bei Hauttumoren von Mäusen konnte β -Catenin und eine Vermehrung von β -Catenin-Tcf abhängigen Genen (c-myc und c-jun) festgestellt werden (Bhatia und Spiegelman, 2005).

Wachstumsfaktoren

Schon sehr früh wurden Wachstumsfaktoren, ihre Rezeptoren und die nachgeschalteten Signalketten für einen wichtigen Faktor in der Tumortransformation gehalten. Die unkontrollierte Überexpression eines Wachstumsfaktors, durch die autokrine Stimulation oder den Verlust von Abschaltmechanismen in der Signalkette, könnte ein Grund für unkontrolliertes Wachstum von Zellen sein. Verschiedene Wachstumsfaktoren stimulieren die Neubildung von Tumorstroma und Blutgefäßen. Sie sind damit maßgeblich an der Metastasierung beteiligt.

Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren wurden intensiv in der melanozytären Entwicklung untersucht (Bennett und Chang, 1990; Halaban, 1993 a und b; Rodeck, 1993; Shih und Herlyn, 1994). Normale Zellen sind für die Produktion von Wachstumsfaktoren auf exogene Stimuli angewiesen. Melanomzellen hingegen können diese unabhängig in in-vitro Kulturen herstellen (Rodeck und Herlyn, 1991).

Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören, der schon sehr früh gefundene Wachstumsfaktor **TGF- α** (*transforming growth faktor α*). Dieser Faktor wurde in den meisten Melanomzelllinien gefunden, konnte aber nur in normalen Melanozyten nach UV-Stimulation nachgewiesen werden (Marquardt und Todaro, 1982; Ellen et al., 1988). TGF- α scheint weiterhin eine Homologie zu EGF (epidermal growth factor) zu besitzen und kann an seinen EGF-Rezeptor binden (Shih und Herlyn, 1994). Umstritten ist noch die Funktion von TGF- β_2 . Einerseits zeigt sich eine zunehmende Expression von TGF- β_2 in Nävi, RGP-Melanomen, VGP-Melanomen und Metastasen (Schmid et al., 1995). Andererseits ist die Expression in metastasierenden und primären Melanomen uneinheitlich (Van Belle et al., 1996; Reed et al., 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von TGF- α mit der des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor) korreliert. Die Expression dieses Faktors in

Melanomen korreliert in situ wiederum mit der Tumorprogression (Real et al., 1986; Elder et al., 1989; Ahern et al., 1993). Wahrscheinlich korreliert die Expression von TGF- β mit der Invasion und Metastasierung des Melanoms (Berking et al., 2001b).

Einen weiteren Wachstumsfaktor stellt der **bFGF** (*basic fibroblast growth factor*) dar, der die Angiogenese induziert und durch proteolytische Enzyme die Ausbreitung in das umliegende Gewebe fördern kann (Montesano et al., 1986; Streit und Detmar, 2003). Die bFGF-Expression korreliert mit der Melanomprogression. Der Wachstumsfaktor wird von Fibroblasten sowie von Keratinozyten, darüber hinaus von nahezu allen Melanomzellen, allerdings nicht von Melanozyten, exprimiert (Reed et al., 1994; Wang und Becker, 1997; Meier et al., 2000). Dieser Faktor kann zudem Melanomzellen in vitro autokrin stimulieren (Krasagakis et al., 1993; Halaban et al., 1993b). Dadurch sind Melanomzellen in der Lage, durch die eigene Produktion von bFGF auch ohne exogen zugeführte Wachstumsfaktoren zu proliferieren.

Untersuchungen über die Wirkung von UVB-Strahlen, welche in der Haut DNA-Schäden verursachen, und die Überexpression von bFGF in Melanozyten legten dar, dass bFGF ohne UV-Strahlung zur Hyperpigmentierung der Haut sowie zur Induktion der Melanozytenproliferation führt, während es bei zusätzlicher UVB-Bestrahlung zu einer Transformation der Melanozyten kam (Berking et al., 2001a). Sind neben bFGF noch die Wachstumsfaktoren SCF (*stem cell factor*) sowie ET-3 (*endothelin-3*) exprimiert, kann sich ein Melanozyt unter UVB-Belastung innerhalb von nur vier Wochen zu einer Melanomzelle transformieren (Berking et al., 2004).

Einen weiteren wichtigen Peptidwachstumsfaktor stellt **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) dar. Dieser ist ein wichtiger Mediator für tumor-assoziierte Angiogenese und Metastasierung (Detmar, 2000). In Versuchen mit AP-2 α -transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Tumorprogression durch Verminderung des VEGF in Prostata-Karzinomzellen reduziert wurde (Ruiz et al., 2004). Weiter wird vermutet, dass es Melanomzellen gelingt, durch eine Überproduktion von VEGF über den MAPK und PI3K-Signaltransduktionsweg zu wachsen und zu überleben (Graells et al., 2004).

Eine weitere wichtige Rolle scheint c-Kit zu spielen, eine Transmembrantypotyrosinkinase, die den Rezeptor von SCF (stem cell factor) kodiert. Die Expression von c-Kit wird in Melanomen im Vergleich zu normalen Melanozyten herunter reguliert (Natali et al., 1992). Durch diese Herunterregulierung des Rezeptors in Melanomen kann SCF nicht mehr binden und die Zelle kann so der Apoptose entkommen (Huang et al., 1998). Der Grund für die geringe Expression von c-Kit in Melanomen ist der Expressionsverlust des Transkriptionsfaktors AP-2 α (siehe Kapitel 1.4.).

Ein weiterer Wachstumsfaktor auf Melanomzellen ist Thrombin. Thrombin aktiviert den Thrombinrezeptor **PAR-1** (*protease-activated receptor-1*) (Maragoudakis et al., 2000). Eine vermehrte Expression von PAR-1 konnte in mehreren menschlichen Karzinomzellen nachgewiesen werden, z.B. im Kolon-Karzinom (Wojtukiewicz et al., 1995), Mamma-Karzinom (Henrikson et al., 1999) und Pankreas-Karzinom (Rudroff et al., 1998). Tellez et al. konnten 2003 zeigen, dass eine verminderte AP-2-Expression in einer Überexpression von PAR-1 resultiert und mit der Tumorprogression im malignen Melanom korreliert.

Zelladhäsionsmoleküle und Proteasen

Zelladhäsionsmoleküle sind Rezeptoren der Zelloberfläche, die die Bindung von Zellen an andere Zellen oder die extrazelluläre Matrix vermitteln. Im malignen Melanom wurden zahlreiche Moleküle identifiziert, die an der Zellmatrix oder Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind.

Die größte Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle bilden die **Integrine**. Sie sind Heterodimere und bestehen je aus einer α - und einer β -Kette. Sie bilden so transmembrane Glycoproteinrezeptoren (Hemler et al., 1990; Springer, 1990a; Springer, 1990b; Larson und Springer, 1990; Hynes, 1992). Die verschiedenen Integrin-Untereinheiten binden spezifisch an Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM) (Arnaout et al., 2002). Ihre Aufgabe besteht darin, Adhäsionen von Zellen mit der ECM oder anderen Zellen zu vermitteln. Die Expression der Subklasse der β_3 -Integrine korreliert *in vivo* mit der Progression des Melanoms, der Tumordicke, dem Invasionspotential und der Metastasierung (Albelda et al., 1990; Herlyn et al., 1990a und b, Felding-Habermann et al., 2002; Li et al.,

2002; Meier et al., 2003). Es konnte auch mehrfach bestätigt werden, dass sich das Expressionsmuster der verschiedenen Integrine mit der Tumorprogression verändert (Schadendorf et al., 1993; Natali et al., 1993; Puerschel et al., 1996). Insbesondere der kritische Punkt der Transformation des RGP-Melanoms zum VGP-Melanom ist durch eine ansteigende β_3 -Integrin-Expression gekennzeichnet. Sturm et al. vermuteten 2002, dass diese Transformation durch β_3 -Integrin-induzierten Osteonectin/SPARC-Aktivierung verursacht wird. Des Weiteren könnte das Invasionspotential über die Aktivierung von MT1-MMP (*membrane type 1-MMP*) und MMP2 (*matrix metalloproteinase 2*) durch β_3 -Integrin erhöht werden (Hofmann et al., 2000).

Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass Integrin α durch den MEK1 vermittelten Signaltransduktionsweg p53 inaktivieren kann (Bao und Strombald, 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich das Expressionsmuster der Integrine mit der Tumorprogression verändert und so zum invasiven Potential des Tumors beitragen könnte.

Zu der Familie der Transmembranglykoproteine gehören **Cadherine**, die an der Kalzium-abhängigen Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind. Sie steuern die Zellerkennung, Motilität, Gewebsintegrität und Homöostase der gesunden Haut. Am besten untersucht sind bislang E-Cadherin und N-Cadherin.

E-Cadherin wird in der gesunden Haut auf der Oberfläche aller epidermalen Zellen exprimiert, einschließlich Melanozyten, Langerhanszellen sowie Keratinozyten, den wichtigsten Interaktionspartnern der Melanozyten (Hsu et al., 2000).

Durch E-Cadherin wird es den Keratinozyten ermöglicht, die Melanozytenproliferation und die Expression von Zelloberflächenmolekülen auf Melanozyten zu kontrollieren, sowie das Gleichgewicht zwischen Keratinozyten und Melanozyten zu regulieren (Hsu et al., 2000; Valyi-Nagy et al., 1993; Shih et al., 1994).

N-Cadherin wird von den mesenchymalen Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert. Während der Melanomprogression kommt es einerseits zu einem

allmählichen Verlust der E-Cadherin-Expression, andererseits zu einer allmählichen Zunahme der N-Cadherin-Expression (Li und Herlyn, 2000; McGary et al., 2002). Durch eine vermehrte Expression von N-Cadherin wird es den Melanomzellen erleichtert, benachbarte Melanomzellen, Fibroblasten und Gefäßendothelzellen zu verketten. Damit wird die Bildung von Tumorzellnestern, die Invasion in die Dermis sowie die Intra- und Extravasation gefördert. N-Cadherin verleiht den Melanomzellen dadurch neue Adhäsionseigenschaften (Li et al., 2001).

Dasselbe wird durch die Herunterregulierung von E-Cadherin erreicht. Dieser Verlust der Kommunikation zwischen Keratinozyten und Melanozyten ist für die Melanomentstehung von zentraler Bedeutung (Hsu et al., 2000; Tamura, 1997). Ursache des Expressionsverlustes von E-Cadherin bei der malignen Transformation von Melanozyten sind vermutlich zwei Mechanismen: Zum einen die Methylierung des Promotors von E-Cadherin. Zum anderen die Expression des Transkriptionsfaktors SNAIL (Tsutsumida et al., 2004). Eine Überexpression von SNAIL unterdrückt die E-Cadherin-Expression. So kann das Metastasierungspotential von Melanomzellen erhöht werden (Poser et al., 2001). Desweiteren ist bekannt, dass der Wachstumsfaktor TGF- β (*tumor growth factor*) eine autokrine Herunterregulierung von E-Cadherin vermitteln kann (Janji et al., 1999). Insgesamt wurde bestätigt, dass eine veränderte Expression der Cadherine eine gestörte Zellinteraktion verursacht und somit geeignete Bedingungen für Tumorwachstum und -invasion geschaffen werden.

Bei der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion spielt β -**Catenin** eine wichtige Rolle. Es verknüpft die Signalübertragung zwischen E-Cadherin und dem Aktinzytoskelett sowie den Tyrosinkinase der Wachstumsfaktoren einerseits und der Wnt-Signalkaskade andererseits (Worm et al., 2004; Weeraratna et al., 2002; Kemler, 1993; Gumbiner und Yamada, 1995; Mareel et al., 1997; Yap et al., 1997; Brown und Moon, 1998).

Die Interaktionen von β -Catenin, den Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef, sowie dem APC-Gen können die Melanomentstehung und -Progression fördern

(Worm et al., 2004) β -Catenin aktiviert durch Bindung die Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef (Korinek et al., 1997).

Die Bindung des APC-Proteins an β -Catenin kann zu einer intrazellulären Abnahme der β -Catenin-Konzentration führen. Dadurch werden die Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef wieder freigesetzt und liegen somit inaktiv vor (Korinek et al., 1997). Desweiteren können Mutationen im β -Catenin-Gen die Funktion so stark verändern, dass es nicht mehr zu inhibieren ist (Morin et al., 1997).

Zhang und Hersey zeigten 1999, dass eine α -Catenin-Expression mit einem höheren Grad an Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Melanomzellen verbunden ist.

Weitere Adhäsionsmoleküle, die bei der Melanomentstehung eine wichtige Rolle spielen könnten, sind die **CAMs** (*Cell adhesion molecules*). Dazu gehören **MeICAM**, **L1-CAM** und **ALCAM**.

Ähnlich wie ICAM-1 ist auch MUC18 (auch bekannt unter **MeICAM** – melanoma cell adhesion molecule, CD146). Es ist ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül der Immunglobulin-Familie (Johnson, 1992; Shih et al., 1997), das schon sehr früh als Marker für die Tumorprogression beim Melanom identifiziert werden konnte (Lehmann et al., 1989). Physiologisch findet sich MeICAM in Endothelzellen, in glatten Muskelzellen (Sers et al., 1993) und in Immunzellen, beispielsweise in aktivierten T-Lymphozyten (Li und Herlyn, 2000; Pickl et al., 1997). Es wird mit zunehmender Progression des Tumors stärker exprimiert (Johnson et al., 1989, Johnson, 1992; Collins und White, 1995; Johnson et al., 1993). Die Expression von MeICAM korreliert in Melanomzellen mit dem Wachstums- und dem Metastasierungspotential (Luca et al., 1993; Xie et al., 1997). Als Ursache der Hochregulation von MeICAM gilt der Expressionsverlust des Transkriptionsfaktors AP-2 α (Jean et al., 1998a). Die MeICAM-Expression wird auch durch aktiviertes AKT verstärkt und weist auf eine Regulation von MeICAM durch den AKT-Signalweg hin (Li et al., 2002; Woods et al., 2001). In Versuchen an Nacktmäusen ist es gelungen, MeICAM durch spezifische Antikörper zu blockieren und so das Tumorwachstum und die Metastasierung

zu inhibieren (Mills et al., 2002). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass MelCAM durch seine Zellinteraktionen melanozytären Zellen die Fähigkeit zur Tumorinitiation verleiht.

Das Adhäsionsmolekül **L1-CAM** ist ein Transmembranglykoprotein und wird in einigen Tumoren überexprimiert, wie etwa in Lungenkarzinomen, Rhabdomyosarkomen, Melanomen und Neuroblastomen (Katayama et al., 1997; Pancook et al., 1997; Nolte et al., 1999; Kobayashi et al., 1992; Fogel et al., 2003). Beim malignen Melanom wird eine erhöhte L1-Expression in Primärmelanomen sowie in Hautmetastasen beobachtet. In Lymphknotenmetastasen hingegen ist die L1-Expression herunterreguliert (Fogel et al., 2003). Die Interaktion von L1-CAM mit seinem Liganden moduliert möglicherweise die transendotheliale Zellmigration beim malignen Melanom (Thies et al., 2002). Über die genaue Funktion von L1-CAM im Zusammenhang mit der Invasion, der Metastasierung sowie der melanozytären Transformation liegen jedoch noch keine Kenntnisse vor.

Activated leukocyte cell adhesion molecule (**ALCAM**), ein weiteres Mitglied der Immunglobulin-Familie, vermittelt homotypische und heterotypische Zell-Zell-Interaktionen (van Kempen et al., 2004; Swart, 2002; Degen et al., 1998; Bowen et al., 1995). ALCAM spielt eine Rolle in der Progression sowohl des Melanoms, als auch Fibrosarkom und Prostata-Karzinom (Degen et al., 1998; van Kempen et al., 2000; Choi et al., 2000; Kristiansen et al., 2003). Zusätzlich korreliert die ALCAM-Expression mit dem invasiven Wachstum des Melanoms und wird als prognostischer Marker diskutiert (Degen et al., 1998; van Kempen et al., 2000).

Zu den verschiedenen Enzymen, die an der Passage von Tumorzellen durch die extrazelluläre Matrix beteiligt sind, gehört unter anderem Plasminogen-Aktivator und Plasminogen (Müller et al., 1995). Dazu gehören auch die Matrix-Metalloproteinasen MMP, die durch ihre Fähigkeit extrazelluläre Matrix zu degradieren, sowie Angiogenese und damit Metastasierung auslösen, eine wichtige Rolle bei der Invasion spielen. MMPs werden durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen, sowie durch Hormone und Onkogene aktiviert. Konstitutiv werden sie üblicherweise nicht in

der Haut exprimiert (Birkedal-Hansen et al., 1993; Westermarck und Kahari, 1999). MMPs stehen mit TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) im Gleichgewicht und werden von ihnen inhibiert (Kahari und Saarialho-Kere, 1997; Raza und Cornelius, 2000). Wird das Gleichgewicht zu Gunsten der MMPs verschoben, kommt es zur Proteolyse der Basalmembran (Henriet et al., 1999). Durch diese proteolytischen Fähigkeiten wird die Migration von Tumor- und Endothelzellen in angrenzendes Gewebe erleichtert. Weiter werden Wachstumsfaktoren, wie VEGF und bFGF freigesetzt, die ihrerseits eine gesteigerte Angiogenese induzieren (Karelina et al., 2000; Murphy et al., 1999; Blood und Zetter, 1990). Durch die Inaktivierung der CREB/ATF-1 Funktion in metastatischen Melanomzellen, das in einer Herunterregulierung von MMP-2 und MCAM/MUC18 resultiert, wird das metastatische Potential von Melanomzellen in vivo gesenkt (Leslie und Bar-Eli, 2005).

In immunhistochemischen Untersuchungen beim Mamma-Karzinom konnte eine Korrelation mit der Expression von MMP-2 und MMP-9 mit der Expression von AP-2 und HER2 nachgewiesen werden (Pellikainen et al., 2004).

Tumorspezifische Antigene

Neben den schon erwähnten Antigenen MelCAM und L1-CAM, die beide als Tumormarker eingesetzt werden, gibt es weitere wichtige Melanom-assoziierte Antigene. Dazu gehören Antigene der Genfamilien MAGE, BAGE und GAGE. Sie sind häufig in einer Vielzahl von Tumoren (Melanom, Lungenkarzinom, Sarkom, Blasenkarzinom) exprimiert. Sie zeigen außer in Testis und Plazenta keine Expression in normalem Gewebe. Sie sind damit zwar nicht melanomspezifisch, aber es hat sich gezeigt, dass mehr als 60% aller Melanompatienten eines der Antigene MAGE, BAGE oder GAGE besitzen (Boon und van der Bruggen, 1996; van der Bruggen et al., 1991; Gaugler et al., 1994; van den Eynde et al., 1995; van Pel et al., 1995).

Zu den sogenannten Differenzierungsantigenen zählen Tyrosinase, Melan-A/MART-1 und gp100/Pmel-17. Sie werden sowohl auf Melanozyten als auch auf Melanomzellen präsentiert und wie MAGE, BAGE und GAGE von

zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt (Brichard et al., 1993; Brichard et al., 1996; Bakker et al., 1999; Sensi et al., 1995).

Onkogene und Tumorsuppressorgene

Onkogene sind Gene, die die Zellproliferation aktiv fördern. Die normalen nichtmutierten Formen bezeichnet man korrekt als Protoonkogene. Sie nehmen eine wichtige Aufgabe im Rahmen der Signaltransduktion und des Zellwachstums wahr. Die mutierten Formen, die Onkogene, sind übermäßig oder unangemessen aktiv.

Zu den Onkogenen zählt die ras Gen Superfamilie, im besonderen N-ras, K-ras und H-ras, die für die bei der Signaltransduktion beteiligten G-Proteine kodieren. Eine Expression von ras-Onkogenen konnte nur in Melanomzellen, jedoch nicht in Zellen normaler oder dysplastischer Nävi nachgewiesen werden (Albino et al., 1992). Bislang konnte jedoch nicht erwiesen werden, dass ras-Mutationen als isolierte genetische Veränderung eine maligne Transformation auslösen können. Sie können aber zu unkontrollierten Wachstumsimpulsen für die Zellen und damit zu einem prämaligen Phänotyp führen.

Viele weitere Onkogene wie die Transkriptionsfaktoren c-myc, c-fos und c-jun, die die Expression der HLA-Klasse I regulieren, wurden auf ihren Einfluss bei der Tumorentstehung untersucht (Bennett, 1993).

Ebenfalls zu den Onkogenen zählt die Transmembrantypokinase c-Kit. Dieses kodiert für den Rezeptor von SCF (stem cell factor) und kann in den meisten Melanomzelllinien nicht detektiert werden (Natali et al., 1992). Mutationen im c-Kit Gen führen außerdem zum Krankheitsbild des Piebaldismus (Fleischman et al., 1991).

Das **bcl-2** (B-cell leucemia/lymphoma 2) Onkogen ist in der Lage, den programmierten Zelltod, die Apoptose, zu blockieren und dadurch die Vermehrung der Tumorzellen zu fördern. Ramsay et al. (1995) konnte in allen 39 untersuchten benignen Nävi bcl-2 Expression nachweisen. In primären Melanomen war das Protein noch in 67% exprimiert, während bei 54% der Melanommetastasen das Protein nachweisbar war.

Im Gegensatz zu den Onkogenen, die in der Tumorentwicklung und Progression überexprimiert werden, werden die sogenannten Tumorsuppressorgene bei der Tumorgenese inaktiviert und können ihre eigentliche Funktion, die Hemmung der Zellproliferation, nicht mehr wahrnehmen.

Zu diesen Tumorsuppressorgen zählt man das Gen **p16**, das wegen seiner chromosomalen Lokalisation in 9p21 zu den Kandidatengenen für das familiäre Melanom zählt (Hussussian et al., 1994, Cannon-Albright et al., 1992). Das Genprodukt von p16 inhibiert das Protein CDK4 („cyclin dependent kinase 4“) und nimmt somit Einfluss auf den Übergang der Zellen aus der G1-Phase in die Synthesephase. Das Fehlen von p16 Protein durch eine Deletion des Gens oder durch die Expression von Mutanten und damit inaktivierten Proteinspezies können somit ein abnormes Zellwachstum zur Folge haben. Eine Inaktivierung des p16 Gens konnte in mehreren Tumorzelllinien (Melanom, Pankreaskarzinom, Gliom) nachgewiesen werden (Gruis et al., 1995). Es scheint, dass vor allem in späteren Stadien der Melanomprogression der Verlust von p16 eine wichtige Rolle für die Entwicklung des metastatischen Potentials des Tumors spielt. Ebenso wie das Fehlen des p16 Proteins bewirkt eine bestimmte Mutation von CDK4 über eine Hemmung der Bindung von p16 an CDK4 ein abnormes Zellwachstum (Wolfel et al., 1995). Das Tumorsuppressorgen **p15**, auch als CDKN2B bekannt, weist eine 93%-ige Sequenzhomologie zu p16 auf und ist als Inhibitor von **CDK4** (*Zyclin-abhängige Kinase*) tätig. Eine gemeinsame Deletion von p15 und p16 in Tumorzelllinien ist häufig zu beobachten, die Deletion von p15 ohne p16 jedoch nie (Walker et al., 1998).

Ein weiteres Gen, das eine Suppression von Tumoren durch Wachstumsstop in der G1-Phase des Zellzyklus oder durch Einleitung der Apoptose bewirken kann, ist das Tumorsuppressorgen **p53**. Analysen von p53 Mutationsstudien im malignen Melanom ergaben sehr unterschiedliche Expressionsergebnisse von mutiertem p53 Protein von 28% bis 85% (Kanoko et al., 1996; Streck et al., 1991). P53 Mutationen, die zu einer höheren Zahl in malignen Melanomen im Gegensatz zu dysplastischen Nävi vorliegen, scheinen eher in späten

Progressionsstadien aufzutreten und könnten somit als Marker für die Tumorprogression dienen (Kanoko et al., 1996; Vogt et al., 1997; Albino, 1992). Weiterhin induziert p53 Apoptose in Zellen mit defekter DNA durch Induktion verschiedener mitochondrialer Proteine wie **Bax** (*Bcl-2-associated X protein*), Noxa und **PUMA** (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) (Henry et al., 2002). p53 steht darüber hinaus noch mit anderen Molekülen der Apoptose in Interaktion (Kim et al., 2002). Nach Induktion von PUMA kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c und zur Aktivierung von Procaspase 9 (Wu und Deng, 2002). Exogene PUMA-Expression verursacht in menschlichen Melanomzelllinien den apoptotischen Zelltod (Karst et al., 2005).

Transkriptionsfaktoren

Die Rolle von Transkriptionsgenen und die Entdeckung von Transkriptionsfaktoren, die Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose kontrollieren, hat entscheidend zum Verständnis der Tumorentwicklung beigetragen. Zu den DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren, die bei der Entwicklung und Progression des Melanoms eine wichtige Rolle spielen, gehören **AP-2 α** (*activating protein 2 α*), **AP-1** (*activating protein 1*), **CREB** (*camp-responsive element binding protein*), **MITF** (*Microphthalmia-associated transcription factor*), **PAX₃** (*paired box*), **SKI** (*ski-related novel gene*), **Snail**. Transkriptionsfaktoren, die durch Protein-Protein-Bindungen bei der Melanom-entstehung mitwirken, sind **SKI**, **β -Catenin** und **CtBP** (*C-terminal binding protein*).

Die **AP-1**-Familie besteht aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren, dazu gehören c-jun und c-fos. Über AP-1 kann ein Gene mda-7 (melanoma differentiation-associated gen, IL-24) reguliert werden, das als negativer Regulator bei der Melanomprogression wirkt (Madireddi et al., 2000; Jiang et al., 1995).

MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) scheint ein entscheidendes Schlüsselement im Zellüberleben, als auch bei der Proteinexpression in Melanozyten zu sein. MITF-Expression konnte in normalen

Melanozyten ebenso nachgewiesen werden, wie auch in allen Melanomstadien (Goding, 2000; Nyormoi und Bar-Eli, 2003).

Die Regulierung von MITF findet über zwei Signalkaskaden statt. Zum einen kommt es durch das Hormon α -MSH zu erhöhten cAMP-Spiegeln, das zur Aktivierung des in Melanomzellen anti-apoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktors CREB führt (Jean et al., 1998b). Dies resultiert in der MITF-Transkriptionsaktivierung, die auch noch nach 24 Stunden nachweisbar ist (Bertolotto et al., 1998; Busca und Ballotti, 2000).

Zweitens kann eine Aktivierung von MITF über SCF/c-kit stattfinden. Dabei triggert die c-kit-Stimulation die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-vermittelte Phosphorylierung von MITF. Diese ist mit dem Andocken des Transkriptionaktivators p300/CBP assoziiert und führt zur kurzzeitigen, etwa zwei Stunden anhaltenden MITF-Transkriptionsaktivierung (Hemesath et al., 1998; Sato et al., 1997; Wu und Hammer, 2000; Xu et al., 2000). MITF scheint ebenfalls ein Zielgen des Wnt Signaltransduktionsweges zu sein (Widlund et al., 2002).

Durch die MITF-Aktivierung werden nachfolgend zum einen die für die Pigmentierung verantwortlichen Gene Tyr (*Tyrosinase*), TRP-1 und DCT, zum anderen das anti-apoptotische BCL-2-Gen hochreguliert (Nyormoi und Bar-Eli, 2003). McGill et al. konnten 2002 zeigen, dass durch MITF die Bcl-2-Expression reguliert und damit das Zellüberleben moduliert wird. Die MITF-Blockade wäre somit ein denkbarer Therapieansatz beim malignen Melanom.

Es hat sich gezeigt, je höher ein Transkriptionsfaktor in der Entwicklung zum malignen Melanom steht, desto mehr Einfluss kann er auf verschiedene Zielgene nehmen. Im Verständnis über die Rolle und Regulation von Transkriptionsfaktoren liegt der Schlüssel für künftige Therapiemöglichkeiten.

1.4 Transkriptionsfaktor AP-2 α

Der Transkriptionsfaktor AP-2 α (activator protein 2), ein 52kDa DNA-bindendes Protein, wurde zum ersten mal aus HeLa Zellen isoliert (Mitchell et al., 1987; Williams et al., 1988). Ein Transkriptionsfaktor wird für die korrekte Bindung der RNA-Polymerasen an die DNA benötigt. Dazu bindet er an eine

Promotorfrequenz direkt neben einem Gen, um die RNA-Polymerase, die das Gen transkribieren soll, anschließend an die richtige Stelle zu bringen und zu leiten. AP-2 α wird in epidermalen Zellen und in Zellen der Neuralleiste transkribiert. Über AP-2 α wird weiter berichtet, in der Regulation verschiedener Gene involviert zu sein, wie p21/WAF-1 (Zeng et al., 1997), c-Kit (Bar-Eli, 1997; Huang et al., 1998), MelCAM /MUC18 (Sers et al., 1993; Jean et al., 1998a), Typ IV Kollagenase (Huhtala et al., 1990), c-MYC (Imagawa et al., 1987; Gaubatz et al., 1995), c-erbB-2 (Bosher et al., 1995), E-Cadherin (Hennig et al., 1995; Hennig et al., 1996) und Cytokeratin Gene (Leask et al., 1991; Snape et al., 1991), um nur einige zu nennen. Darüber hinaus kontrolliert AP-2 α die Transkription von verschiedenen Genen, die mit der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Karzinom-Wachstum und -Progression in Verbindung stehen. AP-2 α ist ein äußerst wichtiger Regulator in der Entwicklung der Säugetiere. So zeigten AP-2 α Knockout Mäuse multiple Neuralrohrdefekte, sowie knöcherne und Bauchwanddefekte (Zhang et al., 1996).

Funktionale AP-2 α Bindungsstellen wurden in den Enhancer Regionen viraler und zellulärer Gene mit einer gemeinsamen Kernerkennungssequenz, 5'-GCCNNNGGC-3' identifiziert (Williams et al., 1988). Die Aufgabe dieser Enhancer ist es, eine von Promotoren aus gestartete Transkription zusätzlich zu verstärken. Die DNA-Bindungsdomäne befindet sich in der c-terminalen Hälfte des 52 kDa großen AP-2 α -Proteins. AP-2 α wird von einem Gen, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 in der Nähe des HLA Locus lokalisiert ist, kodiert 6p24 - p22.3 (Gaynor et al., 1991; Mitchell et al., 1987) und besteht aus 7 Exons verteilt auf 18 kb (Bauer et al., 1994).

AP-2 α reagiert wie die meisten Transkriptionsfaktoren als Homodimer mit der DNA als Helix-Turn-Helix-Motiv (Williams und Tjian, 1991).

Buettner et al. konnte 1993 zeigen, dass zwei unterschiedlich gesplice mRNAs von dem AP-2 α -Gen transkribiert wurden. Diese kodieren zwei verschiedene Proteine: AP-2 α A und AP-2 α B. Dabei ist das AP-2 α A Protein identisch mit dem 52 kDa AP-2 α A Protein, das aus HeLa-Zellen isoliert wurde. Das AP-2 α B Protein besitzt die Aktivierungsdomäne von AP-2 α und einen Teil der DNA-Bindungsdomäne. Es fehlt jedoch die für DNA-Bindung wichtige

Dimerisationsdomäne. Transfektionsexperimente deuten darauf hin, dass AP-2 α B ein potenter Inhibitor der Transaktivierung von AP-2 α A ist. Dabei interagiert AP-2 α B mit AP-2 α A und verhindert dadurch die Bindung von AP-2 α A mit der DNA. Transfektionsversuche konnten weiter zeigen, dass das AP-2 α A Protein den eigenen Promotor aktivieren kann (Bauer et al., 1994).

Zwei weitere mit AP-2 α verwandten Gene wurden zunächst kloniert, **AP-2 β** (Moser et al., 1995) und **AP-2 γ** (Oulad-Abdelghani et al., 1996; Chazaud et al., 1996) und auf den Chromosomen 6p12-21.1 und 20q13.2 lokalisiert (Williamson et al., 1996). Diese Transkriptionsfaktoren wurden bei Untersuchungen der AP-2 α -Expression bei *Xenopus* Embryonen entdeckt (Winning et al., 1991). Takahashi et al. konnten 2000 immunhistochemisch belegen, dass AP-2 α nur in den Basalzellen der Epidermis exprimiert wurde. Wohingegen AP-2 γ in den Nuklei von Basal-, Spindelzellen und Granulozyten nachgewiesen werden konnte.

Ein weiteres Mitglied der AP-2-Genfamilie, **AP-2 δ** , konnte aus Mäusegehirnzellen identifiziert werden.

2003 gelang es einen weiteren AP-2-Transkriptionsfaktor, das **AP-2 ϵ** zu identifizieren (Tummala et al., 2003). Das menschliche AP-2 ϵ Gen wurde auf dem Chromosom 1p42 lokalisiert, enthält 7 Exons. Menschliche AP-2 ϵ mRNA wurde in der Haut nachgewiesen, sowie in Kerationozyten-Kulturen. In-situ Hybridisierung und Immunhistochemie konnten AP-2 ϵ nur im Neuralen Gewebe, insbesondere im Mittel- und Hinterhirn sowie dem Hypothalamus und im Bereich des Bulbus olfactorius nachweisen. Wang et al. leiteten 2004 daraus ab, dass AP-2 ϵ eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Geruchsorgans einnimmt.

Alle AP-2 Proteine besitzen eine dem AP-2 α sehr ähnliche Struktur mit ähnlicher C-terminaler DNA-Bindungsereich und Dimerisations-Domäne. Unterschiedlich ist jedoch meist die N-terminale Aktivierungsdomäne, die unterschiedliche Effekte bewirken.

1.4.1 Genetische Veränderungen von AP-2 α in Tumoren

Die Beziehung zwischen AP-2 α und dem Zellwachstum sowie der Karzinogenese werden durch zahlreiche Untersuchungen untermauert. Um einige Beispiele zu nennen: Die Aktivierung von RAS und c-erbB2 durch AP-2 α (Bosher et al., 1995), die Überexpression von AP-2 α in einigen Karzinomen (Gilbertson et al., 1997) und die Regulation von AP-2 α durch Phorbol Ester (Luscher et al., 1989), zyklisches Adenosinmonophosphat, Proteinkinase C (Imagawa et al., 1987) und Retinsäure (Wanner et al., 1996).

Beim Ovarial-Karzinom konnte eine verminderte AP-2 α -Expression aufgezeigt werden, die mit der Überlebensrate korreliert (Anttila et al., 2000). Dabei korrelierte eine reduzierte cytoplasmatische AP-2 α -Expression mit höher malignem Potential.

Die Expression von AP-2 α scheint ebenso eine wichtige Rolle bei dem Mamma-Karzinom zu spielen. AP-2 α reguliert die Transkription von neuralen und epidermalen Genen und steht in Verbindung mit der Überexpression von c-erbB-2 in menschlichen Mamma-Karzinomzelllinien (Byrne et al., 1993).

Dabei korrelieren hohe Level von AP-2 α und AP-2 γ mit der Überexpression des Proto-Onkogens c-erbB-2. Der Promoter des c-erbB-2-Genes enthält Bindungsstellen für AP-2 α (Bosher et al., 1995). Auf der anderen Seite wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, die auf eine Tumorsuppressorrolle von AP-2 α bei invasiv wachsendem Brustkrebs schließen lassen (Gee et al., 1999). Dabei wurde AP-2 α nahezu ausschließlich in den Nuklei der Krebszellen nachgewiesen. Bei Untersuchungen zur AP-2 α und AP-2 γ Expression in Mamma-Karzinomzellen zeigte sich eine bessere Prognose von AP-2 α exprimierenden Tumoren. AP-2 γ hatte hingegen keinen Einfluss auf die Überlebensrate (Friedrichs et al., 2005). Weitere Untersuchungen zeigten, dass bei einer Überexpression des HER-2 Rezeptors eine verstärkte Genamplifikation und eine verstärkte Expression von AP-2 α nachgewiesen werden konnte (Pellikainen et al., 2004).

Ropponen et al. (2001) führten AP-2 α -Expressionsuntersuchungen bei kolorektalen Adenomen und Adenokarzinomen durch. Dabei wurde AP-2 α meist im Cytoplasma nachgewiesen, wohingegen AP-2 β und AP-2 γ nur im Cytoplasma der Tumorzellen exprimiert wurden. Die Ergebnisse zeigten eine geringere cytoplasmatische AP-2 α -Expression bei Dukes B und C Tumoren, dass entspricht organüberschreitendem Wachstum des Tumors mit Metastasierung. Zusätzlich wurden hier niedrige AP-2 γ -Expressionen in hochmalignen kolorektalen Karzinomen nachgewiesen.

AP-2 Proteinexpression konnte auch beim Nierenzellkarzinom nachgewiesen werden. Dabei wurde eine unterschiedliche Expression der drei Isoformen α , β und γ festgestellt. AP-2 β -Expression konnte nur in den frühen Stadien des Nierenzellkarzinoms nachgewiesen werden (Oya et al., 2004).

Es scheint, als spiele AP-2 α auch beim Prostata-Karzinom eine entscheidende Rolle. Indem AP-2 α mit Transkriptions-Aktivator Sp3 des endothelial growth factor (VEGF), der ein angiogenetischer Faktor bei der Entwicklung des Prostata-Karzinoms ist, einen Komplex bildet, sinkt die Expression von VEGF. (Ruiz et al., 2004).

1.4.2 Genetische Veränderungen von AP-2 α im malignen Melanom

Für eine mögliche Rolle von AP-2 α als Tumorsuppressorgen sprechen zahlreiche Studien über das maligne Melanom. Dabei spielt AP-2 α eine wichtige Rolle bei der Regulierung zweier wichtiger Gene, die mit der Tumorgenese und –Progression beim malignen Melanom in Verbindung stehen: das Proto-Onkogen **c-Kit** und das Adhäsionsmolekül **MeICAM/MUC18** (Didier et al., 1998; Huang et al., 1998).

Das Proto-Onkogen c-Kit codiert einen transmembran Tyrosinkinase Protein-Rezeptor. Die Expression von c-Kit nimmt im Verlauf des Tumorwachstums und der Invasion von Melanomzellen ab. Dazu korreliert der Verlust der c-Kit Expression in hochmetastatischen Melanomzelllinien mit dem Verlust der AP-2 α -Expression. Untersuchungen des c-Kit-Promotors zeigten drei funktionelle

AP-2 α -Bindungsstellen. Interessanterweise unterdrückte eine Re-Expression von AP-2 α in AP-2 α -negativen Melanomzelllinien die Tumorgenität und das metastatische Potential in Nacktmäusen (Huang et al., 1998). Die Autoren dieser Studien schließen daraus, dass c-Kit in Melanomzellen, verursacht durch einen Verlust der AP-2 α -Aktivität, herunterreguliert wird und der Verlust des c-Kit-Rezeptors malignen Melanomzellen erlauben könnten, der SCF/c-Kit vermittelten Apoptose zu entfliehen.

Das Adhäsionsmolekül **MeICAM/MUC18** ist ein 113kDa Zelloberflächen Glykoprotein, das durch eine Überexpression in Primärmelanomen und metastatischen Melanomzellen entdeckt wurde (Lehmann et al., 1989). MCAM/MUC18 spielt eine entscheidende Rolle bei Zell zu Zell- und Zell zu Matrix-Interaktionen, die wichtig für die Invasion und Metastasierung sind. Wenn die Expression von AP-2 α verloren geht, kommt es zum Anstieg von MeICAM/MUC18 und zu einer Zunahme des Tumorwachstums und der Metastasierung von menschlichen Melanomzelllinien in Nacktmäusen (Didier et al., 1998). Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Promotor von MCAM/MUC18 vier Bindungsstellen für AP-2 α besitzt, die die Promotoraktivität unterdrücken und die endogenen Proteinlevel herunter regulieren. Bei der Re-Expression von AP-2 α in hochmetastatischen Melanomzelllinien zeigte sich eine Verminderung der Tumorgenität und des metastatischen Potentials bei Nacktmäusen. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass in Melanomzellen die Expression von MCAM/MUC18 durch AP-2 α reguliert wird.

Zu zahlreichen weiteren Genen, die bei der Progression des Melanoms eine Rolle spielen und von AP-2 α reguliert werden, gehört **p21**. Bei einer Überexpression von AP-2 α konnte man eine Aktivierung von p21 (WAF1) nachweisen, das zu einer Hemmung der DNA-Synthese und des Karzinomzellwachstums führte (Karjalainen et al., 1998).

In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die AP-2 α Expression während der Melanomprogression herunterreguliert wird. Die Autoren sagen mit einer niedrigen AP-2 α Expression eine niedrige Überlebenschance eines Melanoms in Phase I voraus.

Der Verlust der AP-2 α Expression steht in signifikanter Korrelation mit niedriger p21 Expression, hoher Tumordicke, hohem Clark-Level, hoher TMN-Kategorie und einer hohen Anzahl von Rückfällen und männlichem Geschlecht, wobei der signifikanteste Marker die Tumor-Dicke war (Karjalainen et al., 1998).

AP-2 α Expression konnte nur in radial wachsenden Zelllinien gefunden werden, wobei kein Nachweis einer Expression in metastatischen Zelllinien gefunden werden konnte (Bar-Eli et al., 1997).

Bar-Eli et al. konnten 2001 zeigen, dass die Re-Expression von AP-2 α in AP-2 α -negativen Zellen ihre Tumorgenität und das metastatische Potential in Nacktmäusen unterdrückt. Möglich ist dies vermutlich durch die Transaktivierung von **c-Kit** und **SCF**-induzierte Apoptose (Huang et al., 1998).

Bei Transfektionsversuchen mit der dominant-negativen Form des AP-2 α Genes, AP-2 α B, in AP-2 α positiven primären Melanomzellen konnte eine Zunahme des Tumorwachstums nachgewiesen werden (Gershenwald et al., 2001). Der Verlust von AP-2 führt weiterhin zu einer erhöhten **MMP-2**-Expression und -Aktivität (Gershenwald et al., 2001).

Da MMP-2 mindestens eine Bindungsstelle für AP-2 aufweist, ist eine Regulierung des MMP-2-Gens durch AP-2 möglich. Dies würde erklären, dass ein Verlust der AP-2 α -Expression die Melanomprogression fördern könnte (Bar-Eli, 2001; Frisch und Morisaki, 1990; Qin et al., 1999; Somasundaram et al., 1996).

In zahlreichen Studien konnten bei Genen Bindungsstellen für AP-2 α nachgewiesen werden, die bei der Apoptose (c-KIT, Bcl-2, FAS/QAPO-1), der Zelladhäsion (MelCAM, E-cadherin), der Tumorzellinvasion und Angiogenese (MMP-2, PAI-1, VEGF, PAR-1) und im Zellzyklus (HER-2, p21/WAF-1) eine Rolle spielen (van den Oord et al., 1994; Cowley und Smith, 1996; Descheemaeker et al., 1992, Gille et al., 1997; Silins et al., 1997; Tellez und Bar-Eli, 2003; Natali et al., 1995; Jiang et al., 1995; Vidal et al., 1995).

Alle diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Gen, das AP-2 α kodiert, ein Tumorsuppressor im primären Melanom sein könnte (Bar-Eli, 2001).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Es konnte gezeigt werden, dass es während der Melanomprogression zu einem Verlust von AP-2 α -Expression kommt. Dieser Verlust bewirkt einerseits in metastatischen Melanomzelllinien eine Überexpression von MelCAM/MUC18 und MMP-2 und andererseits einen Verlust von c-KIT Expression. Bisherige Arbeiten haben nur eine kleine Anzahl verschiedener Zelllinien untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu untersuchen in wie weit die Expression von AP-2 α Protein und RNA bei der Tumorprogression von radial wachsenden, über vertikal wachsenden bis hin zu metastatischen Melanomzelllinien verloren geht.

Inaktivierung von AP-2 α im malignen Melanom durch Transfektion von AP-2 α -negativen Zellen mit der dominant-negativen Form von AP-2 α , AP-2 α B, trägt zur Melanomprogression bei.

Durch Expressionsanalysen von AP-2 α A zu AP-2 α B auf Protein und RNA-Ebene konnte man die Beziehung der beiden Genprodukte darstellen. Interessant war dabei, ob der Verlust der AP-2 α Expression in vertikal wachsenden und metastatischen Melanomzelllinien mit dem metastatischen Potential korreliert.

Eine Frage, die diese Arbeit beantworten sollte, war auch, ob die AP-2 α Expression mit der Expression der oben genannten Gene korreliert, besonders mit der Expression von c-Kit.

Diese Arbeit sollte zum einen eine Vielfalt an Zelllinien, von Melanozyten über Nävi, RGP- und VGP-Melanomen bis hin zu Metastasen, sowie einer Reihe von anderen Tumorzelllinien untersuchen. Zum anderen sollte durch die Expressionsuntersuchung der verschiedenen Zelllinien auf RNA-, DNA- sowie auf Proteinebene und letztlich auch in Nativgeweben, in intakten Zellen aus der Zellkultur und Hautrekonstrukten Erkenntnisse gewonnen werden, ob und an welcher Stelle der Melanomprogression die Expression von AP-2 α verloren geht und ob dies mit der Melanomprogression assoziiert werden kann.

Zum Abschluss der Arbeit galt es zu untersuchen, wie sich die Expression von AP-2 α in Hautrekonstrukten mit Melanozyten oder mit radial wachsenden Zelllinien, und in verschiedenen Melanom- und Metastasengewebe verhält.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 RNA-Isolierung

2.1.1.1 Herstellung RNase freier Lösungen und Arbeitsmaterialien

RNasen sind äußerst stabile Enzyme, die fast überall vorhanden sind. Kommen RNasen mit RNA in Berührung, führt das zu einem raschen Abbau der RNA. Deshalb ist beim Umgang mit RNA auf eine möglichst RNase freie Umgebung bzw. eine effiziente RNase Inhibition zu achten. Hierzu zählen saubere, autoklavierte Gefäße und sterile, wenn möglich RNase frei deklarierte Plastikgefäße. Ebenso müssen verwendete Lösungen, die mit RNA in Berührung kommen, entweder mit 0,1% (v/v) DEPC behandelt worden sein oder mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt werden. Inkubiert man Lösungen mit 0,1% DEPC über Nacht, werden RNasen zerstört. Da das DEPC jedoch auch Nukleinsäuren zerstört, muss es vor dem Einsatz durch Autoklavieren wieder entfernt werden. DEPC zerfällt beim Autoklavieren in CO₂ und Ethanol.

Gelkammern, Käbme oder Rührfische, die man alle nicht autoklavieren kann, werden mit 1% (v/v) SDS-Lösung in DEPC-Wasser behandelt und anschließend gut mit DEPC-Wasser abgewaschen.

Außerdem werden beim Arbeiten mit RNA stets Handschuhe getragen, die häufig gewechselt werden müssen. Bei der RNA-Präparation wird, wenn nicht anders verlangt, immer auf Eis gearbeitet und bei 4°C zentrifugiert.

2.1.1.2 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde das RNA-CleanTM System (AGS, Heidelberg) verwendet. Die Isolierung von RNA aus Zelllinien wurde wie folgt vorgenommen:

- 1.) Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und adhären wachsende Zellen wurden mit EDTA/Trypsin (Seromed, Berlin) abgelöst.
- 2.) Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Pro 10^6 Zellen wurden 200 μ l RNA-Clean (Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Mix) für die Lyse verwendet. Durch Guanidinium-Thiocyanat werden Zellbestandteile zerstört und frei werdende RNasen inhibiert.
- 3.) Durch die nun folgende Phenol-Chloroform Extraktion und die fünfminütige Inkubation auf Eis, sammelt sich die RNA in der wässrigen Phase, während die DNA in der organischen Phase und der Interphase verbleibt.
- 4.) Durch Zentrifugation bei 13000 rpm in einer Mikrozentrifuge (Biofuge 13, Heraeus) für 5 min bei 4°C kommt es zur Trennung der organischen von der wässrigen RNA-haltigen Phase, die in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt wird. DNA und Proteine verbleiben in der Interphase und der Phenol-Chloroform-Phase zurück.
- 5.) Nach der Extraktion mit Phenol-Chloroform (1:1) und Chloroform wurde die RNA mit Isopropanol auf Eis für 15 min gefällt.
- 6.) Durch anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min bei 4°C erhält man das RNA-Pellet. Für die weitere Verwendung der RNA muss diese entsalzt werden.
- 7.) Dazu wird das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugieren wird das Pellet im Thermoblock bei 37°C für ca. 5 min getrocknet und in 25-50 μ l TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgt bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

2.1.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Mit Hilfe eines Spektrometers (Genesys 5, Spectronic) kann die Konzentration einer gewonnenen RNA oder DNA bestimmt werden. Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf. Eine Absorption

von 1 entspricht bei 260 nm einer Konzentration von 40 µg/ml an RNA. Die Konzentration von RNA ermittelt man mit folgender Formel:

$$C (\mu\text{g/ml}) = OD \times \text{Verd.} \times 40$$

Die Verunreinigung der RNA mit Proteinen kann man durch die Bestimmung des Absorptionsmaximums aromatischer Aminosäuren bei 280 nm ermitteln. Über den Quotienten 260/280 nm kann man eine Aussage über den Grad der Reinheit der RNA treffen. Dabei gilt eine RNA mit einem Quotienten von 1,9-2,0 als sehr rein. Unterhalb dieser Werte liegt eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenolreste vor. Die optische Dichte wird in Quarzküvetten gemessen. Die RNA wird vor der Messung 1:100 verdünnt. Als Nullwertabgleich wird reiner TE-Puffer verwendet.

2.1.2 Northern-Blot

2.1.2.1 RNA-Gel

Von verschiedenen Zelllinien wurden jeweils 10 µg RNA in 20 µl Probenpuffer gelöst (20 mM MOPS; 5 mM NaAcetat; 1 mM EDTA, pH 8,0; 6% Formaldehyd; 50% Formamid).

Anschließend wurden die Proben mit 2 µl Gelladepuffer vermischt (50% Glycerin; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol) und für 15 min bei 65°C denaturiert.

Die Proben wurden dann auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen (20 mM MOPS; 5mM NaAcetat; 1 mM EDTA, pH 8,0; 6% Formaldehyd; 1% Agarose). Für alle Lösungen wurde DEPC-H₂O verwendet.

Die RNA wurde nach einem Vorlauf von 5 min bei 100 Volt und 400 mAmpere über Nacht (15 Stunden) bei 25 Volt in MOPS-Puffer (20 mM MOPS; 5 mM NaAcetat; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgetrennt. Beim Vorlauf wurde der Laufpuffer nur bis zum Gelrand eingefüllt, danach wurde das Gel mit Puffer völlig bedeckt.

Nach photographischer Dokumentation der Lademengen wurde das Gel anschließend für 30 min in 20xSSC gewaschen. Die RNA-Moleküle werden auf

Grund von Kapillarkräften aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Roch, Mannheim) gezogen. Der Transfer der negativ geladenen RNA wird durch die positiv geladene Nylonmembran zusätzlich erleichtert. Nach Befeuchten der Nylonmembran in 20xSSC wurde sie vorsichtig auf das Gel abgerollt. Zwei aufgelegte und angefeuchtete Whatman-Papiere sorgen für die notwendige Kapillarkraft. Geblottet wurde über Nacht in 20xSSC.

Am folgenden Tag wurde die Membran entfernt und durch UV-Licht fixiert (120 mJ, UV-Stratalinker, Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Zur Überprüfung, ob ein vollständiger Transfer der RNA stattgefunden hat, wird das Gel nach Inkubation in Ethidiumbromid nochmals photographiert.

Anschließend konnte die Membran in eine Hybridisierung eingesetzt werden.

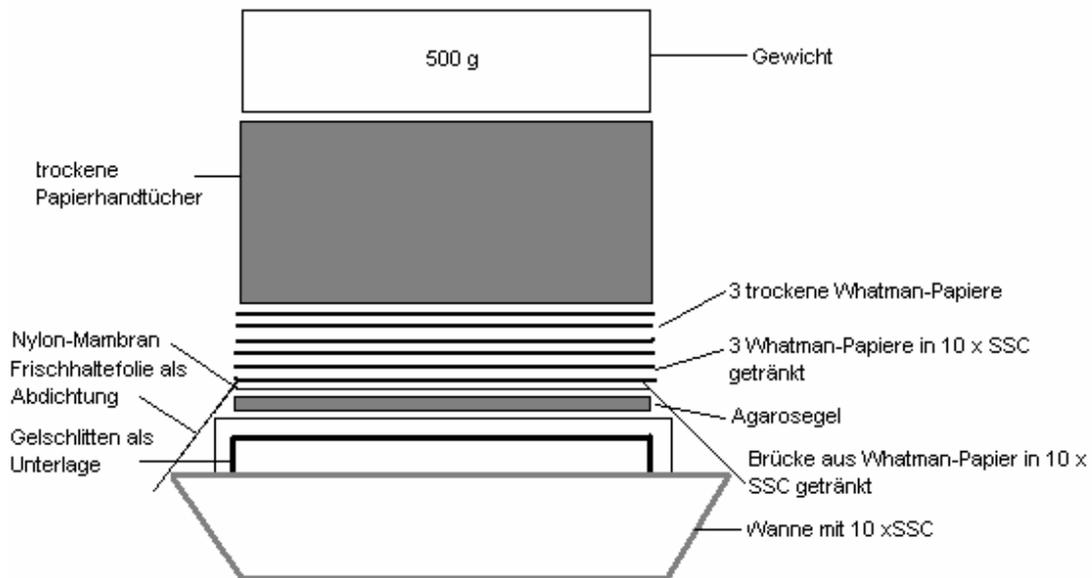


Abb. 5: Aufbau des Northern-Blots

2.1.2.2 Herstellung einer Digoxigenin-markierten AP-2 α A-Sonde

Zur Herstellung der AP-2 α A spezifischen Gensonde wurde eine Gelelektion des PCR-Produktes nach Verdau einer Midipräparation durchgeführt. Um die Hybridisierungsprodukte zu detektieren, werden zur Sondenherstellung dNTPs verwendet, bei denen ATP durch Digoxigenin markiertes UTP ersetzt wurde. Dabei kann das eingesetzte Klenow-Enzym (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) neue digoxigenin-markierte DNA-Stränge synthetisieren, wenn man ihr als Matrize einzelne DNA-Stränge und beliebige Hexanukleotidprimer anbietet. Da die Hexanukleotide aus sämtlichen Sequenzkombinationen bestehen, binden die Primer zufällig an die DNA-Matrize und die gesamte DNA wird einheitlich markiert.

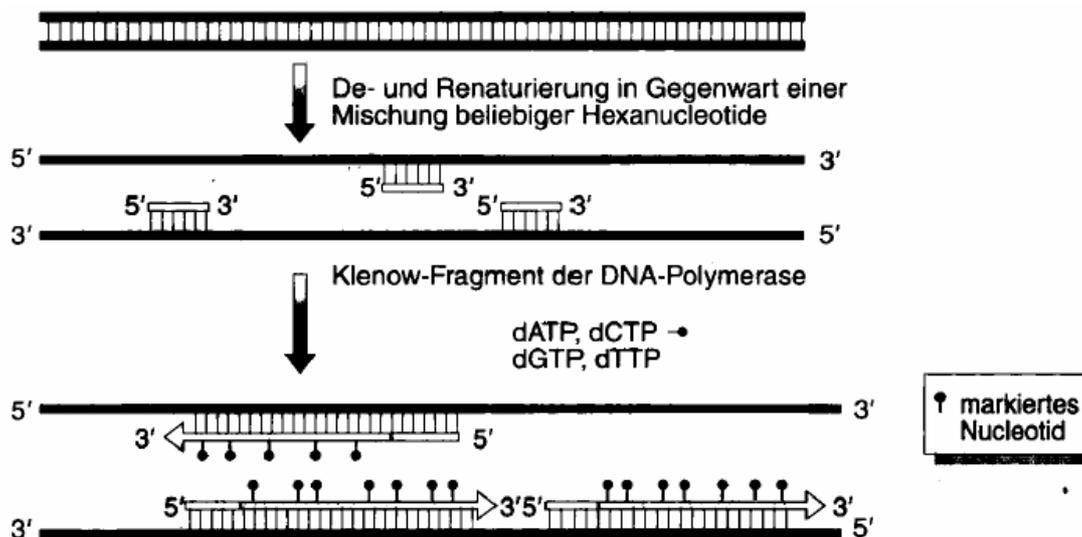


Abb. 6: DNA-Markierung durch Digoxigenin (nach T.Strachan, A.P. Read, Molekulare Humangenetik)

Etwa 1-10 μ l des Eluates, was ca. 100-200 ng entsprach, wurden zusammen mit 1 μ g Hexamerprimern in 50 mM Tris-HCL (pH 8,0), 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT für 7 min bei 100°C denaturiert.

Danach wurde die Sonde für 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 100 μ M dATP, 100 μ M dCTP, 100 μ M dGTP, 65 μ M dTTP und 35 μ M DIG-dUTP

(DIG DNA Labeling MIX, ROCH, Mannheim) und 3 Units Klenow-Enzym (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 µl 0,5 M EDTA abgestoppt.

Zuletzt wurde die Sonde über den Qiaquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und auf ihre Markierung überprüft.

Um eine höhere Menge an DIG-markierter DNA zu erhalten, kam ein DIG DNA Labeling KIT (Roch, Mannheim) zum Einsatz. Damit wurden 1500 ng DNA bei 95°C für 10 min denaturiert.

Auf Eis wurde dann zu der denaturierten Probe 2 µl Hexanucleotide Mix, 2 µl dNTP Labeling Mix und 1 µl Klenow-Enzym dazugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 18 Stunden wurde die Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0 gestoppt.

2.1.2.3 Herstellung einer 28S-Oligo-Sonde

Zur Herstellung der 28S-Oligo-Sonde wurde der DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) verwendet. Dazu wurden 5 pmol (ca. 65 ng) des Oligos (30 mer) mit 4 µl Tailing-Puffer, 4 µl CoCl₂ (25 mM), 1 µl DIG-ddUTP (1 mM) und 50 Units Terminale Transferase für 15 min bei 37°C inkubiert und mit 4 M LiCl und Ethanol gefällt.

2.1.2.4 Herstellung einer β-Actin-Sonde

Dazu wurde β-Actin mittels PCR amplifiziert und das PCR-Produkt aus dem Gel eluiert. Zur Herstellung der β-Actin-Sonde wurde ebenfalls der DIG DNA Labeling Kit (Roch, Mannheim) verwendet. Die Vorgehensweise wird in Kapitel 2.1.2.2 beschrieben.

Allerdings wurde die β-Actin-Sonde über Sephadex G 50 Säulen gereinigt.

2.1.2.5 Northern-Blot Hybridisierung und Detektion

Die Membran wurde mit bereits vorgewärmter Prähybridisierungslösung (2x Denhardt's Lösung, 5xSSC, 0,5% SDS, 50 µg/ml Lachs-Sperma-DNA) für 2 Stunden bei 65°C im Wasserbad prähybridisiert. Die Sonden wurden bei der ersten Verwendung für 7 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert, ab der zweiten Verwendung dann nur noch bei 70°C denaturiert.

Im Anschluss daran wurden die Sonden im Hybridisierungspuffer (2x Denhardt's Lösung, 5xSSC, 0,5% SDS, 50 µg/ml Lachs-Sperma-DNA) zugegeben und über Nacht für ca. 16 Stunden bei 65°C hybridisiert. Für das Waschen der Membran wurden unterschiedliche Stringenzbedingungen getestet. Dabei spielen die Hybridisierungs-Temperatur und die Salzkonzentration der Wasch-Lösung eine Rolle. Eine hohe Stringenz ergibt sich aus hoher Temperatur und niedriger Ionenstärke. Diese Bedingung führt zu einer erhöhten Spezifität und Erniedrigung des Hintergrundes. Wählt man eine niedrige Stringenz erhöht sich der Hintergrund und die Hybridisierung wird unspezifischer. Variiert wurden die Hybridisierungs-Temperatur (68°C, 65°C, 60°C, 50°C) und die Salzkonzentrationen (2x; 1x; 0,5x SSC + 0,1% SDS).

Die Membranen wurden zweimal 15 min bei jeweils der gleichen Stringenz und anschließend für 1 min in Maleinsäure-Puffer gewaschen.

Blockiert wurde für zweimal 15 min in 2x Blockierungs-Puffer (mit Maleinsäure verdünnt).

Darauf folgt eine Inkubation für 45 min mit dem Digoxigenin spezifischen Antikörper, der 1:10000 in 2x Blockierungs-Puffer verdünnt wurde.

Nachdem die Membranen zweimal 15 min in Maleinsäure gewaschen wurden, mussten sie für ca. 3 min mit Äquilibrierungspuffer pH 9,5, dem pH-Optimum der alkalischen Phosphatase, inkubiert werden.

Die Zugabe von CDP-STARTM Substrat (1:100-Verdünnung in Äquilibrierungspuffer, Roche, Mannheim) für 10 min führt zur Dephosphorylierung des Substrates durch die alkalische Phosphatase zur Emission von Licht bei einer Wellenlänge von 466 nm. Der Nachweis der Lichtemission erfolgt durch Auflegen eines Films (Kodak X-OMAT

chemiluminiszenten Film). Um ein Austrocknen der Membranen zu verhindern, mussten diese luftdicht in einen Plastikbeutel eingeschweißt werden.

2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit einer Polymerase-Ketten-Reaktion kann man die DNA-Sequenz von AP-2 α A aus verschiedenen Zelllinien schnell vervielfältigen. Zwei Oligonukleotid-Primern, die bei Bindung an die komplementären Sequenzen der DNA die gesuchte DNA-Region einrahmen, können mit Hilfe der DNA-Polymerase und den vier Desoxynucleotidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP die Synthese neuer DNA-Stränge starten. Dabei sind die neuen DNA-Stränge komplementär zu den einzelnen DNA-Strängen der gesuchten Sequenz von AP-2 α A.

2.1.3.1 Verwendete Primer

Die Primer wurden zu je 100pmol/ μ l aliquotiert und in einer Konzentration von 20 pmol/ μ l in die PCR eingesetzt.

Primer für die Amplifizierung des GAPDH-Housekeeping-Gens:

GAPDH-Forward-Primer: 5'-GAC AAC AGC CTC AAG CTC ATC-3'

GAPDH-Reverse-Primer: 5'-GAC GGC AGG TCA GGT CCA CCA-3'

GAPDH-Forward-Primer (nested): 5'-AAT CGG TCC TGC ACC ACC -3'

GAPDH-Reverse-Primer (nested): 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG -3'

Primer der Sequenzierung:

T7 Forward-Primer: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

BGH Reverse-Primer: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

Primer für die Amplifizierung von **AP-2 α A**:

AP-2 α A-Forward-Primer: 5'-CGATCCATGAAAATGCTTTGG-3'

AP-2 α A-Reverse-Primer: 5'-GAGAGCCTCACTTTCTGTGC-3'

Primer für die Amplifizierung von **AP-2 α B**:

AP-2 α B-Forward-Primer: 5`-GCGAATCCACTTGCTAACTAGAAG-3`

AP-2 α B-Reverse-Primer: 5`-GGAGGTGTAAC TTTATGGTAGAGG-3`

2.1.3.2 Reverse Transkription der RNA

Bei der reversen Transkription der mRNA in cDNA mit degenerierten verankerten Oligo(dT)-Primern, handelt es sich um eine Einstrang-Synthese. Das bedeutet, dass man am Ende ein cDNA-RNA-Hybrid erhält. Dies geschieht durch die Umkehrung der Transkription, bei der die Sequenzabfolge der mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (SUPERSCRIPT™ RNase H-) in die komplementäre DNA umgeschrieben wird. Welcher Abschnitt der mRNA revers transkribiert wird, hängt von dem verwendeten Forward-Primern ab, die sich durch die verankerte Base am Oligo(dT)-Ende voneinander unterscheiden. Um degenerierte Primer handelt es sich, da die Basen nach der Verankerungsbasis aus einem Gemisch der drei Basen A, G und C bestehen. Für die cDNA-Synthese wurden in einem 40 μ l Ansatz zu 3000 ng RNA 5x Erst-Strang Puffer, 2,5 mM DTT, 2 mM dNTP und 0,2 μ g Hexamer-Primer gegeben und auf 39,5 μ l mit DEPC-Wasser aufgefüllt.

Es folgte 10 min Denaturierung der mRNA bei 70°C im Thermoblock. Anschließend kam der Ansatz für 3 min auf Eis. Die Erststrangsynthese beginnt nach der Zugabe von 0,5 μ l Reverse Transkriptase bei 42°C und ist nach einer Stunde abgeschlossen.

Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70°C für 15 min bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

2.1.3.3 Amplifizierung von AP-2 α A und AP-2 α B

Eine Semiquantitative RT-PCR mit RNA verschiedener Zelllinien wurde durchgeführt, um die verschiedenen Expressionsprofile von AP-2 α A und AP-2 α B sensitiver darzustellen.

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) durchgeführt. Die Reaktionsansätze für die PCR-Verfahren hatten jeweils ein Volumen von 50 μ l.

Da die Amplifikation von AP-2 α A und AP-2 α B unter Standardbedingungen nicht gelang, kam Taq DNA Polymerase und Q-Solution (Qiagen) zum Einsatz. Dabei nimmt Q-Solution Einfluss auf das Schmelzverhalten der DNA. Zu 5 μ l 10x Qiagen PCR Puffer, 10 μ l 5x Q-Solution und 20 mM dNTP Mix wurden jeweils die entsprechenden 3`-und 5`-Primer zur Amplifizierung von AP-2 α A und AP-2 α B hinzugefügt. Danach wurde 2,5 Units Taq-DNA Polymerase zum Ansatz gegeben und das Volumen unter Berücksichtigung der noch fehlenden cDNA mit HPLC-Wasser auf 45 μ l aufgefüllt. Die Zugabe von 5 μ l cDNA erfolgte nach einem Hotstart bei 85°C.

Die Denaturierung der DNA wird bei 94°C für 45 sec durchgeführt. Die Bindung der Primer an die cDNA fand, nach mehrfacher Austestung, bei einer Annealing-Temperatur von 58°C bei der Amplifikation von AP-2 α A und von 62°C bei der Amplifikation von AP-2 α B statt. Diese Temperaturen wurden jeweils für 1 min 30 sec gehalten.

Die Elongation erfolgte bei 72°C für 2 min. Die Schritte ab der Denaturierung wurden in 40 Zyklen wiederholt, wobei jeweils nach dem 25., 30., 35. und 40. Zyklus nach Abschluss der Elongations-Phase je 10 μ l der Reaktion entnommen wurden.

2.1.3.4 Semiquantitative PCR

Zum Vergleich wurde die cDNA einer GAPDH-PCR unterworfen. Die Amplifikation von GAPDH sollte, da GAPDH ein sogenanntes Haushaltsgen darstellt, stets möglich sein. Falls keine Amplifikation möglich ist, so muss von Inhibitoren, Verunreinigungen oder von zu geringen DNA-Mengen ausgegangen werden. Die Amplifikation wurde mit Taq-Polymerase und den spezifischen GAPDH-Primern durchgeführt. Dabei wurde die Denaturierungstemperatur bei 96°C für 1 min, die Annealing-Temperatur bei 54°C für 1 min und die Elongations-Temperatur bei 72°C für 20 sec festgesetzt.

Wie auch schon bei den AP-2 α -PCRs wurde nach dem 20., 25., 30. und 35. Zyklus je 10 μ l entnommen.

Um Kontaminationen und falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, wurden bei jeder Versuchsreihe eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgemessen. Für die Kontrollansätze galten die gleichen Bedingungen und Reagenzien wie für die PCR-Ansätze der übrigen Zelllinien. Die Negativkontrolle bestand bei allen PCRs aus HPLC-Wasser. Die Positivkontrolle bestand aus cDNA von der Zelllinie SBCL2, die wiederholt bei der Amplifikation von AP-2 α A, AP-2 α B und GAPDH positiv war.

2.1.3.5 Detektion der PCR-Produkte durch Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese handelt es sich um ein Verfahren, Nukleinsäure-Gemische auf Grund ihrer Größe zu trennen. Die durch ihre Phosphatgruppen negative Gesamtladung von Nukleinsäuren lassen sie bei angelegter Spannung in einem elektrischen Feld zur Anode wandern, wobei die Geschwindigkeit eines DNA-Fragments proportional zum Logarithmus seiner Molmasse ist. Je höher prozentig das Gel ist, desto besser werden kleine Fragmente aufgetrennt. Daher wählt man die Gelkonzentration entsprechend der Länge der zu erwartenden Fragmente. Die Proben der GAPDH-PCR wurden demnach auf 2%-igen Agarosegelen auf getrennt, die Proben der AP-2 α -PCR auf 1%-igen Agarosegelen.

Die berechnete Agarose-Menge in Gramm wurde in 1x TBE-Puffer eingewogen und unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen des noch flüssigen Gels auf ca. 60°C wird das Gel in eine Gel-Kammer (Easy Cast, AGS) gegossen und der Kamm für die Aussparung von Gel-Taschen gesetzt. Nach dem Erstarren konnte das Gel beladen werden. Um während des Gellaufs die Lauf-Geschwindigkeit abzuschätzen, wurden die Proben vor dem Laden des Gels in 1x Ladepuffer verdünnt. Der verwendete Ladepuffer enthielt die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol. Dieses verhält sich im Agarosegel beim Gellauf wie ein Fragment einer Länge von 4 kb, Bromphenolblau wie ein

Fragment einer Länge von 300 bp. Zur Abschätzung der Größe und Menge der Nukleinsäure-Fragmente wurden Marker, die ebenfalls in 1x Ladebuffer verdünnt wurden, mit auf das Gel aufgetragen. Bei den mit GAPDH- und AP-2 α B-Proben beladenen Gelen wurde ein 100 bp Leiter (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas) verwendet. Bei den Gelen mit den AP-2 α A-Proben wurde ein 1 kb Leiter (1 kb DNA Ladder, GIBCO BRL®, Life Technologies) benützt.

Der Gel-Lauf findet je nach Agarose-Konzentration unter einer Spannung zwischen 100-120 Volt statt, als Lauf-Puffer diente 1x TBE.

Der Nachweis der DNA erfolgte nach dem Gel-Lauf mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid-Lösung in 1x TBE.

Nach einer 20-30 minütigen Entwicklungszeit, in der das Ethidiumbromid an die DNA binden konnte, konnte man das Ergebnis unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar machen. Mittels einer Videokamera konnte das Ergebnis dokumentiert werden.

Die PCR-Produkte des Haushaltsgens GAPDH zeigten dabei eine Bande bei 247 bp. Das PCR-Produkt von AP-2 α A hatte eine Größe von 1333 bp, wohingegen das PCR-Teilprodukt von AP-2 α B eine Größe von 223 bp ergab.

2.1.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um einzelne DNA-Fragmente aus einem Agarose-Gel zu isolieren, muss man eine Gelelution durchführen. Für die Elution der AP-2 α A DNA aus dem Agarosegel wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) benützt. Dazu musste zunächst die entsprechende Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Dies geschah unter einer Handlampe bei 366 nm. Die Transilluminator-Lampe wäre mit 312 nm zu energiereich und könnte somit zur Zerstörung der DNA führen.

Das so ausgeschnittene Gelstück wurde nach Gewichtsermittlung unter Zugabe von 3 Volumen Puffer QG für 10 min bei 50°C gelöst.

Um die DNA an die Membran der QIAquick-Säule zu binden, wurde das verflüssigte Gelstück über die Säule gegeben und bei 13000 rpm in der

Mikrozentrifuge für 1 min zentrifugiert. Die Durchlauf-Fraktion wurde verworfen. Durch Zugabe von 750 μ l PE-Puffer wurde die gebundene DNA gewaschen und erneut zentrifugiert.

Um die DNA von der Membran abzulösen, wurde sie mit 30 μ l 10 mM Tris-HCL pH 8,0 eluiert. Zur Mengen- und Qualitätsabschätzung der Gelelution wurde ein geringer Teil der Eluate (5 μ l) auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 2.1.3.5).

2.1.4 Klonierung von AP-2 α A cDNA in Plasmide

Plasmidvektoren sind zirkuläre doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich in Bakterien vermehren können. Sie weisen einen Polylinker auf, der über mehrere Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme verfügt. Wird ein Vektor mit einem dieser Restriktionsenzymen geschnitten, entstehen zwei freie Vektorenden, mit denen ein zu klonierendes DNA-Fragment durch Ligation verbunden werden kann. Bei diesem Vorgang kann nur ein einziges doppelsträngiges DNA-Fragment in den Vektor aufgenommen werden. Die so erstellten Rekombinanten werden dann in Bakterienzellen vermehrt, so dass jede Bakterienkolonie einen Klon repräsentiert, der eine bestimmte Rekombinante aufweist.

2.1.4.1 Verwendete Vektoren und Klonierungsschema von AP-2 α A cDNA

Genotypisierung der verwendeten Bakterienstämme:

INV α F': *F'end A1 recA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 λ ⁻*
 TOP10F': *F' {lacI^q Tn10(Tet^R)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galJ galK rpsL endA1 nupG*

Vektoren:

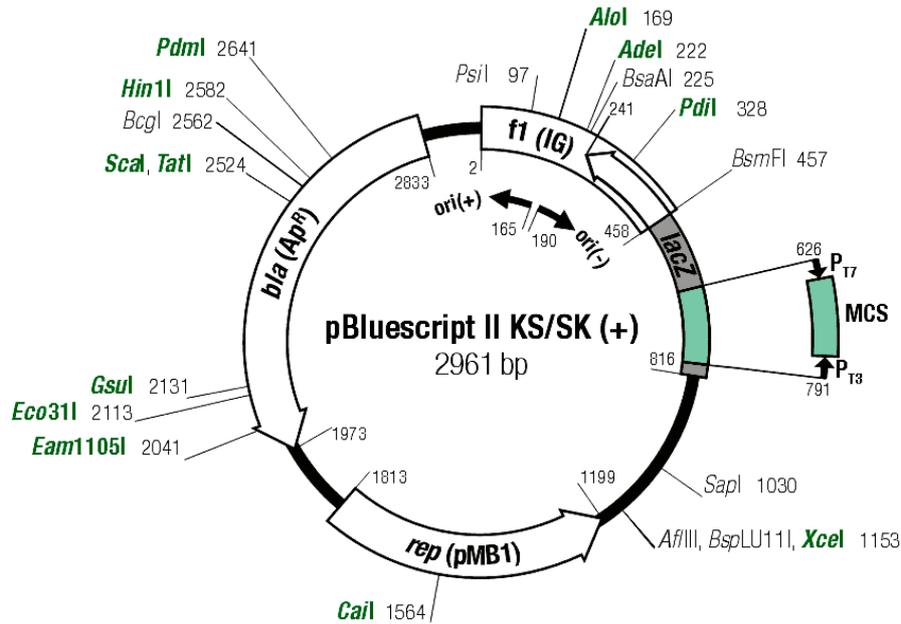


Abb. 7: Vektor *pBluescript II SK+*. Darstellung des zirkulären Vektors mit Schnittstellen

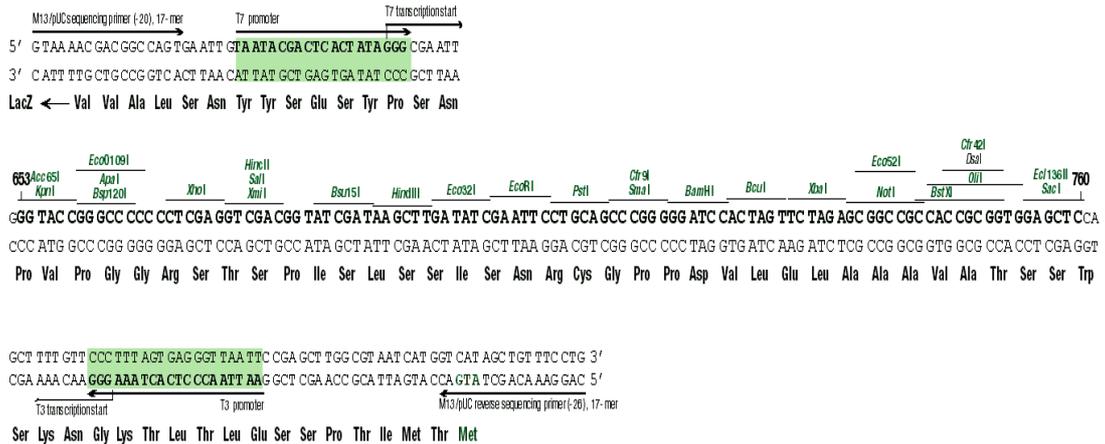


Abb. 8: Vektor *pBluescript II SK+*. Darstellung der Sequenz des Polylinkers mit Schnittstellen

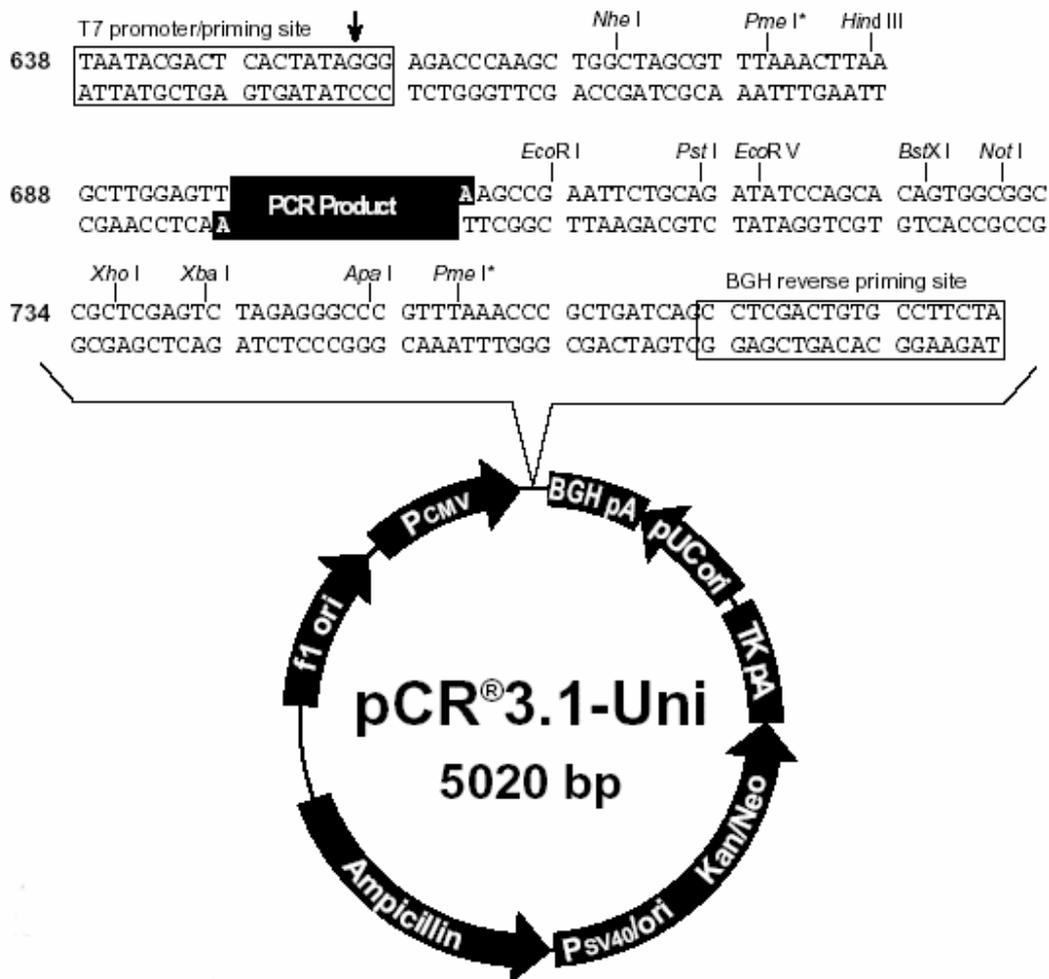


Abb. 9: TA-Vektor *pCR[®]3.1-Uni* von Invitrogen. Darstellung des zirkulären Vektors und der Sequenz des Polylinkers mit Schnittstellen

2.1.4.2 Klonierung von AP-2αA in pBluescript II SK Vektor

Die cDNA von AP-2αA wurde zuerst mit Hilfe eines selbst hergestellten T/A-Vektors und dem TA-Cloning Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande) kloniert. Dieser Vektor wurde nach dem Protokoll von Hadjeb und Berkowitz (1996) wie folgt hergestellt:

- 1.) Damit der Vektor nicht mit sich selbst ligiert werden konnte, wurde er mit einem Tymidin-Überhang versehen. Dafür mussten die Vektoren zunächst linearisiert werden: 10 µg Vektor pBluescript[®] II SK (Statagene, Heidelberg) wurde für zwei Stunden bei 37°C mit 20 Units Eco32I (EcoRV) in Puffer R (MBI, Fermentas, St.Leon-Rot) inkubiert.

- 2.) Anschließend wurden die Vektoren mit einem T-Überhang versehen. In einem 100 µl-Ansatz wurde der linearisierte Vektor mit 2 mM dTTP und 5 Units Taq Polymerase (Pharmacia) in 10 mM Tris.HCl (pH 9,0), 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl für 2 Stunden bei 72°C inkubiert.
- 3.) Daraufhin folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit einer anschließenden Ethanol-Fällung mit 3 M NaAcetat. Die Vektor-DNA wurde in 44 µl H₂O resuspendiert.
- 4.) Um nun Vektoren ohne Überhang ausselektieren zu können, wurde die Vektor-DNA einer Eigenligation unterworfen. Vektoren ohne Überhang würden dabei mit sich selbst ligieren. Dazu wurde die Vektor-DNA in einem 50 µl-Ansatz zusammen mit 4 Units T4 DNA Ligase (Invitrogen, Leek, Niederlande) in 6 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 7 mM β-Mercaptoethanol, 100 µM ATP, 2 mM DTT und 1 mM Spermidin über Nacht bei 14°C inkubiert.
- 5.) Anschließend wurde das Produkt zur Abschätzung auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Linearisierte Vektoren mit Überhang (ca. 3 kb) konnten von den zirkularisierten Vektoren (diese laufen im Gel sehr langsam) und dem restlichen unverdauten Vektor (supercoiled läuft sehr schnell im Gel bei ca. 2 kb) über eine Gelelektion separiert werden.

Um die cDNA von AP-2αA mit möglichst hoher Effizienz in die linearisierten Vektoren zu klonieren, mussten an die 3`-Enden der cDNA ein Adenin-Überhang angehängt werden. Dazu wurde die cDNA mit Taq-Polymerase, PCR Puffer und 2 mM dATP in einem 100 µl-Ansatz für 2 Stunden bei 72°C inkubiert. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion und einer Ethanol-Fällung mit 3 M NaAcetat wurde das PCR-Produkt in 10 µl H₂O resuspendiert und auf ein 1%-iges Agarosegel zur Abschätzung der Menge aufgetragen.

Zur Ligation der cDNA von AP-2αA mit dem Vektor wurde 6 µl PCR-Produktes (aus SBCL2 amplifiziert) zusammen mit 0,6 µl eluiertem Vektor und 4 Units T4 DNA Ligase (Invitrogen, Leek, Niederlande) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der Ligation wurden sowohl die Ligations-Ansätze als auch reine Vektor-DNA transformiert.

Die Hitzeschock-Transformation in kompetente INVαF' E.Coli Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

- 1.) Mehrere Aliquots hitzeschockkompetenter Zellen wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol für kurze Zeit auf Eis inkubiert.
- 2.) Danach wurde die DNA hinzugefügt (2 µl Vektor allein und 2 µl Vektor+Insert) und für weitere 30 min auf Eis inkubiert.
- 3.) Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock für genau 30 sec bei 42°C im Thermoblock ausgesetzt und für 2 min in Eis wieder abgekühlt.
- 4.) Es folgte eine Inkubationsphase nach Zugabe von je 250 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM Glucose, 10 mM MgCl₂) für 1 Stunde im Schüttelinkubator bei 225 rpm und bei 37°C. In dieser Zeit erhielten die Bakterien die Möglichkeit, die Ampicillin-Resistenz zu entwickeln, die ihnen durch Transfektion mit pBluescript II SK verliehen wurde.
- 5.) Die Ansätze wurden auf Agarplatten mit LB-Medium (1% NaCl, 1% Tryptone {Applichem}, 0,5% Hefe-Extrakt {Applichem}, 1,5% Agar und 50 µg/ml Ampicillin) in je 50 µl und 200 µl ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Da die Klonierung in pBluescript[®] II SK Vektor (Stratagene, Heidelberg) nicht erfolgreich war, wurde die Klonierung in pCR[®] 3.1 Vektor (Invitrogen, Niederlande) versucht.

2.1.4.3 Klonierung von AP-2αA in pCR[®] 3.1-Uni Vektor

Bei der Ligation in den Vektor pCR 3.1- Uni mit dem eukaryontischen TA Cloning Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande) nutzte man aus, dass die Taq-Polymerase während der PCR meist ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende der PCR-Produkte anhängt. Der linearisierte Vektor des Kits weist einen einzelnen Desoxythymidin-Rest am 3'-Ende auf. Um die direkte Ligation des PCR-Produktes zu erreichen, musste der Forward PCR Primer vor der

Amplifikation phosphoryliert werden. Der phosphorylierte Forward Primer und der unphosphorylierte Reverse Primer ergaben bei der Amplifikation ein PCR-Produkt, das nur am Forward 5'-Ende phosphoryliert war. Eine Ligation war nur dann möglich, wenn das Insert in der korrekten Orientierung vorliegt.

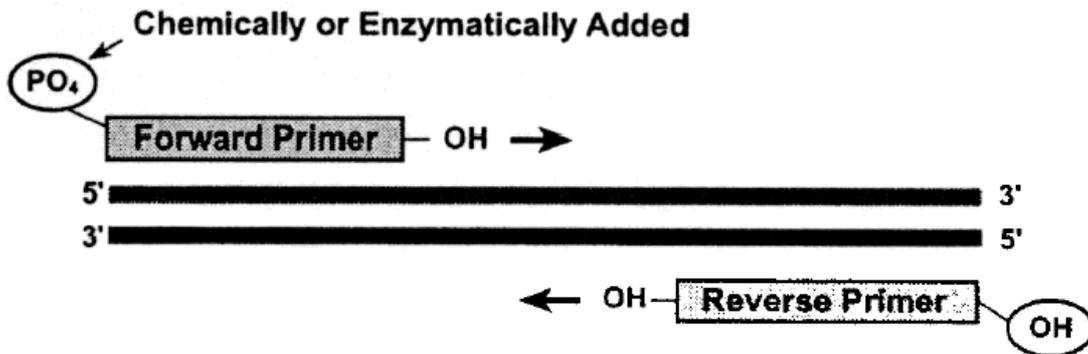


Abb. 10: Schema der PCR mit phosphoryliertem Forward Primer

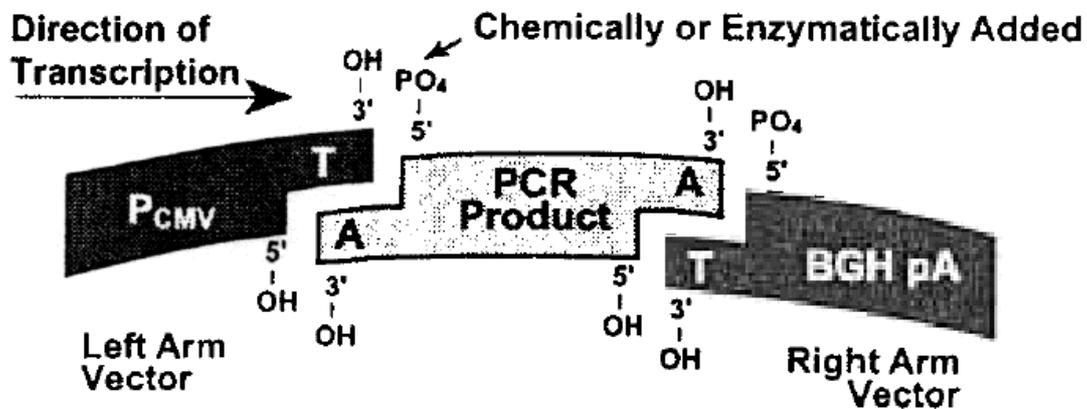


Abb. 11: Ligations-Reaktion mit dem selektiv phosphorylierten PCR Produkt

Zur Phosphorylierung des Forward PCR Primers wurde in einem 10 µl-Ansatz 100 pmol/µl AP-2αA-3'-Primer mit 10x Kinase-Puffer (500 mM Tris-HCl, pH7,5; 100 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 1 mM Spermidin), 10 mM ATP und TA Polynucleotid Kinase (10 Units/µl) bei 37°C für 40 min inkubiert.

Die Kinase wurde danach bei 94°C für 5 min inaktiviert. Der so hergestellte Primer wurde anschließend sofort in die PCR mit Q-Solution eingesetzt.

Nach 35 Zyklen pausierte man die PCR bei 72°C, um 0,5 µl Taq-Polymerase (Amersham) hinzuzufügen.

Durch eine anschließende 10 minütige Inkubation bei 72°C wurde sichergestellt, dass die gesamte DNA mit einem 3'-A-Überhang versehen war. Aus dieser Reaktion wurde ebenfalls ein geringer Teil entnommen, um die Effizienz abzuschätzen.

In die Ligation wurden ca. 15 ng des PCR-Produktes eingesetzt und über Nacht bei 15°C inkubiert.

Für die Hitzeschock-Transformation wurden One Shot® TOP10F'Zellen eingesetzt. Die Transformation verlief wie unter Kapitel 2.1.4.2. beschrieben.

Auf Agarplatten mit Ampicillin wurde je 20 µl, 50 µl und 200 µl ausplattiert.

2.1.5 Gewinnung von Plasmid-DNA

In dieser Arbeit kamen zur Gewinnung von Plasmid-DNA die Midipräparation zur Isolierung größerer Mengen DNA und die Minipräparation zur Isolierung kleinerer Mengen DNA zum Einsatz. Da nur die Klonierung von AP-2αA in den pCR 3.1 Vektor zum Erfolg geführt hat, wurden Mini- und Midipräparationen nur mit Klonen dieses Versuches durchgeführt. Beide Methoden beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979).

2.1.5.1 Minipräparation

Für die Analyse gepickter Klone auf Inserts dienen Minipräparationen als Ausgangsmaterial. Zu diesem Zweck ist die Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA ausreichend. Mit je einer gepickten Kolonie der transformierten Zellen wurden 1 ml LB-Ampicillin-Medium beimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bebrütet. Um das Medium am nächsten Tag abnehmen zu können, wurden die Eppendorf-Tubes 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert, das Pellet wurde anschließend in 150 µl Lyse-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) resuspendiert.

Durch Zugabe von 300 µl einer 0,2 M NaOH-1%SDS-Lösung wurde die Bakterien-Suspension während einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch 225 µl einer 3 M K-Acetat in 5% Essigsäure-Lösung für 15 min auf Eis. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 3 min wurde der Überstand mit 400 µl Isopropanol gefällt. Das Pellet erhielt man nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur durch erneute Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm und wurde nach dem Trocknen in 40 µl TE-Puffer pH 8 mit 0,2% RNase aufgenommen.

2.1.5.2 Midipräparation

Mit einer gepickten Kolonie der transformierten Zellen wurden 200 ml LB-Ampicillin-Medium beimpft und über Nacht bebrütet. Die Midipräparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, bei dem die Bakterienzelle durch Zugabe von NaOH/ SDS aufgeschlossen wurde. Die 200 ml der Über-Nacht-Kultur wurden auf vier 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und für 5 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in je 1 ml Lyse-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) resuspendiert und in ein gemeinsames Gefäß überführt. Nach Zugabe von 10 ml einer 0,2 M NaOH-1% SDS-Lösung und vorsichtigem Mischen wurden die Bakterien während einer 5 minütigen Inkubation auf Eis lysiert.

Zur Neutralisation wurden 7,5 ml einer 3 M K-Acetat in Essigsäure-Lösung zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt diente der Denaturierung der Proteine. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 6000 rpm wurden die Überstände durch ein Gaze-Netz filtriert, um nicht-pelletierte Proteine und Zell-Bestandteile zurück zu halten. Anschließend wurde mit 0,6 Vol. Isopropanol präzipitiert. Durch das Zentrifugieren bei 4°C und 6000 rpm entstanden Pellets, die sich aus genomischer und Plasmid-DNA zusammensetzten. Die getrockneten Pellets wurden danach in je 2 ml TE-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Fällung mit 2 ml 4 M LiCl-Lösung, um genomische DNA und hochmolekulare RNA von der Plasmid-DNA abzutrennen.

Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis und einer anschließenden Zentrifugation mit 6000 rpm bei 4°C, lagen die verschiedenen Bestandteile getrennt vor. Diese sind genomische DNA und RNA als Pellet und die Plasmid-DNA im Überstand. Die Überstände wurden nun bei -20°C für mindestens 15 min in 10 ml 100%-igem Ethanol gefällt. Nach der Pelletierung wurde einmal mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert.

Nach dem Lufttrocknen der Pellets wurden sie in je 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Durch die Verunreinigungen der Plasmid-Präparationen mit nieder-molekularer RNA war ein RNase-Verdau nötig. Hierfür wurden je 5 µl RNase (10 Units/µl, Boehringer Mannheim) mit den Ansätzen für 30 min bei 37°C inkubiert.

Durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat war es nach der Phenol-Chloroform-Extraktion möglich, die Plasmid-DNA mit 0,6 Vol. Isopropanol zu fällen. Die Inkubationszeit nach Zugabe von Isopropanol betrug 5 min bei Raumtemperatur, anschließend wurde 3 min bei 13000 rpm in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert.

Zuletzt wurden die Pellets einmal in 70%-igem Ethanol gewaschen, repelletiert und nach dem Trocknen bei 37°C in je 300 µl TE-Puffer gelöst. Die Bestimmung der Konzentrationen von der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch, wie es unter Kapitel 2.1.1.3. beschrieben wurde.

2.1.5.3 Analytischer Restriktionsverdau

Um die Plasmid-DNA zu schneiden, wurden Restriktionsenzyme verwendet. Im Gegensatz zu anderen DNasen schneiden Restriktionsenzyme sequenzspezifisch. Die hier verwendeten Restriktionsenzyme zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Erkennungsstelle auf der DNA identisch mit der Schnittstelle ist. Restriktionsenzyme spalten ausschließlich doppelsträngige DNA, je nach Enzym entstehen dabei entweder glatte Enden (z.B. Eco32I) oder überhängende Enden (z.B. EcoRI). Die Aktivität der Restriktionsenzyme wird in Units angegeben, wobei 1 Unit Enzym unter optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg DNA in 1 Stunde schneiden kann.

Um zu überprüfen, ob die Plasmid-DNA das korrekte Insert enthält, wurden mehrere Restriktionsverdau zur Analyse durchgeführt. Zum analytischen Verdau sind geringe Mengen an DNA ausreichend. Da nur die Klonierung in den pCR 3.1[®] Vektor ausreichend gelang und man bei diesem Verfahren, wie unter Kapitel 2.1.4.3. beschrieben wird, das gesamte, nicht mehr aufgereinigte PCR-Produkt eingesetzt hatte, war mit einer großen Menge an nicht vollständigen Inserts oder Primerresten zu rechnen.

Alle verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer stammten von MBI Frementas, ST.Leon-Rot. Zunächst wurden für einen analytischen Verdau zur Überprüfung der Plasmidpräparationen des Vektors pCR 3.1 über die Minipräparation die Enzyme HindIII und Eco32I (EcoRV) verwendet. Diese beiden Enzyme weisen beide je eine Schnittstelle im Vektor pCR 3.1 auf, schneiden jedoch nicht im Insert. Durch den Verdau mit diesen beiden Enzymen wurde der Vektor, der nach der Plasmidpräparation zirkularisiert vorlag, linearisiert und das Insert herausgeschnitten. Die einzelnen Verdau der verschiedenen Minipräparationen wurden zur Überprüfung der Größen im Agarosegel aufgetragen.

In einem 20 µl-Ansatz wurden 5 µl Plasmid-DNA mit 10 Units Eco32I und 10 Units HindIII unter Zugabe von 2 µl Puffer R⁺ (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 mg/ml BSA) verdaut. Die Inkubation erfolgte über 2 Stunden bei 37°C im Thermoblock, die Auswertung in einem 1%-igem Agarosegel. Dabei wurde der gesamte Reaktionsansatz in das Gel geladen. Minipräparationen, die nach dem ersten Verdau die richtigen Größen zeigten, wurden mittels anschließenden Verdau-Reaktionen unter Verwendung weiterer Enzyme auf das erwünschte Insert untersucht.

2.1.6 Sequenzierung

Klone die sich beim Screening als differentiell bestätigt haben, wurden mit Hilfe des BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kits (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) sequenziert. In die Sequenzreaktion in einem 20 µl-Ansatz (Strangabbruchverfahren nach Sanger et al.,1977) wurden je 90 ng DNA, 3,2

pM AP-2 α A-Forward-, AP-2 α A-Reverse-, T7 Forward- und BGH Reverse-Primer und 4 μ l des ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix eingesetzt (beinhaltet das Enzym AmpliTaq® und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide). Es wurden 25 Zyklen durchgeführt mit 96°C für 30 sec, 50°C für 15 sec und 60°C für 4 min, wobei die Aufheiz- und Abkühlphasen auf 0,9°C pro Sekunde eingestellt wurden.

Anschließend wurde die DNA über Centri-Sep-Columns (Princeton Separations, USA) gereinigt und in einer Speed Vac® Plus (SC 110A Savent) getrocknet.

Der letzte Schritt, die Sequenzierung der DNA in einem ABI 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), wurde freundlicherweise von der Abteilung medizinische Virologie durchgeführt. Die sich daraus ergebenden Sequenzen wurden mit der bekannten Sequenz von AP-2 α A in der Genbank verglichen.

2.2 Proteinanalytische Methoden

2.2.1 Western-Blot Analyse

Für den Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran kam für diese Arbeit die Technik des Western-Blots zur Anwendung. Als Positiv-Kontrolle dienten in allen Western-Blots nukleäre Extrakte von HELA-Zellen (Santa Cruz, CA, USA).

2.2.1.1 Herstellung von Zellysaten

Zellysate aller vorhandenen Zelllinien wurden nach Inkubation der Zellen für 30 min in 1,2 ml Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (PBS mit 0,5% Triton X-100, 5 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 10 μ M Pepstatin A, 10 μ M Leupeptin, 25 μ g/ml Aprotinin) hergestellt.

Die Zellysate wurden von den Kernen durch Zentrifugation bei 12000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge für 20 min bei 4°C abgetrennt.

Die Konzentration der so gewonnenen Proteine wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays (Precision Protein Standards, Bio-Rad, München) im Spektrometer (Genesis 5, Spectronic) bestimmt.

Proteine weisen dabei ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 595 nm auf. Um abzuschätzen zu können, wie hoch der Proteingehalt in den einzelnen Lysaten war, mussten immer Standardwerte gemessen werden, die eine Eichgerade ergaben. In den Western-Blot wurden jeweils 30 µg Protein eingesetzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysate bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Herstellung von nukleären Extrakten

Die Zellen wurden zunächst mit 300µl eines 0,5%-igem Nonidet p-40 Puffer (10 mM HEPES pH 7,9; 15 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1µg/ml Pepstatin A; 1µg/ml Aprotinin; 1µg/ml Leupeptin; 1 mM PMSF) für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 10000 rpm für 5 min bei 4°C wurden die Pellets wieder mit 300 µl resuspendiert (20 mM EPES pH 7,9; 0,4 mM NaCl; 10 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1µg/ml Pepstatin A; 1µg/ml Aprotinin; 1µg/ml Leupeptin; 1 mM PMSF).

2.2.1.3 Western-Blot Analyse mit AP-2αA spezifischen Antikörpern

Sowohl Zellysate, als auch nukleäre Extrakte wurden auf 10%-ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen, wie von Laemmli beschrieben (Laemmli et al., 1970). Die Proteine trennten sich in diesem Polyacrylamidgel nach ihrer Größe auf. Nach der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Proteine auf PVDF-Membranen (PVDF Western Blotting Membran, Boehringer, Mannheim) über 3 Stunden mit Hilfe eines Tris-Glycin-Puffers transferiert, der 20% Methanol und 0,04% SDS enthielt (Trans Blot Cell Apparat, Bio-Rad, München). Anschließend wurden die Blots in einer 10% Milchpulver-0,1% Tween 20-PBS-Lösung für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur blockiert.

Zur Austestung kamen zwei verschiedene AP-2αA spezifischen Antikörper, C-18 polyklonaler Kaninchen Antikörper und C-17 polyklonaler Ziege Antikörper (beide Santa Cruz, CA, USA). Da sich der C-18 Antikörper, der gegen das Peptid, das in Verbindung mit den Aminosäuren 420-437 am Carboxy-Terminus

steht, gerichtet ist, als effektiver erwies, wird im folgendem nur dieser weiter beschrieben.

Über Nacht erfolgte dann die Inkubation bei 4°C mit dem Anti-AP-2αA Antikörper (Polyklonaler Kaninchen Antikörper, C-18, Santa Cruz, CA, USA). Es wurden Konzentrationen von 1:200 bis 1:500 ausgetestet.

Am nächsten Tag wurden die Blots nach dreimaligem Waschen in PBS mit dem biotinierten Sekundärantikörper, einem Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper (DAKO, Hamburg), für 1 Stunde und 30 min inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift folgte die Inkubation mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase in einer Verdünnung von 1:1000 ebenfalls für 1 Stunde 30 min. Für die Detektion wurde CDP-StarTM als ein chemilumineszentes Substrat benutzt, wie es vom Hersteller empfohlen wird (Roche, Mannheim). Durch Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms (Kodak X-OMAT AR, XAR-5) für einige Sekunden bis Minuten, wurden die Signale sichtbar gemacht.

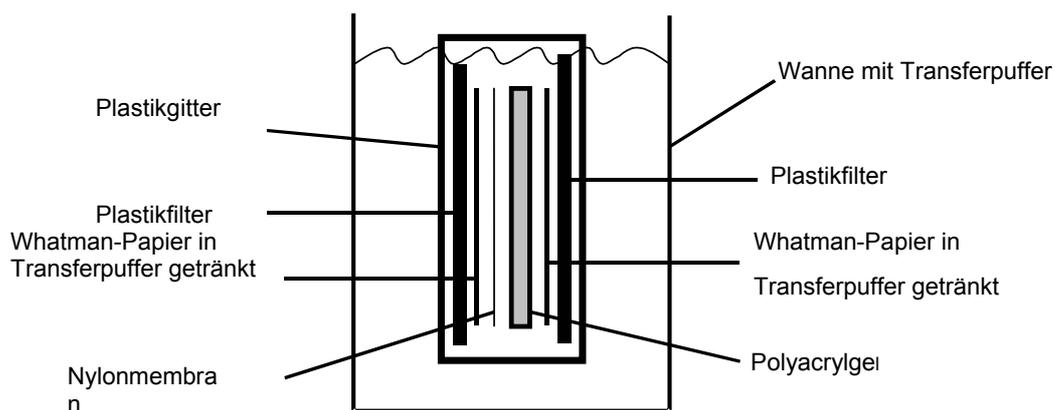


Abb. 12: Aufbau des Western-Blots zum Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf einen Nylonmembran

2.2.1.4 Western-Blot Analyse mit AP-2αA und AP-2αB spezifischen Antikörpern

Für die Austestung eines weiteren Antikörpers, der sowohl AP-2αA als auch AP-2αB erkennen sollte, wurden nur nukleäre Extrakte eingesetzt. Dieser Antikörper sollte auf Grund seiner Bindungsstelle an ein rekombinantes Protein binden, dass in Verbindung mit den Aminosäuren 130-209 innerhalb der

internen Region von beiden Formen von AP-2 α steht. Das Vorgehen war fast identisch, mit dem wie unter Kapitel 2.2.1.3 beschrieben wird, aber mit folgenden Unterschieden. Die Blockierung der Blots erfolgte in 10% Milchpulver-0,1% Tween 20-PBS-Lösung für 2 Stunden 30 min.

Die Blots wurden danach mit dem Erstantikörper (Polyklonaler Kaninchen Antikörper, H-79, Santa Cruz, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:200 über Nacht inkubiert. Der Sekundärantikörper war ebenfalls ein Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper (DAKO, Hamburg). Das weitere Vorgehen entsprach der unter Kapitel 2.2.1.3. beschriebenen Vorgehensweise.

2.2.1.5 Western-Blot mit β -Actin Antikörpern

Zum Vergleich wurden die gesamten Zellysate und nukleären Extrakte mit einem weiteren Antikörper gegen β -Actin behandelt. Jedes Lysat und nukleäres Extrakt sollte sich mit β -Actin anfärben lassen, da β -Actin ähnlich wie GAPDH ein Haushaltsgen darstellt. Als β -Actin-Antikörper wurden zwei verschiedene Antikörper ausgetestet, ein I-19 polyklonaler Ziege Antikörper und ein C-2 monoklonaler Maus Antikörper (beide Santa Cruz, USA). Da sich der monoklonale Maus Antikörper als der Effizientere erwies, wird nachfolgend nur dieser Antikörper weiter betrachtet. Der monoklonale Antikörper hatte zusätzlich den Vorteil, dass er parallel zu den AP-2 α Antikörpern eingesetzt werden konnte, d.h. man musste die Blots nicht erst abwaschen, sondern man konnte gleichzeitig mit AP-2 α und β -Actin Antikörpern hybridisieren. Das hatte den Vorteil, dass kaum Protein abgewaschen wurde und die Expressionen besser vergleichbar waren.

Zusätzlich zu dem Verfahren, wie unter Kapitel 2.2.1.3. beschrieben, wurde zur über Nachtinkubation der monoklonale C-2 β -Actin Antikörper in einer Verdünnung von 1.100 dazugegeben. Der entsprechende Sekundärantikörper war ein Ziege Anti-Maus-Antikörper (DAKO, Hamburg).

2.2.1.6 Semiquantitative Auswertung des Western-Blots

Die Auswertung der Western-Blots erfolgte durch den Vergleich der Expressionen von AP-2 α und β -Actin. Dazu wurden die Photographien der Blots digitalisiert und mit Hilfe des Computerprogramms Molecular Analyst[®] /PC UV Gel Documentation (BIO-RAD, CA, USA) ausgewertet.

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Immunhistologie

Mit Hilfe der Immunhistologie ist es möglich die Lokalisation eines Genproduktes innerhalb des Gewebes, den Zelltyp und die Lokalisation innerhalb der Zelle zu bestimmen.

Bei dem Nachweis von AP-2 α A in verschiedenen Geweben war vor allem die Lokalisation innerhalb der Zellen und die Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Geweben interessant.

2.3.1.1 Verwendete Schnitte und Schneidetechnik

Für alle immunhistologischen Färbungen wurden 5 μ m vertikale in Formalin fixierte Paraffinschnitte verwendet. Die Gewebeproben wurden zunächst in Hämatoxylin und Eosin gefärbt und histologisch typisiert. Bei den Schnitten handelte es sich jeweils um fünf melanozytäre Nävi, superfiziell spreitende Melanome, noduläre maligne Melanome und Metastasen verschiedener Art. Da die Schnitte verschiedenen Vorbehandlungen unterzogen werden mussten, war es nötig, Polylysin- und Silan-beschichtete Objektträger zu verwenden. Zu Beginn der immunhistologischen Färbungen wurden alle Schnitte in Xylol und Ethanol dehydriert.

2.3.1.2 Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten

Nach dem Entparaffinisierungsvorgang wurden die Schnitte kurz in PBS gewaschen, bevor sie für 3 min in einem Dampfkochtopf mit 10 mM Citrat-Puffer (pH 6.0) gekocht wurden.

Nach dem Abkühlen und nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 5 min mit einer 5%-igen Wasserstoffperoxyd-Lösung inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren.

Anschließend wurde zwei Mal für 3 min mit destilliertem Wasser und zwei Mal für 5 min mit PBS gewaschen. Um nichtspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde für 30 min mit einem 1,5%-igen normalem Ziegen-Serum blockiert.

Dann wurden die Schnitte für eine weitere Stunde mit dem Erstantikörper C-18 (Santa Cruz, CA, USA) mit einer Verdünnung von 1:2500 inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS, folgte eine Inkubation für 30 min mit einer 1:300 Verdünnung eines biotinierten Anti-Kaninchen Antikörpers (DAKO, Hamburg).

Anschließend wurden die Schnitte mit dem Vectastain ABC-AP System (Vektor, Burlingame, USA) behandelt, mit Neufuchsin entwickelt und mit Heamatoxylin gegengefärbt.

Als Negativkontrolle wurden alle Schnitte nur mit dem Zweitantikörper inkubiert und anschließend wie oben beschrieben detektiert.

2.3.1.3 Austestung der immunhistologischen Färbungen

Neben der Austestung verschiedener Antikörper und Konzentrationen wurden mehrere Vorbehandlungen geprüft. Zuerst wurden verschiedene Antikörper getestet, C-18 und C-17 (beide Santa Cruz, CA, USA), die beide gegen ein Peptid des Carboxy-Terminus von AP-2 α gerichtet sind. Für die Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Konzentrationen des C-18 Antikörpers von 1:1000 bis 1:4000 und des C-17 Antikörpers 1:500 bis 1:3500 variiert. Da man davon ausging, dass sich AP-2 α A meist im Nukleus befand, mussten zusätzlich Verfahren getestet werden, die eine Kernfärbung erlaubten. Dazu wurde die

Vorbehandlung mit Proteinase K, Kochen mit Citratpuffer oder Demaskierlösung im Dampfkochtopf und in der Mikrowelle getestet.

2.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Für die Immunfluoreszenz wurden die Paraffin-Schnitte in Xylol und Ethanol dehydriert und zunächst mit einem polyklonalen Anti-AP-2 α A-Antikörper (C18, Santa Cruz, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:2500 inkubiert.

Anschließend wurden sie für 1 Stunde mit einer 1:500 Verdünnung eines Esel Anti-Kaninchen Antikörpers gefärbt, der an den Farbstoff Cy5 (Dianova, Hamburg) gekoppelt ist. Um eine bessere morphologische Auflösung der Tumor- und nicht-Tumor-Zellen zu erhalten, wurden die Tumorzellen mit einem gegen Melan A gerichteten Antikörper (Dianova, Hamburg) gefärbt, der wiederum mit einem Esel Anti-Maus Antikörper, gekoppelt an den Farbstoff Cy3 (Dianova, Hamburg), detektiert wurde. Die Kerne wurden mit dem Kernfarbstoff YOPRO (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gefärbt.

Die Schnitte wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops (Leica TCS SP, Leica Microsystems, Bensheim) mit einer 250-fachen Originalvergrößerung analysiert.

2.4 Programme zur Auswertung

Zur Auswertung der Semiquantitativen PCR und der verschiedenen Western-Blots wurde ein Programm von BIO-RAD, Molecular Analyst[®] /PC UV Gel Documentation (Version 1.5) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von AP-2 α auf RNA-Ebene

3.1.1 Amplifikation und Klonierung von AP-2 α A

Mit einer Polymerase-Ketten-Reaktion kann man die DNA-Sequenz von AP-2 α A aus verschiedenen Zelllinien schnell vervielfältigen. Zwei Oligonukleotid-Primern, die bei Bindung an die komplementären Sequenzen der DNA die gesuchte DNA-Region einrahmen, können mit Hilfe der DNA-Polymerase und den vier Desoxynucleotidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP die Synthese neuer DNA-Stränge starten. Dabei sind die neuen DNA-Stränge komplementär zu den einzelnen DNA-Strängen der gesuchten Sequenz von AP-2 α A. Um AP-2 α A zu amplifizieren, wurden die in Kapitel 2.1.3.1 beschriebenen Primer verwendet. Um die direkte Ligation des PCR-Produktes in der korrekten Orientierung in den Vektor pCR 3.1 zu erreichen, musste der Forward PCR Primer vor der Amplifikation phosphoryliert werden.

Dazu wurde der AP-2 α A-5'-Primer zunächst mit 10 mM ATP und T4 Polynucleotid Kinase inkubiert und anschließend in die PCR mit SBCL2 c-DNA eingesetzt.

Nach 35 Zyklen wurde die PCR bei 72°C gestoppt und TAQ-Polymerase (Amersham) für das Anfügen von Adenosin-Überhängen für 10 min dazugefügt. Auch hier wurde ein kleiner Teil des PCR-Produktes mit dem phosphoryliertem 5'-Ende zur Abschätzung der Effizienz auf ein 1%-iges Gel aufgetragen. Dabei zeigte sich eine klare Bande bei 1400 bp.

Der phosphorylierte Forward Primer und der unphosphorylierte Reverse Primer ergab bei der Amplifikation ein PCR-Produkt, das nur am Forward 5'-Ende phosphoryliert war. Dies war notwendig, damit bei der Ligation das Insert in der korrekten Orientierung in den Vektor eingebaut werden konnte.

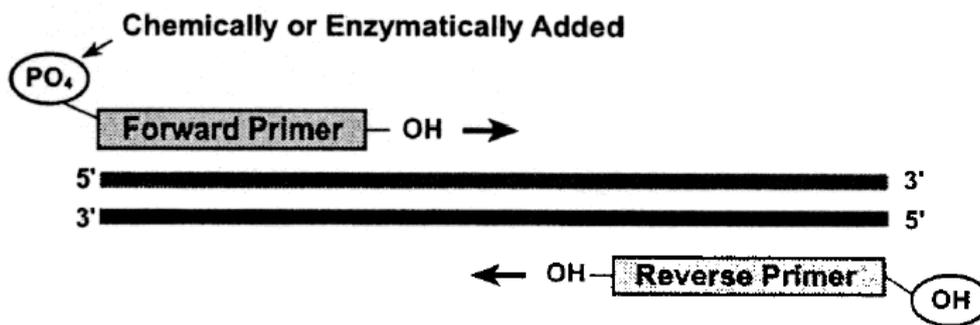


Abb. 13: Schema der PCR mit phosphoryliertem Forward Primer

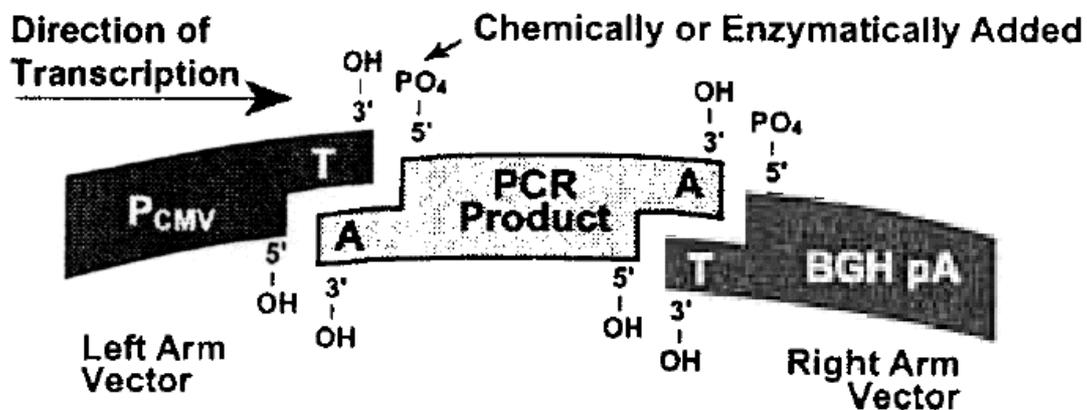


Abb. 14: Ligrations-Reaktion mit dem selektiv phosphorylierten PCR Produkt

Für die Klonierung von AP-2 α A cDNA erfolgte die Ligation in den Vektor pCR 3.1- Uni mit dem eukaryotischen TA Cloning Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande). Mit diesen Ligrationsansätzen wurden One Shot[®] TOP10F' Zellen transformiert. Der Vektor pCR 3.1- Uni weist in seiner linearisierten Form ein einzelnes Desoxythymidin-Rest am 3'-Ende auf. Über den Desoxyadenosin-Überhang des PCR-Produktes am 3'-Ende kann das AP-2 α A PCR-Produkt aus SBCL2 in den Vektor ligiert werden. Um die direkte Ligation des PCR-Produktes in der exakten Orientierung in dem Vektor zu erreichen, war die Phosphorylierung des Forward PCR Primer vor der Amplifikation notwendig, wie oben beschrieben. Für die Ligation wurde ca. 15 ng AP-2 α A-PCR-Produkt eingesetzt. Nach Transformation der Ligrationsprodukte von Vektor und AP-2 α A-PCR-Produkt und als Negativkontrolle Vektor und PCR-Negativ-Kontrolle, wurden wieder je

20 µl, 50 µl und 200 µl auf LB-Medium-Platten aufgebracht und über Nacht inkubiert. Dabei zeigte sich nach Inkubation eine große Anzahl an Kolonien. Die Effizienz der Transformation lag bei $2,11 \times 10^9$ und $3,88 \times 10^9$. Wohingegen der Negativkontrolle keine Kolonien wuchsen.

Für die nun anschließende Untersuchung der Bakterien aus den Transformationen des TA-Klonierungs-Systems wurden aus dem Ansatz mit AP-2αA 36 beliebige Kolonien gepickt und auf das Vorhandensein von Inserts überprüft. Von den gepickten Klonen wurden, wie unter Kapitel 2.1.5.1. beschrieben, 1 ml Bakterienkulturen angelegt und die Vektor-DNA nach Anzucht über Nacht über die Methode der Mini-DNA-Präparation isoliert.

Es folgte nun ein analytischer Verdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und Eco32I (EcoRV). Diese beiden Enzyme weisen beide je eine Schnittstelle im Polylinker des Vektors pCR 3.1 auf, schneiden jedoch nicht im Insert. Da man bei diesem Verfahren das nicht mehr aufgereinigte PCR-Produkt eingesetzt hatte, konnte man mit einer großen Anzahl an nicht vollständigen Inserts und oder Primerresten rechnen, das auch die Anzahl der gewachsenen Kolonien der PCR-Negativ-Kontrolle erklärt. Die Auswertungen erfolgten im Agarosegel. Als Kontrolle wurden jeweils zwei unverdaute Minipräparationen aufgetragen.

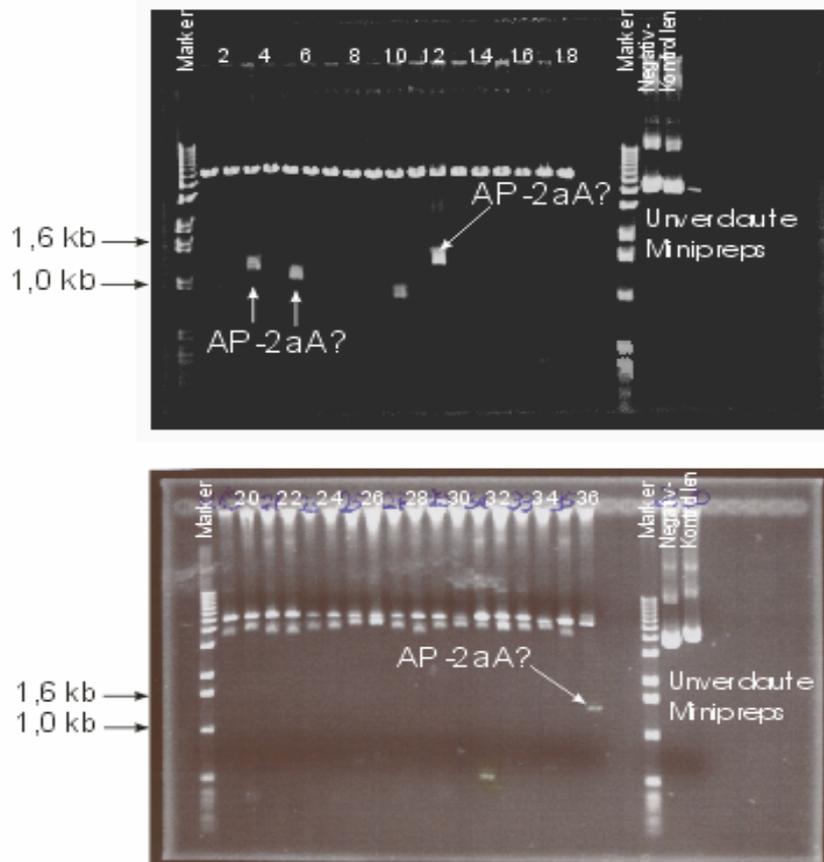


Abb. 15: Ergebnis der Klonierung und des Verdaus von 36 Minipräparationen mit den Restriktionsenzymen HindIII und Eco32I (EcoRV). Die mit dem weißen Pfeil gekennzeichneten Banden haben die Größe des AP-2 α A-Produkt (AP-2 α A plus ca. 30 bp Reste des Polylinkers = ca. 1362 bp).

Nach dem Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und Eco32I (EcoRV) zeigten sich vier (Kolonie 3,5,12 und 36) von insgesamt 36 Kolonien, die eventuell das gesuchte Insert mit einer Größe von 1362 bp enthielten.

Von den Kolonien Nr. 3 und 12, die am wahrscheinlichsten das gesuchte Insert mit dem gesamten PCR-Produkt von AP-2 α A enthalten, wurden wie unter Kapitel 2.1.5.2 beschriebenen Midipräparationen angefertigt.

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA wurde ein Quotient der ODs 260/280 von 1,901 und 1,903 ermittelt. Diese Werte weisen auf einen Grad hoher Reinheit bei der DNA-Präparation hin.

Um nun genauer die Identität des klonierten Inserts zu untersuchen, wurden mehrere Restriktionsverdauungen mit verschiedenen Enzymen durchgeführt, die alle entweder nur im Polylinker oder noch im AP-2 α A schneiden sollten. Tabelle 3 zeigt die verschiedenen Enzyme mit ihren Schneidepositionen und die zu erwartenden Fragmente.

Ansatz-Nummer	Restriktions-enzym	PCR-Produkt von AP-2 α A		Vektor pCR 3.1		Größe der Fragmente
		Anzahl der Schnittstellen	Position der Schnittstellen	Anzahl der Schnittstellen	Position der Schnittstellen	
a	BamHI	1	425			6,3 kb
b	HindIII			1	687(Polylinker)	6,3 kb
c	EcoRI			1	704(Polylinker)	6,3 kb
d	NcoI	1	1285	3	386 2561 3258	735 bp, 1,3 kb 1,3 kb 2,9 kb
e	PstI	2	896 1258	1	713(Polylinker)	139 bp 362 bp 5,8 kb
f	BamHI + HindIII	1	425	1	687(Polylinker)	386 bp 5,9 kb

g	EcoRI + NcoI	1	1285	1 3	704(Polylinker) 386 2561 3258	103 bp 735 bp 1,2 kb 1,3 kb 2,9 kb
h	HindIII + EcoRI			1 1	687(Polylinker) 704(Polylinker)	1,3 kb 5,0 kb
i	HindIII + EcoRV			1 1	687(Polylinker) 716(Polylinker)	1,3 kb 4,9 kb
j	EcoRV			1	716(Polylinker)	6,3 kb

Tab. 3: Restriktionsenzyme mit Schneidepositionen im PCR-Produkt und im Vektor pCR 3.1 und die beim Restriktionsverdau entstehenden Fragmente

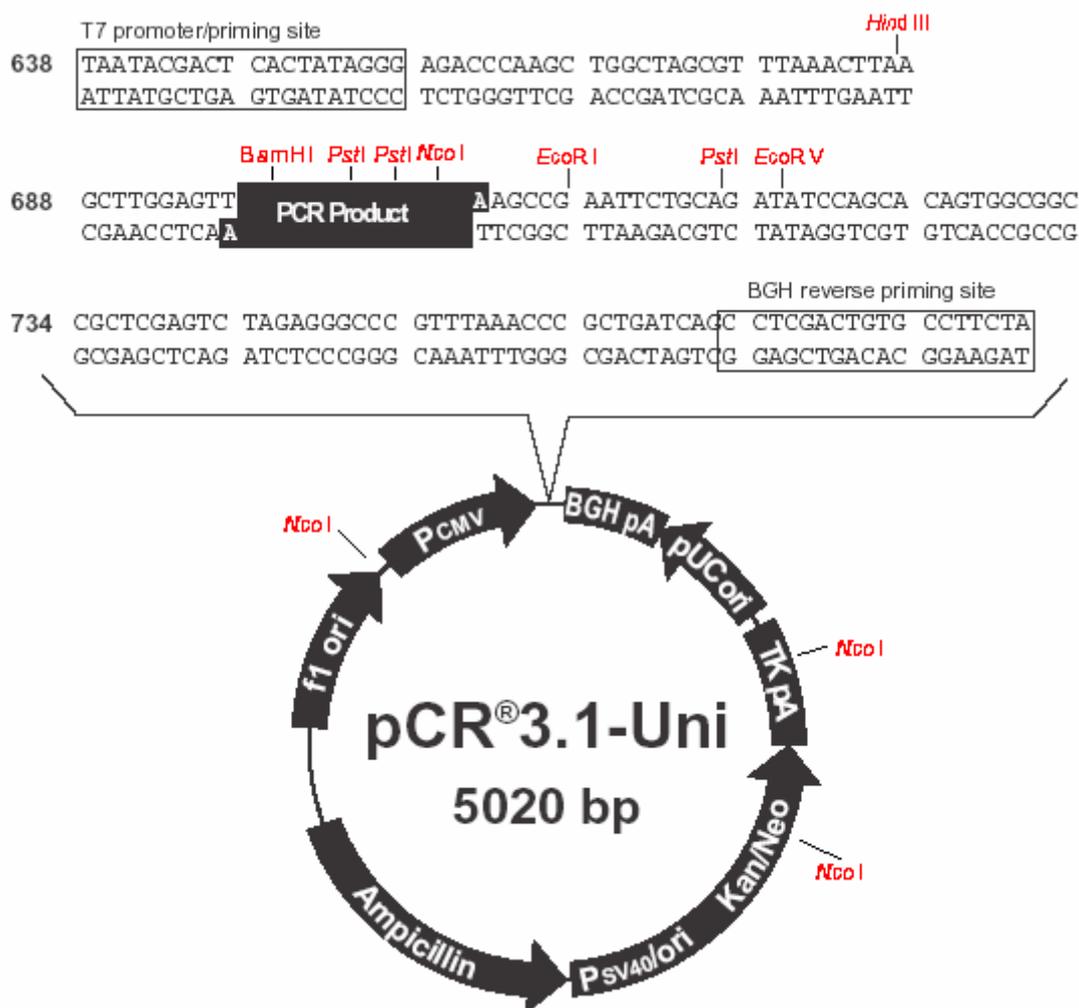


Abb. 16: Restriktionsenzyme mit Schneidepositionen im PCR-Produkt und im Vektor pCR 3.1

Die beiden Klone wurden nach dem analytischen Restriktionsverdau wiederum auf ein 1%-iges Gel aufgetragen. Da bei den Ansätzen mit *EcoRI* (Ansatz c, g, und h) nicht der spezifische *EcoRI*-Puffer, sondern der Puffer R+, verwendet wurde, könnten die zusätzlichen Banden durch die zusätzliche Star-Aktivität bedingt sein. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis dieses Restriktionsverdaues.

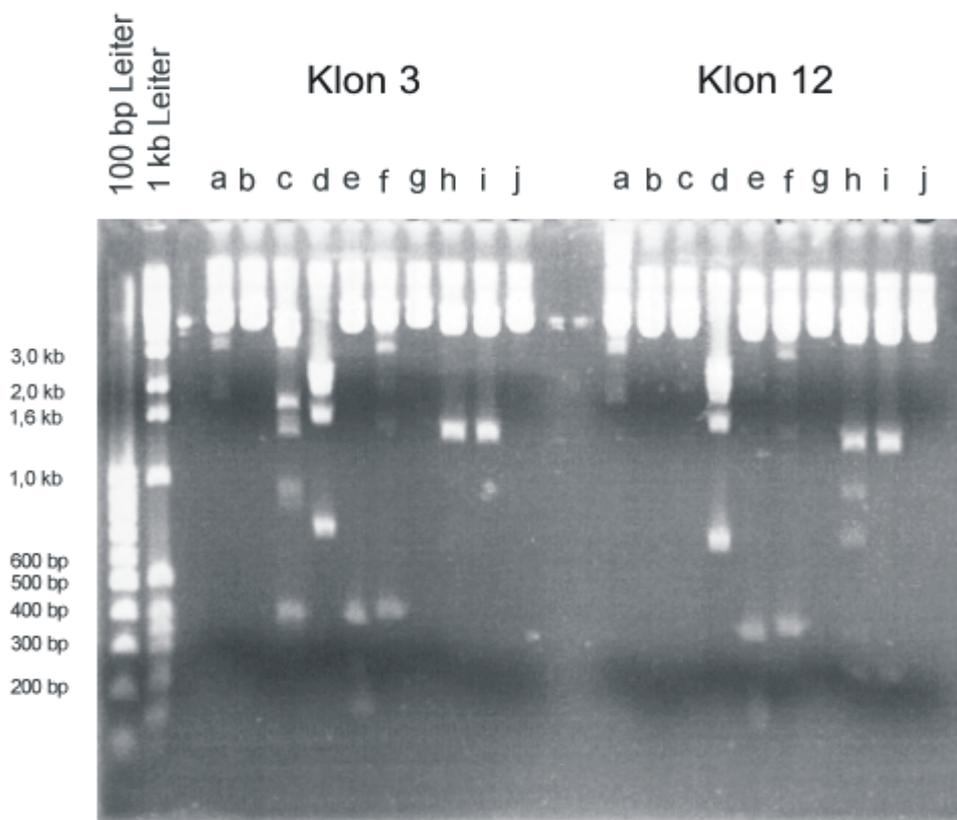


Abb. 17: Restriktionsverdau von Kolonie 3 und Kolonie 12 mit folgenden Enzymen (a: BamHI, b: HindIII, c: EcoRI, d: NcoI, e: PstI, f: BamHI + HindIII, g: EcoRI + NcoI, h: HindIII + EcoRI, i: HindIII + EcoRI, j: EcoRV)

Wie in der Abbildung 17 gezeigt wird, könnten beide Klone das gesuchte Insert enthalten, da jeweils sich die erwarteten Banden zeigten.

Wie bereits erwähnt, wurde bei den Ansätzen mit EcoRI (Ansatz c, g, und h) nicht der spezifische EcoRI-Puffer, sondern der Puffer R+, verwendet. Deshalb sind zusätzlichen Banden bei c und h durch die zusätzliche Star-Aktivität bedingt. Um nun sicherzustellen, dass die Klone das gesamte AP-2 α A enthalten, wurden mit Hilfe des BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kits eine Sequenzierung durchgeführt. In die Sequenzreaktion in einem 20 μ -

Ansatz wurden je 90 ng DNA, AP-2 α A-Forward-, AP-2 α A-Reverse-, T7 Forward- und BGH Reverse- Primer und 4 μ l des ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix eingesetzt (dieses beinhaltet das Enzym AmpliTaq® und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide).

Da die Sequenzierung jeweils nach ca. 400 bis 520 bp zu ungenau wurde, mussten folgende zusätzliche Forward und Reverse-Primer konstruiert werden:

AP-2 α A-C-Forward	TGGATCCTCGCAGGGACTACA
AP-2 α A-D-Reverse	GATCGGAATGTTGTTCGGTTGA

Diese Primer synthetisieren ein 621bp großes Segment aus AP-2 α A von Position 423 bis 1044.

Bei der Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass das DNA-Produkt aus Klon 3 lückenlos mit der Sequenz von AP-2 α A übereinstimmt. Das DNA-Produkt aus Klon 12 wies vor allen Dingen im Mittleren Abschnitt einige Abweichungen von der AP-2 α A-Sequenz auf.

AP-2 α -A-Forward 

GAATTCGGCTCTCTGGGTGAGAGACCGAGAGGGGCATATCCGTTACG**CCGATCCATGAAAATGCTTTGG**AAAATTGACGGATAA

 **Proteinanfang**

TATCAAGTACGAGGACTGCGAGGACCGTCACGACGGCACCAGCAACGGGACGGCACGGTTGCCCCAGCTGGGCACTGTAGGTCA

ATCTCCCTACAGAGCGCCCCGCCGCTGTCCACACCCCCAATGCCGACTTCCAGCCCCATACTTCCCCCACCTACCAGCCT

ATCTACCCCCAGTGCAGATCCTTACTCCACGTCAACGACCCTACAGCCTGAACCCCTGCACGCCAGCCGACGCCGAGC

ACCCAGGCTGGCCCGCCAGAGGCAGAGCCAGGAGTCTGGGCTCCTGCACACGCACCGGGGGCTGCCTCACCAGCTGTGGGC

AP-2 α -C-Forward 

CTGGATCCTCGCAGGGACTACAGGCGGCACGAGGACCTCTGCACGGCCACACGCCTCAGCTCAGGACTCGGAGACCTCTC

GATCCACTCCTTACCTCAGCCATCGAGGAGTCCCAGTGTAGAAAGACCCGGGTATTAACATCCAGATCAAACCTGTAATTAAGA

AAGCCCCGTGTCCCTGTCCAAGTCCAACAGCAATGCCGTCTCCGCCATCCCTATTAACAAGACAACCTTTCGGCGGCGTGGT

GAACCCCAACGAAGTCTTCTGTTCAAGTCCGGGTGCCTCTCGCTCCTCAGCTCCACCTCGAAGTACAAGGTCACGGTGGCGGAA

GTGCAGCGGCGGCTCTCACCACCCGAGTGTCTCAACGCCTCGTGTGGGCGGAGTCTCCGGAGGGCGAAGTCTAAAAATGGA

GGAAGATCTTTAAGAGAAAACTGGACAAAATAGGATTAATCTGCCTGCAGGGAGACGTAAAGTGCCAACGTTACCCTGCTCAC

ATCACTAGTAGAGGGAGAAGCTGTCCACCTAGCCAGGACTTTGGGTACGTGTGCGAAACGAATTTCTGCCAAAGCAGTAGCT

AP-2 α -D-Reverse 

GAATTT**TCAACCGACAACATTCGGATC**CCAATGAGCAAGTGACAAGAAAAACATGCTCCTGGCTACAAAACAGATATGCAAAGA

GTTACCGACCTGCTGGCTCAGGACCGATCTCCCCTGGGAACTCACGGCCCAACCCATCCTGGAGCCCGGCATCCAGAGCTG

CTTGACCCACTTCAACCTCATCTCCACGGCTTCGGCAGCCCCGCGGTGTGTGCCGCGGTACGGCCCTGCAGAACTATCTCACC

GAGGCCCTCAAGGCCATGGACAAAATGTACCTCAGCAACAACCCCAACAGCCACACGGACAACAACGCCAAAAGCAGTGACAAAG

AP-2 α -B-Reverse 

AGGAGAA**GCACAGAAAGTGAGGCTCTC**CTCCCGCCCCGCCCTCCCACGCCTCACCAGCCCCCGCGCGCCACCTCCGGCG

 **Proteinende**

GGTGACAGCTCCGGGATCAGCAACCCCTTCTGCTGCTGCTACTGCTGCTGCTGCTGCCGCCGCGCCGCCGCTGCCCTTGG

GTCCCCCGAGTCTCCGGGACTGCCCTCTCGACTGTGAGTGGGGCAGCCTCTCCGACTCTGCACCGCCTCGACCTCCCCACCCG

CTCCACACCCCTGTGCCCCCGGAATTC

Abb.18: Sequenz von AP-2 α (Klon 3) mit den zur Sequenzierung verwendeten Primern und Proteinanfang und -ende

Das aus Klon 3 synthetisierte AP-2 α A wurde weiterverwendet, um eine spezifische Sonde für die Northern-Blot-Hybridisierung herzustellen. Dieses Plasmid kann man zusätzlich einsetzen, um weitere Zelllinien zu transfizieren damit diese AP-2 α A überexprimieren. Das Verhalten der so veränderten Zellen könnte man in Hautrekonstrukten und Immunhistochemischen Färbungen weiter untersuchen.

3.1.2 Expressionsanalyse von AP-2 α A auf RNA-Ebene in verschiedenen Tumorzelllinien

Zunächst wurde das Expressionsprofil von AP-2 α A mit Hilfe eines Northern Blots und einer AP-2 α A-spezifischen Sonde analysiert.

Es wurde pro Zelllinie 10 μ g RNA eingesetzt. Abbildung 19 zeigt, dass die bis auf die Zelllinie WM1552 durchgehend intakt ist. Dabei ist zum einen das Vorhandensein und zum anderen die deutliche Trennung der 28 S- und 18 S-Fraktion der Beleg für die RNA-Qualität.

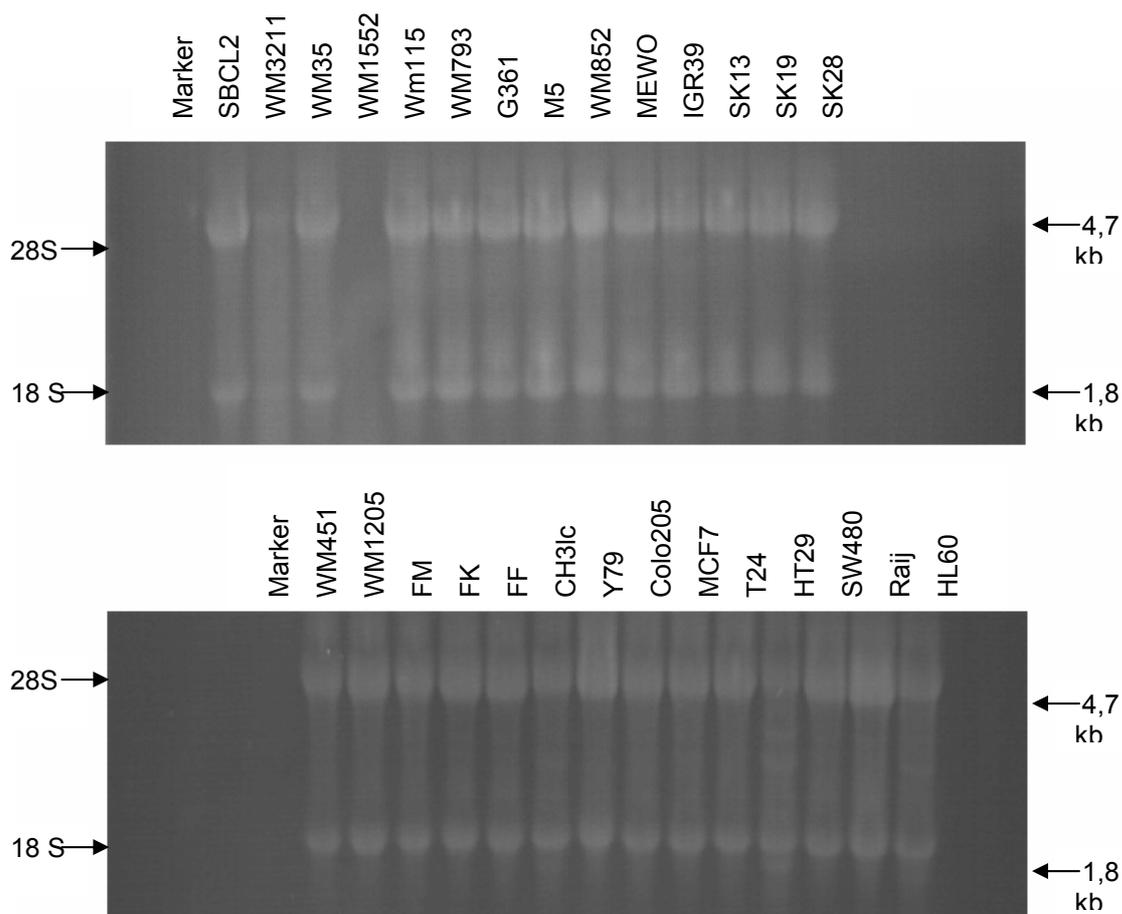


Abb. 19: RNA-Gel zum Qualitätsnachweis der RNA. Die 18 S-Bande ist bei 1,8 kb, die 28 S-Bande bei 4,7 kb zu sehen.

Nach dem Qualitätsnachweis der RNA wurde diese auf eine Membran geblottet. Danach wurde mit einer 28 S-Sonde zum Nachweis des Vorhandenseins der RNA und anschließend mit der Digoxigen (DIG)-markierten Sonde gegen AP-2 α hybridisiert.

Daraufhin versuchte man eine DIG-markierte AP-2 α Sonde aus Plasmid-DNA herzustellen, die durch die Midipräparation (siehe Kapitel 3.1.1) gewonnen wurde. Hierzu wurden die beiden am vielversprechendsten Midipräparationen mit folgenden Enzymen HindIII und EcoRV für 2 Stunden 45 min im Thermoblock bei 37°C inkubiert und danach auf einem Agarosegel aufgetrennt.

Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und durch das QIAquick Gel Extraction Kit gelöst. Mit dem Eluat wurde wie unter Kapitel 2.1.2.2 weiter verfahren.

Zur Sensibilitätstestung der so markierten Probe wurden danach auf eine Membran verschiedene Konzentrationen der verdauten Midipräparationen aufgebracht und mit der Sonde hybridisiert.

Abb. 20 zeigt die Ergebnisse des Northern Blots einiger ausgewählter Zelllinien.

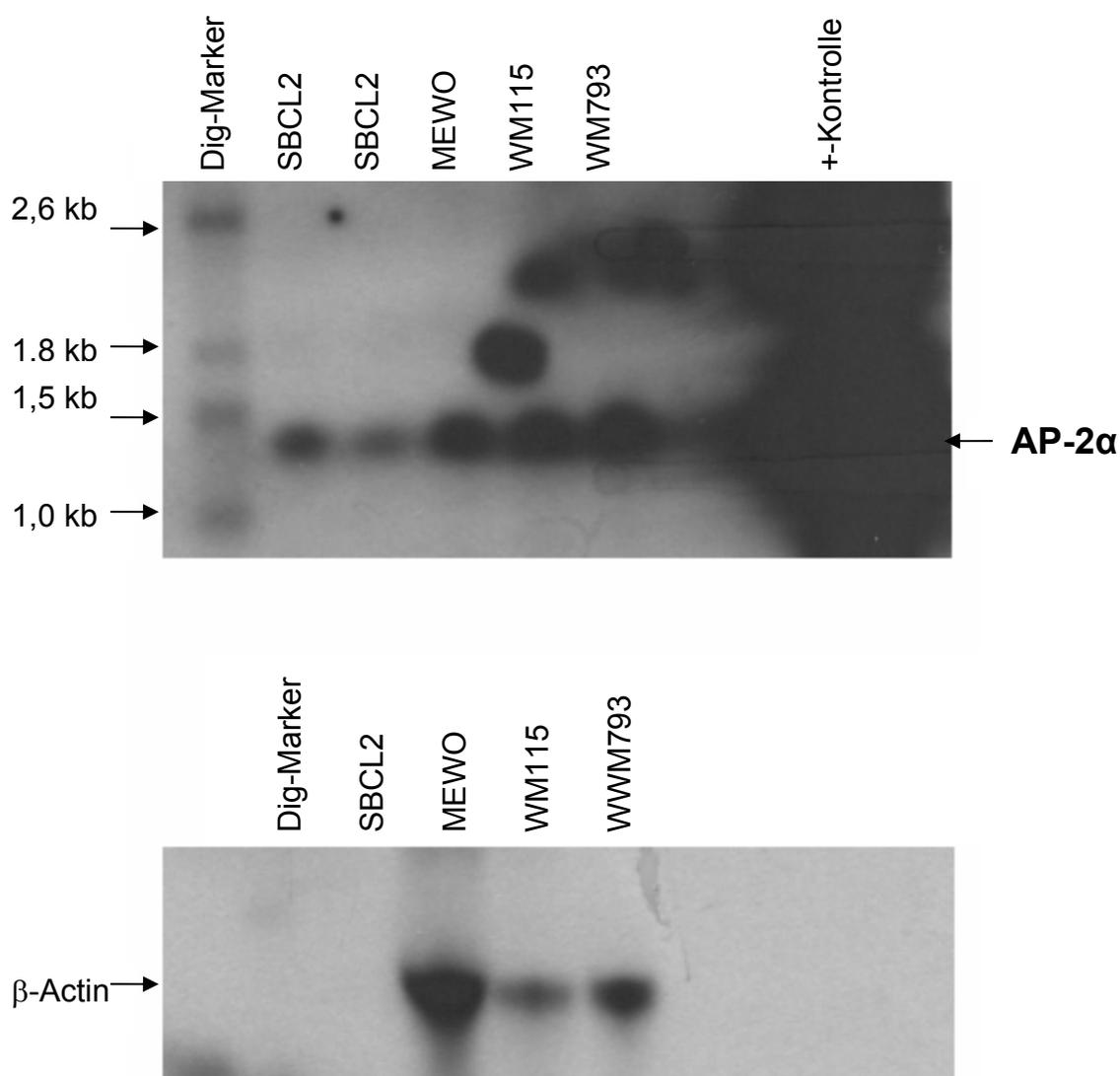


Abb. 20: Ergebnisse des Northern-Blots einiger Zelllinien **A** Hybridisierung mit der AP-2α spezifischen Sonde und **B** Hybridisierung mit der β-Actin spezifischen Sonde

Um einen systematischen Fehler bei der Durchführung des Northern Blots auszuschließen und um sicher zu gehen, dass die transferierten Membranen die RNA der verschiedenen Zelllinien enthält, wurden zusätzlich Hybridisierungen mit 28S rRNA durchgeführt. Da die Hybridisierung mit 28S rRNA mehrfach gelang, konnte man davon ausgehen, dass die Integrität der geladenen RNA gesichert war. Die Hybridisierung der 28S rRNA hatte, ebenso wie die eigens dafür hergestellte β -Actin DIG-markierte DNA, darüber hinaus als Standard für die quantitative Auswertung der Signale durch die spezifische Gensonde von AP-2 α A gedient.

3.1.3 Semiquantitative RT-PCR von AP-2 α A und AP-2 α B in verschiedenen Zelllinien

Buettner et al. konnten 1993 zeigen, dass zwei unterschiedlich gesplice mRNAs von dem AP-2-Gen transkribiert wurden. Diese kodieren zwei verschiedene Proteine: AP-2 α A und AP-2 α B. Dabei ist das AP-2 α A Protein identisch mit dem 52 kDa AP-2 α A Protein, das aus HeLa-Zellen isoliert wurde. Das AP-2 α B Protein besitzt die Aktivierungsdomäne von AP-2 α A und einen Teil der DNA-Bindungsdomäne. Es fehlt jedoch die für DNA-Bindung wichtige Dimerisationsdomäne. Transfektionsexperimente deuten darauf hin, dass AP-2 α B ein potenter Inhibitor der Transaktivierung von AP-2 α A ist. Dabei interagiert AP-2 α B mit AP-2 α A und verhindert dadurch die Bindung von AP-2 α A mit der DNA. Transfektionsversuche konnten weiter zeigen, dass das AP-2 α A Protein den eigenen Promotor aktivieren kann (Bauer et al., 1994).

Nach der Extraktion von Gesamt-RNA wurde anschließend die RNA einiger Zelllinien für die PCR in cDNA umgeschrieben. Der Vorteil der Verwendung von Zellen aus der Zellkultur liegt darin, dass zum einen das Material nicht so stark begrenzt ist und zum anderen qualitativ gute RNA auf einfache Art isoliert werden kann. Die Qualität der RNA wurde mit Hilfe des Photometers bestimmt. Dazu wurde der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm sowie 280 nm gebildet. Je niedriger dieser Quotient ist, desto verunreinigter ist die RNA mit Proteinen. Ein Quotienten von über 1,8 ist anzustreben. Die Ratio aus den

Extinktionswerten bei 260 nm und 280 nm, d.h. die Reinheit, lag in der vorliegenden Arbeit zwischen 1,972 und 2,154.

Die RNA-Extinktionswerte und Ratios sind nachfolgend in Tabelle 4 aufgelistet.

Zelllinie	RNA-Konzentration (ng/µl)	Reinheit Ratio 260/280
SBCL2	2660	2,111
WM3211	944	2,070
IGR39	1572	2,113
WM35	1696	2,109
WM1552	1176	2,130
WM115	3988	2,121
WM793	2368	2,085
WM451-LU	3392	2,131
WM1205-LU	2700	2,090
SK13	2168	2,117
SK19	2220	2,063
SK28	4752	2,084
M5	2500	2,140
MEWO	2876	2,090
WM852	2192	2,116
WM1491	488	2,000
FM	1404	1,972
CH3-CL	2376	2,084
HT29	6648	2,136
SW480	2912	2,116
Colo205	2660	2,131
T24	3436	2,116
MCF7	5824	2,154

Tab. 4: RNA-Extinktionswerte

In der vorliegenden Arbeit wurde AP-2 α cDNA von Melanonzelllinien, Metastasenzelllinien und andere Karzinomzelllinien über AP-2 α A und AP-2 α B spezifische Primer, wie in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben wurde, und als Kontrolle das Haushaltsgen GAPDH amplifiziert. Damit wurde mit den AP-2 α A Forward und Reverse-Primern ein 1333 bp grosses cDNA-Stück von AP-2 α A synthetisiert.

Diese Transkription beinhaltet damit Proteinanfang und -ende. Bei AP-2 α B wurden die Primer so gewählt, dass ein 223 bp grosses Stück von AP-2 α B synthetisiert wurde. Dieses Teilstück liegt am Ende der AP-2 α B Nukleotidsequenz und ist damit in dem Teil, der sich von AP-2 α A unterscheidet. Das PCR-Produkt des Haushalts-Gens GAPDH besitzt eine Größe von 247 bp.

Abbildung 21 zeigt die cDNA von AP-2 α A und AP-2 α B und die zur Amplifizierung verwendeten Primer.

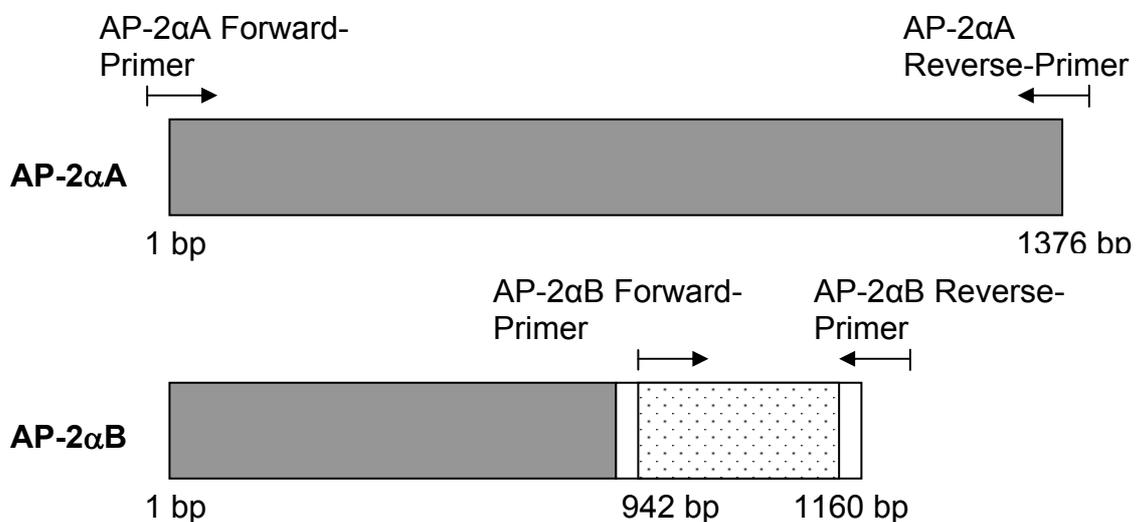


Abb. 21: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von AP-2 α A und AP-2 α B. Die grauen Flächen zeigen, dass AP-2 α A und AP-2 α B die ersten 941 bp gemeinsam haben. Das hier amplifizierte PCR-Produkt von AP-2 α B (223 bp) wird durch die gepunktete Fläche beschrieben.

Tabelle 5 zeigt die verschiedenen Zelllinien, die mit Hilfe der RT-PCR auf AP-2 α A- und AP-2 α B-Expression untersucht wurden.

Tumor/Gewebeart	Zelllinie		Referenz
Melanomzellen	Radial wachsend (RGP)	SBCL2 WM3211 IGR39 WM35 WM1552	Meier et al., 2000 Meier et al., 2000 Aubert et al., 1980 Meier et al., 2000 Meier et al., 2000
	Vertikal wachsend (VGP)	WM115 WM793	Meier et al., 2000 Meier et al., 2000
	Hochaggressiv	WM451-LU WM1205-LU	Meier et al., 2000 Meier et al., 2000
Metastatische Melanomzellen		SK13 SK19 SK28 M5 MEWO G361 WM852	Carey et al., 1976 Carey et al., 1976 Carey et al., 1976 Levya et al, 1983 Carey et al., 1976 Reeds et al., 1978 Meier et al, 2000
Nävuszellen		WM1491	Meier et al, 2000
Melanozytenzellen		FM	Meier et al., 2003
Bronchial-Carcinom		CH3-CL	DKFZ Heidelberg
Colon-Carcinom		HT29 SW480 Colo205	Didier et al., 1996 Fogh et al., 1977 Semple et al., 1978
Blasen-Carcinom		T24	O´Toole et al., 1972
Mamma-Carcinom		MCF7	Sugarman et al., 1985

Tab. 5: Übersicht über die mit Hilfe der RT-PCR auf AP-2 α A- und AP-2 α B-Expression untersuchten Zelllinien

Als Marker dienten bei der Amplifikation von GAPDH und AP-2 α B ein 100 bp Leiter (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot). Bei den Agarosegelen, die mit den PCR-Produkt von AP-2 α A beladen wurden, diente ein 1000 bp Leiter (GibcoBRL, Life-Technologies) als Marker. Zur Auswertung der Semiquantitativen PCR wurde ein Programm von BIO-RAD, Molecular Analyst[®]/PC UV Gel Documentation (Version 1.5) verwendet. Damit wurden die Banden bei je 25, 30, 35, 40 Zyklen einzeln gemessen. Als Standard für die semiquantitative

Auswertung und als Kontrolle für die Integrität der geladenen cDNA diente das Haushaltsgen GAPDH.

Mit den Werten, die das BIO-RAD-Programm lieferte, wurden Ratios gebildet, d.h. der Quotient aus AP-2 α A bzw. AP-2 α B und GAPDH:

$$\frac{\text{Expression von AP-2}\alpha\text{A bzw. AP-2}\alpha\text{B}}{\text{Expression von GAPDH}}$$

Der höchste Wert entsprach dann der stärksten Expression und wurde dem relativen Wert 10 zugeordnet, damit waren die Expressionsstärken verschiedener Gele vergleichbar. Die nun folgenden Darstellungen sollen das Ergebnis der Auswertung der PCR mit dem BIO-RAD, Molecular Analyst[®] zeigen.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse aus einigen RT-PCRs mit AP-2 α A und AP-2 α B spezifischen Primern sowie die GAPDH-PCRs als Kontrolle.

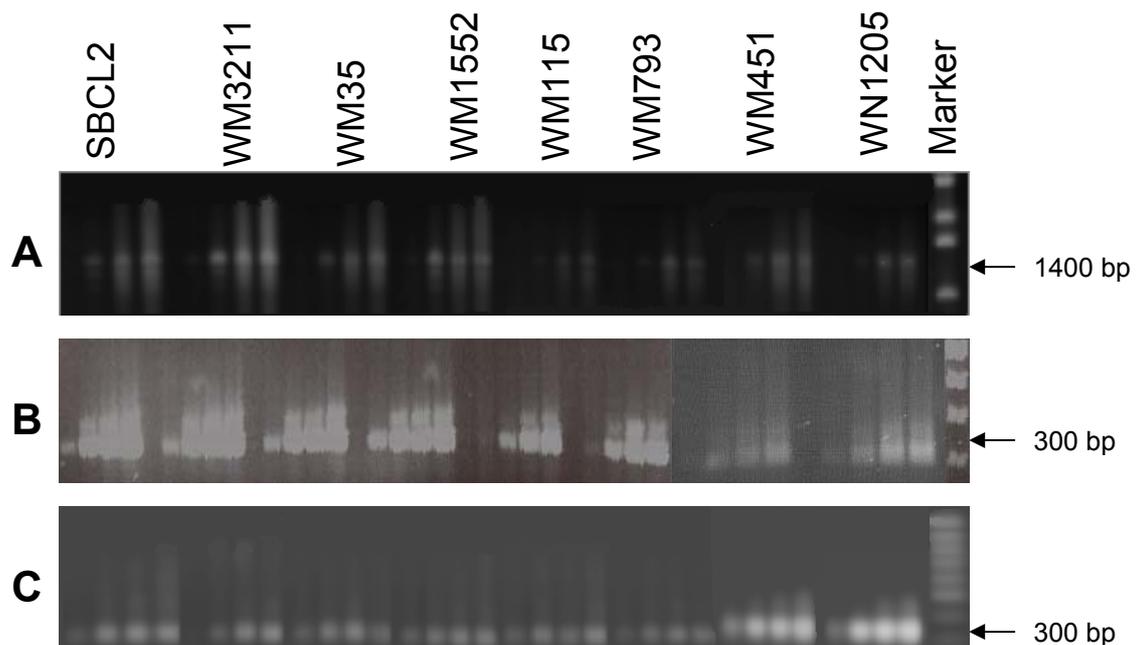


Abb. 22: Semiquantitative RT-PCR radialer, vertikaler und hochaggressiver Melanomzelllinien. Dargestellt sind RT-PCR Analysen mit AP-2 α A- (A) und AP-2 α B- (B) spezifischen Primern bzw. GAPDH-Primern (C) als Kontrolle nach 25, 30, 35 und 40 PCR-Zyklen (von links nach rechts)

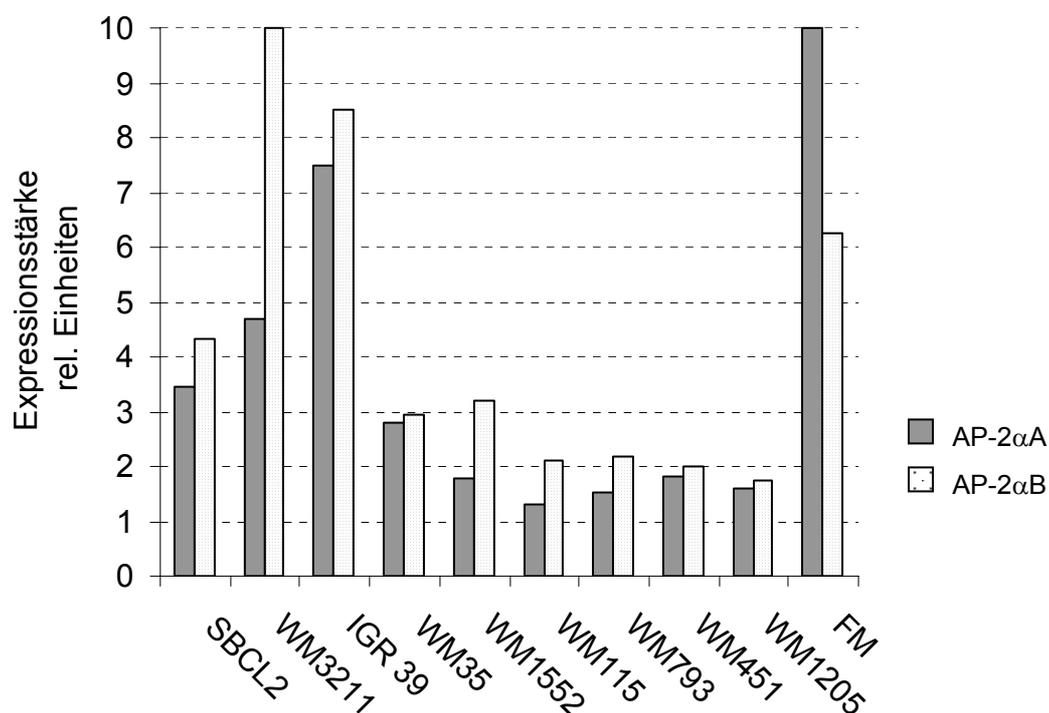


Abb. 23: Vergleich der PCR-Expression von AP-2 α A und AP-2 α B in radialen, vertikalen und hochaggressiven Melanomzelllinien und Melanozyten

Betrachtet man zunächst einmal die Expression von AP-2 α A und B in den radial-, vertikalwachsenden und den hochaggressiven Melanomzelllinien, fällt auf, dass AP-2 α B in all diesen Zelllinien etwas mehr als AP-2 α A exprimiert wird.

Bei der radialwachsenden Zelllinie WM3211 wurde im Vergleich zu allen anderen Zelllinien die größte Expression von AP-2 α B nachgewiesen. Auffällig ist weiterhin eine zu den metastatischen Melanomzelllinien höhere Expression von beiden AP-2 α Formen.

Die Melanozyten FM zeigen erwartungsgemäß die stärkste Expression von AP-2 α A im Vergleich zu allen anderen Zelllinien und eine dazu relativ geringe AP-2 α B –Expression.

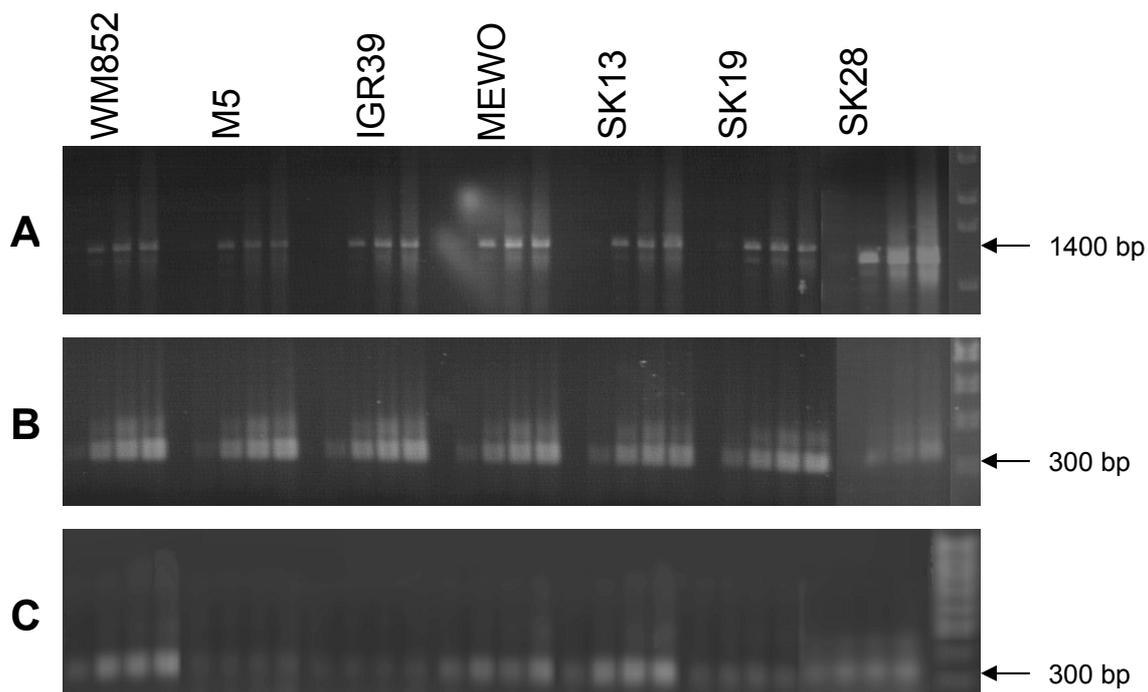


Abb. 24: Semiquantitative RT-PCR metastatischer Melanomzelllinien
Dargestellt sind RT-PCR Analysen mit AP-2 α A- (A) und AP-2 α B- (B) spezifischen Primern bzw. GAPDH-Primern (C) als Kontrolle.

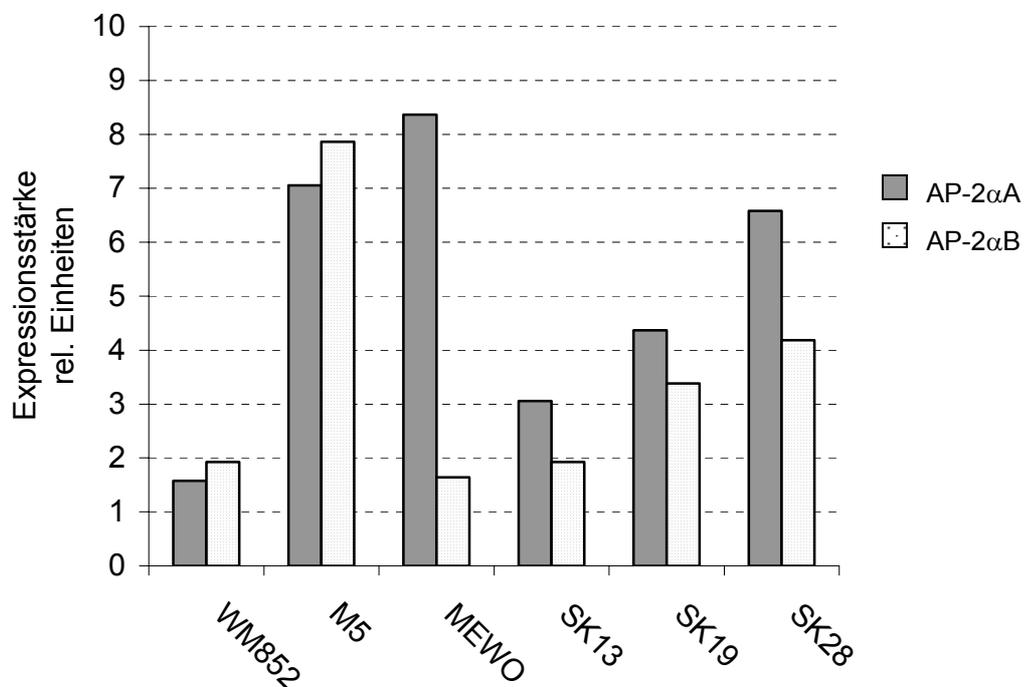


Abb. 25: Vergleich der PCR-Expression von AP-2 α A und AP-2 α B in metastatischen Melanomzelllinien

Die metastatischen Melanomzelllinien zeigen ein sehr uneinheitliches Bild bei der Expression von AP-2 α A und B. Dabei fällt der stärkste Unterschied in der Expression von AP-2 α A und AP-2 α B bei der Zelllinie MEWO auf.

Vergleicht man die Expressionen von AP-2 α A und AP-2 α B der meisten Melanomzelllinien mit den übrigen Zelllinien, erkennt man eine stärkere Expression insbesondere von AP-2 α A.

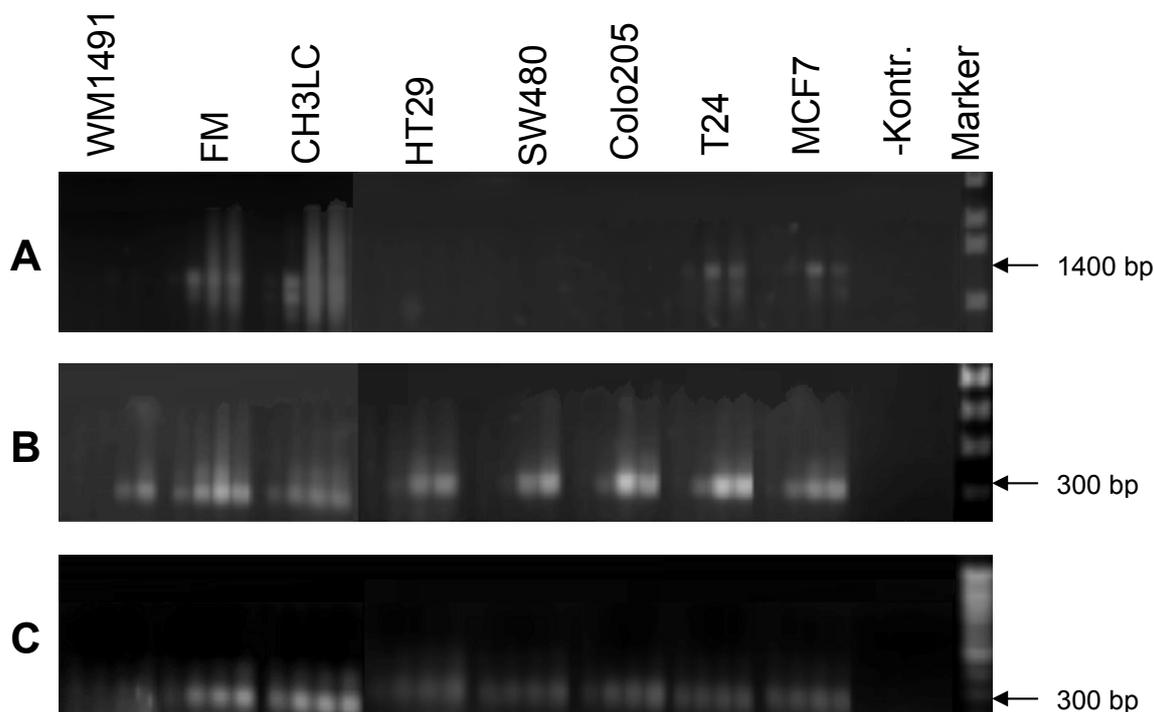


Abb. 26: Semiquantitative RT-PCR von Melanozyten-, Nävuszelllinie und weiteren Tumorzelllinien. Dargestellt sind RT-PCR Analysen mit AP-2 α A- (A) und AP-2 α B- (B) spezifischen Primern bzw. GAPDH-Primern (C) als Kontrolle nach 25, 30, 35 und 40 PCR-Zyklen (von links nach rechts).

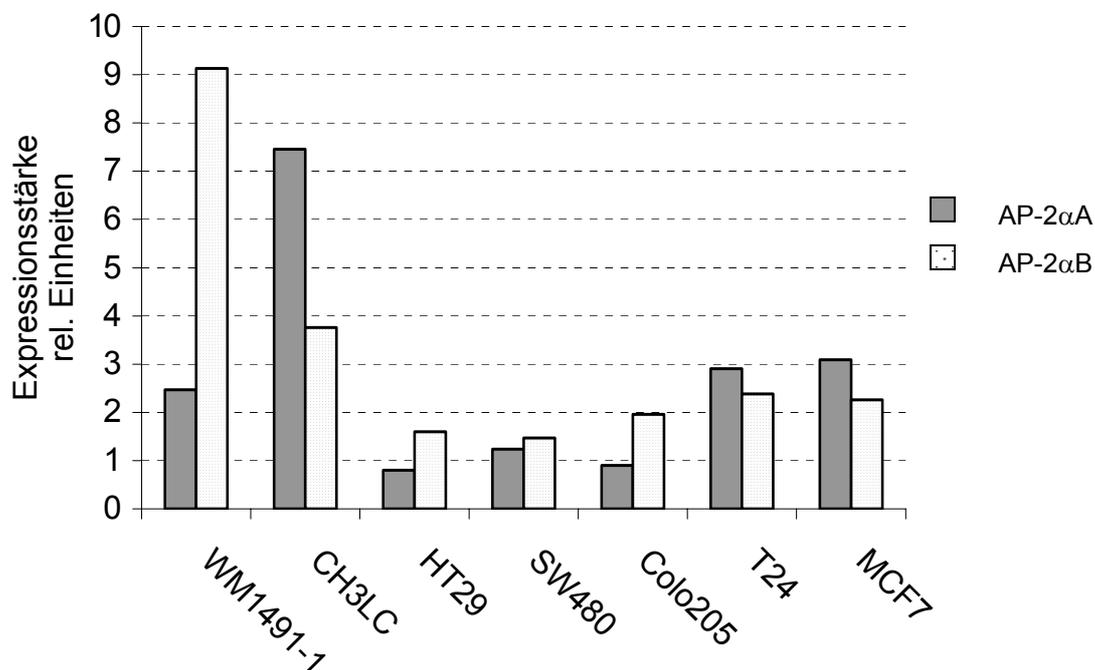


Abb. 27: Vergleich der PCR-Expression von AP-2 α A und AP-2 α B in Nävuszellen und weiteren Tumorzelllinien

Die Nävuszelllinie WM1491-1 zeigt hingegen eine relativ geringe AP-2 α A- und eine im Vergleich dazu eine sehr starke AP-2 α B-Expression.

Die übrigen Tumorzelllinien zeigen wiederum eine etwas unterschiedliche Expression von den beiden AP-2-Formen. Bis auf die Zelllinie CH3LC des Bronchialkarzinoms, bei dem die Expression von AP-2 α A fast doppelt so stark ist, als die von AP-2 α B, werden AP-2 α A und AP-2 α B in einem relativ geringen Maß exprimiert. Dabei zeigen die drei Kolonkarzinom-Zelllinien (HT29, SW480, Colo205) ein fast identisches Bild der Expression.

3.2 Expressionsanalyse von AP-2 α auf Proteinebene

3.2.1 Western-Blot Analyse von AP-2 α A

AP-2 α A-Protein kontrolliert als Transkriptionsfaktor zahlreiche Gene der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Karzinomwachstums und der Progression. In dieser Arbeit wurde durch Western Blot Analysen untersucht, wie viel Protein in verschiedenen Zelllinien gebildet wird.

Hierzu wurde zunächst einmal nur die Proteinexpression von AP-2 α A in den zu Verfügung stehenden Zelllinien betrachtet. Dazu wurden aus allen uns zur Verfügung stehenden Zelllinien nukleäre Extrakte und Zellysate über SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt.

Da sich nach mehreren Literaturangaben AP-2 α A im Kern befinden soll, wurden zur proteinanalytischen Bestimmung der AP-2 α A Expression nach mehreren Vergleichen zwischen nukleären Extrakten und Zellysaten die hier aufgeführte Western Blot Analysen mit nukleären Extrakten durchgeführt.

Nach der Austestung der Konzentration des Erstantikörpers C-18, wurde eine Konzentration von 1:500 weiter verwendet, da hier die besten Ergebnisse erzielt wurden. Dieser Antikörper ist gegen das Peptid gerichtet, das in Verbindung mit den Aminosäuren 420-437 am Carboxy-Terminus steht, und sollte somit nur AP-2 α A binden.

Als Positiv-Kontrolle dienten nukleäre Extrakte der HeLa-Zellen (Santa Cruz, CA, USA). Die nun folgenden Darstellungen zeigen das Ergebnis der Auswertung der PCR mit dem BIO-RAD, Molecular Analyst[®].

Zum Vergleich der AP-2-Expressionsstärke wurden die Western Blot Membranen mit dem Antikörper C-2 (monoklonaler Maus Antikörper) gegen β -Actin, einem Haushaltsgen, hybridisiert. Der monoklonale Antikörper hatte zusätzlich den Vorteil, dass er parallel zu den AP-2 α A Antikörpern eingesetzt werden konnte, d.h. man musste die Blots nicht erst abwaschen, sondern man konnte gleichzeitig mit AP-2 α und β -Actin Antikörpern hybridisieren. Dieser Vorteil lag darin, dass kaum Protein abgewaschen wurde und damit die Expressionen besser vergleichbar waren.

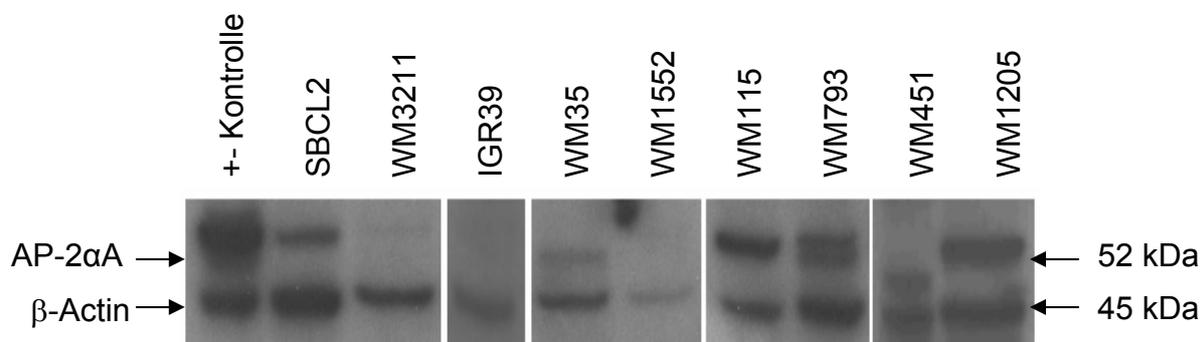


Abb. 28: Western Blot mit AP-2 α A Antikörper (C-18) und β -Actin Antikörper (C-2) gefärbt von vertikal, radial wachsenden und hochaggressiven Zelllinien

Die Auswertung wurde wiederum mit Hilfe des BIO-RAD Programms durchgeführt und der Quotient aus der Expression von AP-2 α A und β -Actin gebildet. Der höchste Wert wurde als stärkste Expression mit 10 angegeben (Ermittlung der relativen Werte wie unter Kapitel 3.1.3).

Es wurden mindestens jeweils fünf Western Blot Analysen der verschiedenen Gele durchgeführt. Die Größe der Balken stellt die gemessenen Mittelwerte, die Fehlerindikatoren die maximale Abweichung vom Mittelwert, der einzelnen Zelllinien dar.

Bei den metastatischen Melanomzelllinien wurde eine weitere Zelllinie G361, die ebenfalls eine metastatische Melanomzelllinie darstellt, untersucht.

Zu den verschiedenen Tumorzelllinie kamen eine Retinoblastomzelllinie Y79 und eine Zelllinie eines B-Zell-Lymphoms Raji hinzu.

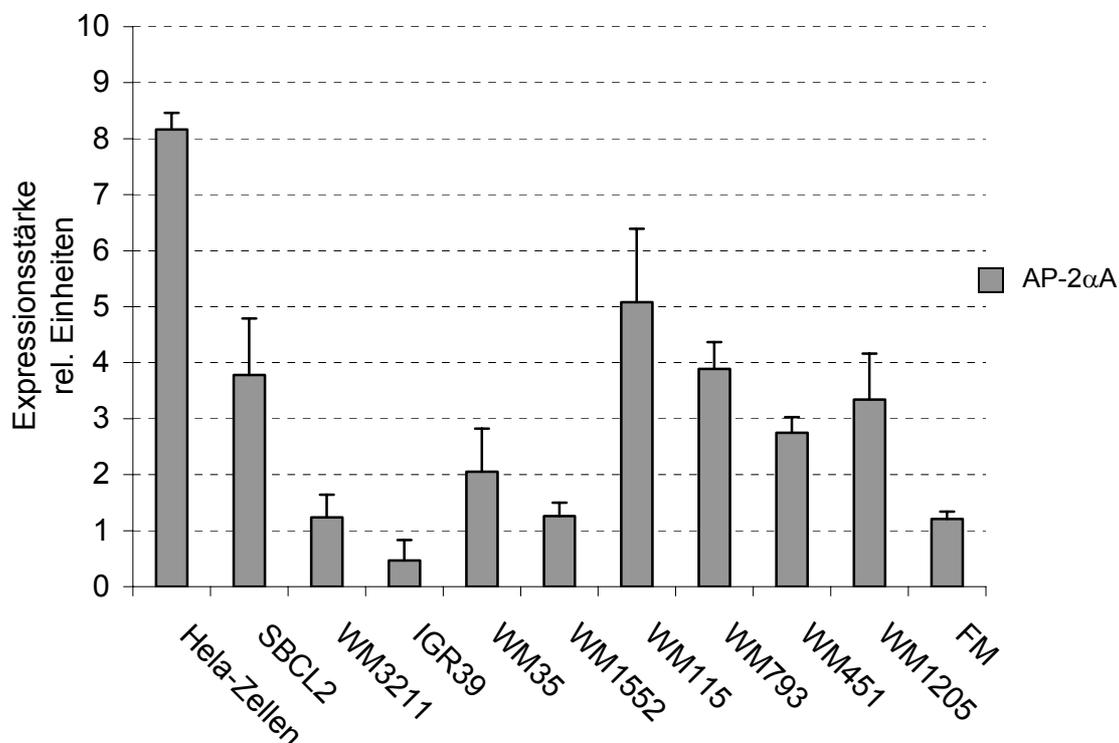


Abb. 29: Vergleich der Protein-Expression von AP-2 α A in radialen, vertikalen und hochaggressiven Melanomzelllinien und Melanozyten.

Betrachtet man nun die Expression bei vertikal-, radialwachsenden und hochaggressiven Melanomzelllinien: Die AP-2 α A Expression der radialwachsenden Zelllinien (SBCL2, WM3211, IGR39, WM35 und WM1552) ist im Vergleich mit der Expression der vertikalwachsenden Zelllinien (WM115 und WM793) nur etwa halb so groß. Bei den hochaggressiven Zelllinien WM451 und WM1205 nimmt die Expression von AP-2 α A im Vergleich zu den beiden vertikalwachsenden Melanomzelllinien etwa um 1/3 ab.

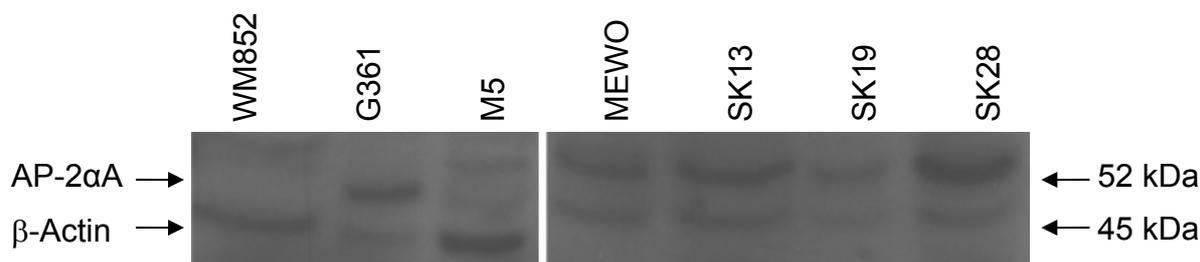


Abb. 30: Western Blot von AP-2 α A (C-18) und β -Actin Antikörper (C-2) gefärbt in metastatischen Melanomzelllinien

Bei den metastatischen Melanomzelllinien zeigte sich, wie bei der PCR-Expression, eine sehr unterschiedliche AP-2 α A-Proteinexpression. Insgesamt gesehen liegt die Expression jedoch leicht unter der Expression der radialwachsenden Melanomzelllinien.

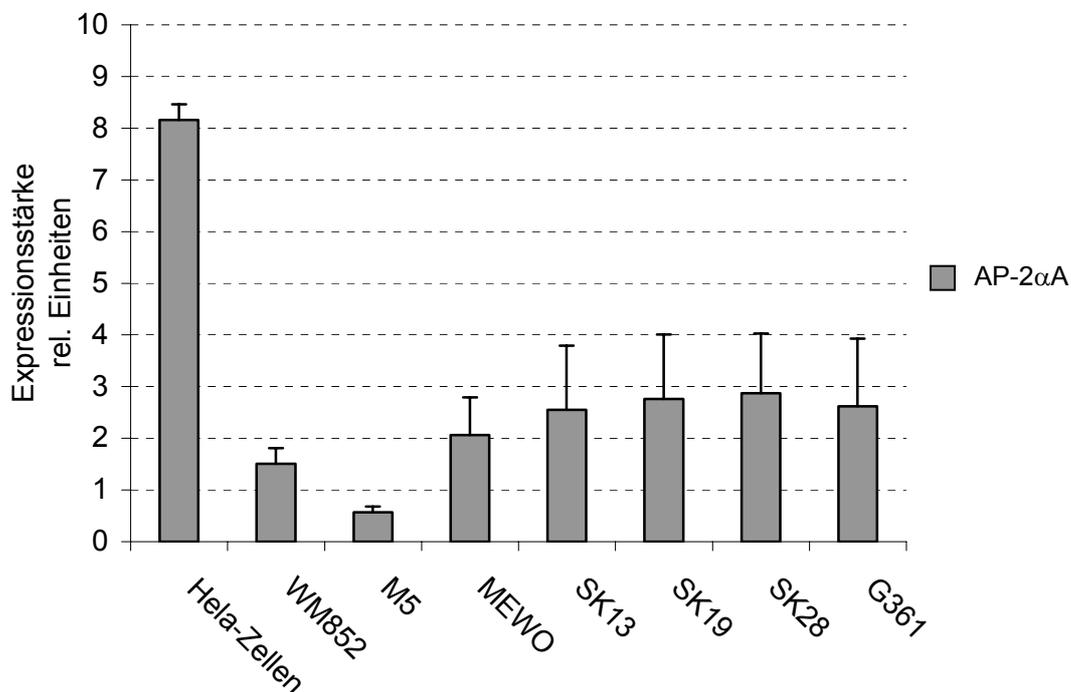


Abb. 31: Vergleich der Protein-Expression von AP-2 α A in metastatischen Melanomzelllinien

Das könnte eine Reduktion der AP-2 α -Expression in höher metastatischen Zelllinien bedeuten. Man kann zusätzlich innerhalb der einzelnen Zelllinien, besonders bei den Zelllinien von SK13, SK19, SK28 und G361, große Expressionsunterschiede feststellen.



Abb. 32: Western Blot von AP-2 α (C-18) und β -Actin Antikörper (C-2) gefärbt in Nävuszellen und weiteren Tumorzelllinien

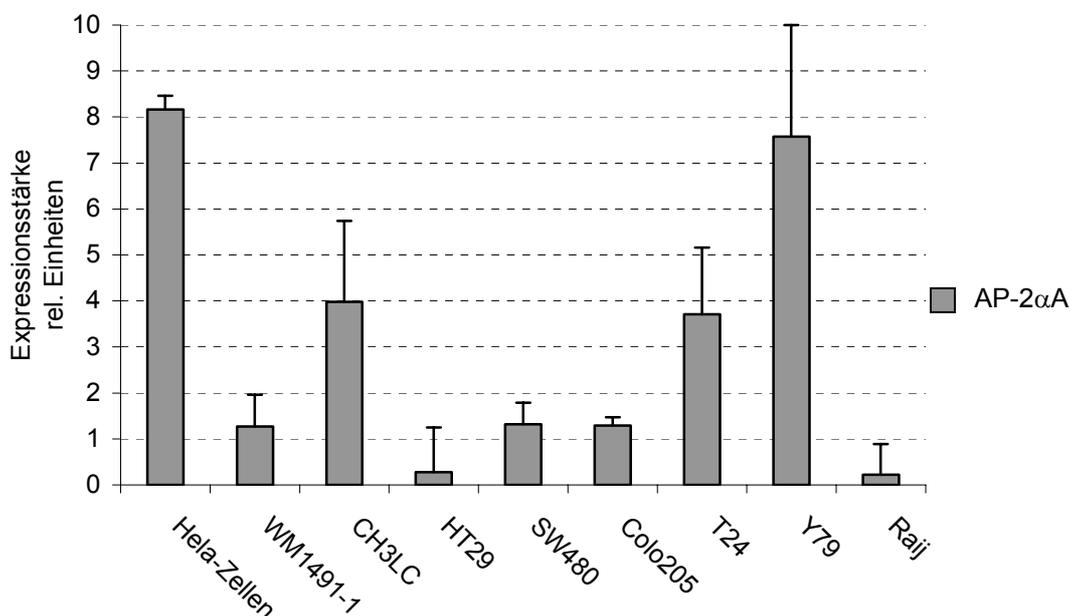


Abb. 33: Vergleich der Protein-Expression von AP-2 α in Nävuszellen und weiteren Tumorzelllinien

Beim Vergleich von der Nävuszelllinie WM1491-1 und den Melanozyten FM fällt ein nahezu identischer Wert in der Expressionsstärke auf (WM1491-1 mit dem

rel. Wert 1,27 und mit der max. Abweichung von 0,69; FM mit dem rel. Wert 1,21 und der max. Abweichung von 0,13).

Die anderen Tumorzelllinien zeigten wiederum sehr unterschiedliche Werte in der Expression. Die drei Kolonkarzinom-Zelllinien (HT29, SW480 und Colo205) zeigten aber wieder ähnliche Protein-Expressionen von AP-2 α A mit geringen Abweichungen vom Mittelwert.

Die stärkste AP-2 α A-Protein Expression in dieser Versuchsreihe zeigte mehrfach die Retinoblastomzelllinie Y79. Diese Zelllinie fiel jedoch auch durch sehr unterschiedliche Expressionsstärken auf, was hier durch den großen Fehlerindikator dargestellt wurde. Vermutlich wurden diese Unterschiede durch unterschiedliche Protein-Extraktion bei der Herstellung der nukleären Extrakte verursacht.

Zu dieser Untersuchung der AP-2 α A-Protein-Expression kann man abschließend sagen, dass ein gewisser Abfall der AP-2 α A-Expression von den vertikalwachsenden bis zu den metastatischen Melanomzelllinien erkennbar ist.

3.2.2 Vergleichende Western-Blot-Untersuchung zur Expression von AP-2 α A und AP-2 α B

Um nun die Protein-Expression von AP-2 α A und AP-2 α B zu untersuchen, wurden Western-Blot Analysen mit dem H-79 Antikörper durchgeführt. Dieser ist gegen beide Proteinformen von AP-2 α gerichtet (Polyklonaler Kaninchen Antikörper, H-79, Santa Cruz, CA, USA). Dieser Antikörper sollte auf Grund seiner Bindungsstelle an ein rekombinantes Protein binden, dass in Verbindung mit den Aminosäuren 130-209 innerhalb der internen Region von beiden Formen von AP-2 α steht.

Dazu wurden die Western Blot Membranen, wie unter Kapitel 2.2.1.4 beschrieben, mit dem Erstantikörper (Polyklonaler Kaninchen Antikörper, H-79, Santa Cruz, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:200 über Nacht inkubiert. Da dieser Antikörper gegen beide Formen von AP-2 α gerichtet ist, konnte man die Membranen nicht zusätzlich mit dem Antikörper gegen β -Actin hybridisieren. Deshalb wurden parallel zu den Westen-Blot Membranen, die mit dem

Antikörper H-79 hybridisiert wurden, Membranen angefertigt, die nur mit dem Antikörper gegen β -Actin (C-2 monoklonaler Maus Antikörper, Santa Cruz, USA) hybridisiert wurden.

Der Antikörper H-79 sollte somit ungehindert von β -Actin an AP-2 α A bei 50 kDa und an AP-2 α B bei 43 kDa binden können.

Bei der Auswertung wurde wie auch bei der Einzelauswertung ein Quotient zwischen AP-2 α A bzw. AP-2 α B und β -Actin gebildet und die stärkste Expression mit 10 angegeben (Ermittlung der relativen Werte wie unter Kapitel 3.1.3 beschrieben).

Es wurden mindestens jeweils drei Western Blot Analysen der verschiedenen Gele durchgeführt, die die Sicherheit der Werte garantieren sollten. Aus diesen wurden dann die Mittelwerte gebildet, die durch die Größe der Balken dargestellt wird.

Für diesen Vergleich der Proteinexpressionen wurden wieder die oben genannten radial-, vertikalwachsenden und verschiedenen metastatischen Melanomzelllinien untersucht.

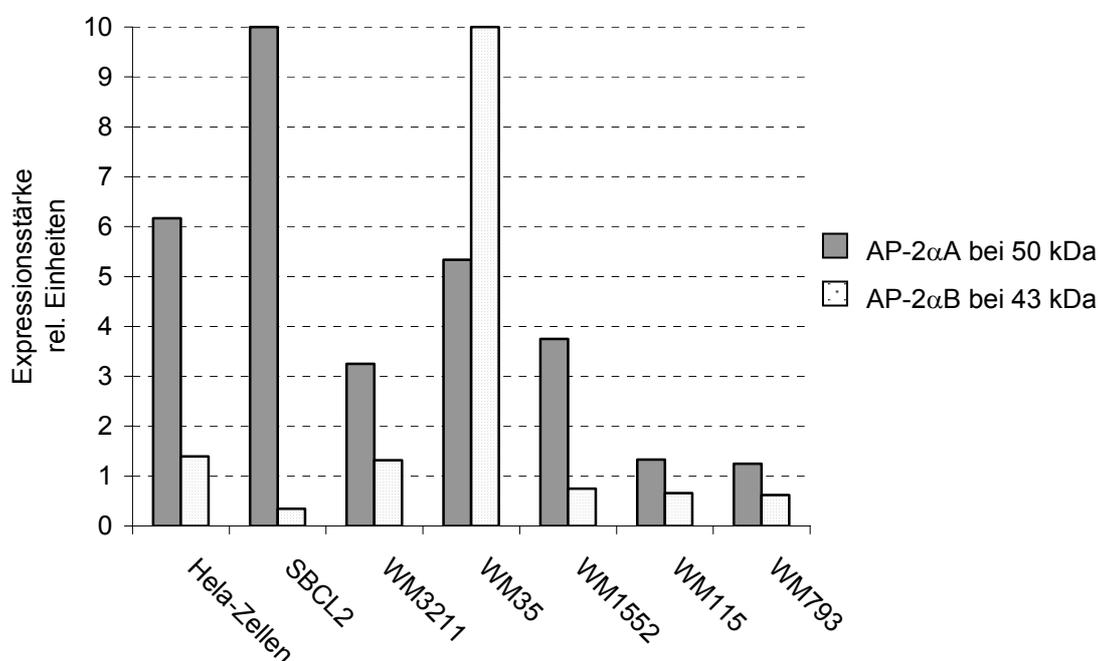


Abb. 34: Vergleich der Protein-Expression von AP-2 α A und AP-2 α B mit dem Antikörper H-79 in radialen, vertikalen Melanomzelllinien

Zunächst fallen sehr starke Unterschiede in der AP-2 α A und AP-2 α B Expression auf. Dieser Unterschied wird besonders deutlich bei der Zelllinie SBCL2, bei der nur eine sehr geringe Expression von AP-2 α B und die stärkste Expression von AP-2 α A gemessen wurde.

Die radial wachsende Melanomzelllinie WM35 zeigt als einzige der radial wachsenden Zelllinien eine fast doppelt so starke Expression der AP-2 α B Form, wie der AP-2 α A Form. Eine sehr geringe Expression beider AP-2 α Formen zeigten hingegen die beiden vertikalwachsenden Melanomzelllinien WM115 und WM793 (siehe Abb. 34).

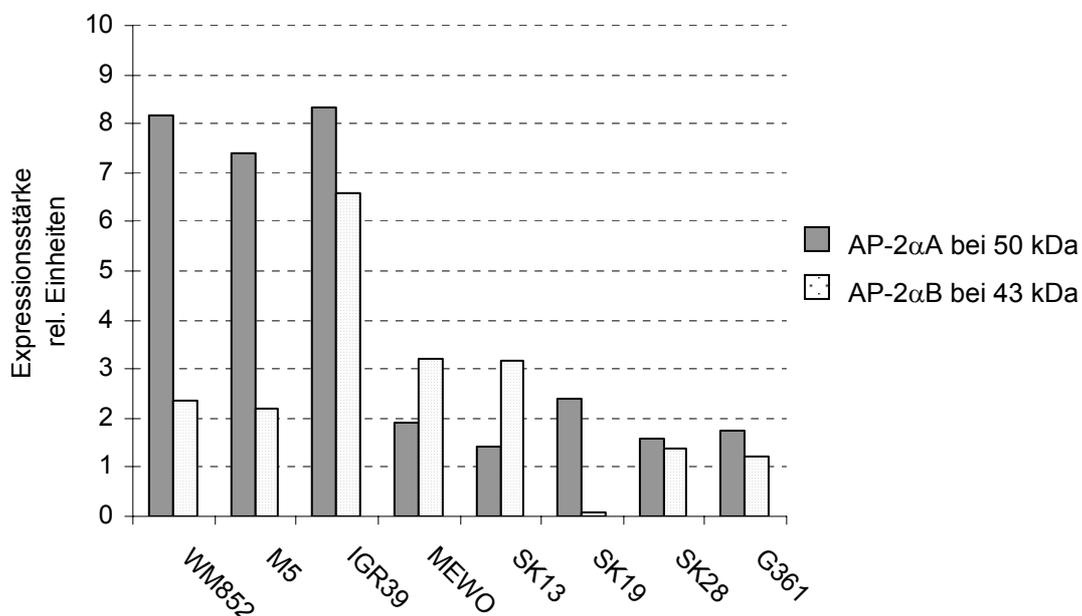


Abb. 35: Vergleich der Protein-Expression von AP-2 α A und AP-2 α B mit dem Antikörper H-79 in metastatischen Melanomzelllinien

Auch bei den metastatischen Melanomzelllinien sind die Unterschiede zwischen den beiden AP-2 α Formen sehr groß (siehe Abb. 35). Der größte Unterschied zwischen den beiden Formen liegt bei der Zelllinie SK19. Bei dieser Zelllinie konnte beinahe keine Expression von AP-2 α B gemessen werden.

Bei den Zelllinien WM852 und M5 besteht ebenfalls ein relativ großer Unterschied. Am geringsten fällt der Unterschied zwischen den beiden AP-2 α Formen bei den Zelllinien IGR39, SK28 und G361 aus. Bei diesen drei Zelllinien überwiegt auch die AP-2 α A Expression über die Expression der AP-2 α B.

Nur bei den Zelllinien MEWO und SK13 überwiegt die Expression von AP-2 α B über die AP-2 α A Form.

3.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Mit Hilfe der Immunhistologie ist es möglich die Lokalisation eines Genproduktes innerhalb des Gewebes, den Zelltyp und die Lokalisation innerhalb der Zelle zu bestimmen.

Bei dem Nachweis von AP-2 α A in verschiedenen Geweben war vor allem die Lokalisation innerhalb der Zellen und die Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Geweben interessant.

3.3.1 Immunhistologischer Nachweis von AP-2 α im Melanomgewebe

Zum Nachweis von AP-2 α -Protein in menschlicher Haut kam die Immunhistologie zur Anwendung. Karjalainen et al. konnten 1998 eine AP-2 α Proteinexpression sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma von Melanomzellen nachweisen.

Die Lokalisation des Transkriptionsfaktors scheint dabei von der Position des Zellzykluses oder des Phosphorylierungsstatus abhängig zu sein (Karin und Hunter, 1995). Die cytoplasmatische Expression könnte dabei den Transkriptionsfaktor in einer latenten Form repräsentieren, die bereit ist in den Nukleus transportiert zu werden. Aus diesem Grund war es sehr interessant, wo sich AP-2 α Protein in verschiedenen Geweben nachweisen ließ.

Nach Austestung mehrerer Vorbehandlungsschritte wurden ebenfalls verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Konzentrationen ausgetestet. Da man davon ausging, dass sich AP-2 α A meist im Nukleus befand, mussten Verfahren zur Vorbehandlung der Schnitte getestet werden, die eine

Kernfärbung erlaubten. Die Vorbehandlung mit Proteinase K und das Kochen der Paraffinschnitte mit Demaskierlösung im Dampfkochtopf und in der Mikrowelle ergaben nur unbefriedigende Ergebnisse.

Wohingegen das Kochen der Schnitte mit Citratpuffer im Dampfkochtopf gute Ergebnisse erzielte. Die Ermittlung der besten Konzentration der beiden Erstantikörper gestaltete sich etwas schwierig.

Dazu wurden die Konzentrationen des C-18 Antikörpers von 1:1000 bis 1:4000 und des C-17 Antikörpers 1:500 bis 1:3500 variiert. Die weiter verwendete Konzentration von C-18 betrug 1:2500. Paraffinschnitte von Nävi-, SSM-, NMM- und Metastasengewebe wurden zunächst mit einem 1,5%-igen normalem Ziegen-Serum blockiert und danach mit dem Erstantikörper C-18 gefärbt. Als Zweitantikörper diente ein biotinierter Anti-Kaninchen Antikörper.

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die hier untersuchten Paraffinschnitte.

Einteilung	Präparat- Nummer	Diagnose	Befunder
Nävus	19719/00	Stark pigmentierter, lentiginöser, dysplastischer melanozytärer Nävus vom Junctionstyp	G.M.
	19721/00	Lentiginöser melanozytärer Nävus vom Compoundtyp	G.M.
	19866/00	Congenitaler melanozytärer Nävus vom Compoundtyp	C.G.
	1978/97	Compound-Nävus	H.B.
	4644/99	Kongenitaler melanozytärer Nävus	C.G.
	19833/00	Dermaler melanozytärer Nävus	G.M.
SSM	12833/01	Superfiziell spreitendes malignes Melanom, Clark Level III, Breslow TD 0,35mm	G.M.
	12705/01	Superfiziell spreitendes malignes Melanom, Clark Level III, Breslow TD 0,54mm	G.M.
	11995/01	Superfiziell spreitendes malignes Melanom, Clark Level IV, Breslow TD 0,94mm	G.M.
	19563/00	Superfiziell spreitendes malignes Melanom, Clark Level IV, Breslow TD 0,92mm	G.M.
	19023/00	Superfiziell spreitendes malignes Melanom, Clark Level IV, Breslow TD 1,8mm	C.G.

	19226/00	Superfiziell spreitendes malignes Melanom, Clark Level IV, Breslow TD 0,83mm	G.M.
NMM	12027/98	Noduläres malignes Melanom, Clark Level III, beginnend Level IV, Breslow TD 1,35mm	G.L.
	12545/01	Noduläres malignes Melanom, Clark Level IV, Breslow TD 1,85mm	G.M.
	16692/98	Noduläres malignes Melanom, Clark Level IV, Breslow TD 3,1mm	G.L.
	12840/98	Noduläres malignes Melanom, Clark Level V, Breslow TD 10mm, mit kleiner Satellitenmetastase	G.L.
	10687/99	Noduläres malignes Melanom, Clark Level V, Breslow TD 11mm	G.L.
	1799/99	Noduläres malignes Melanom, Clark Level V, Breslow TD 14 mm, zwei subkutane Satellitenmetastasen	G.L.
Metastasen	8990/01	Kutane Metastase eines malignen Melanoms	C.S.
	11890/01	Große dermale/subkutant Melanommetastase	G.M.
	11295/01	Knotige Melanommetastase in der Subkutis	G.M.
	2295/01	Subkutane Melanommetastase	G.M.
	1390/01	Metastase eines malignen Melanoms	C.G.
	1391/01	Metastase eines malignen Melanoms	C.G.

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Gewebeblöcke und die Diagnosen

Es wurden jeweils sechs verschiedene Paraffinschnitte von den unterschiedlichen Geweben angefärbt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden aus den gesamten gefärbten Schnitten je einer für die übrigen repräsentativ dargestellt.

Zellen, die AP-2 α exprimieren, wurden durch die Färbung rot angefärbt. Die Zellkerne wurden mit Heamatoxylin gegengefärbt. Wie in den unten aufgeführten Schnitten zu erkennen ist, zeigten die Nävuszellen eine deutliche rote Färbung des Nukleus, d.h. sie exprimieren AP-2 α zu circa 80%. Bei den superfiziell spreitenden Melanomen zeigte sich eine deutlich schwächere Kernfärbung, die Färbung des Cytoplasmas mit AP-2 α war deutlich stärker.

Diese Tendenz trat bei den Nodulären Melanomen deutlicher hervor. Hier wurden nahezu alle Melanomzellen im Cytoplasma positiv. Die Kerne waren nur zu circa 50% positiv für AP-2 α .

Leider färbten sich die Paraffin-Schnitte aus Metastasen nur sehr gering an, so dass eine Beurteilung der Kern-Plasmarelation erschwert wurde. Bei den Metastasen-Schnitten musste eine längere Färbedauer eingehalten werden. Dabei zeigte sich ebenfalls ein Überwiegen des positiven Cytoplasmas, circa 70% positives Cytoplasma. Auf Grund der längeren Färbedauer war davon auszugehen, dass insgesamt weniger AP-2 α in den metastatischen Zellen exprimiert wird.

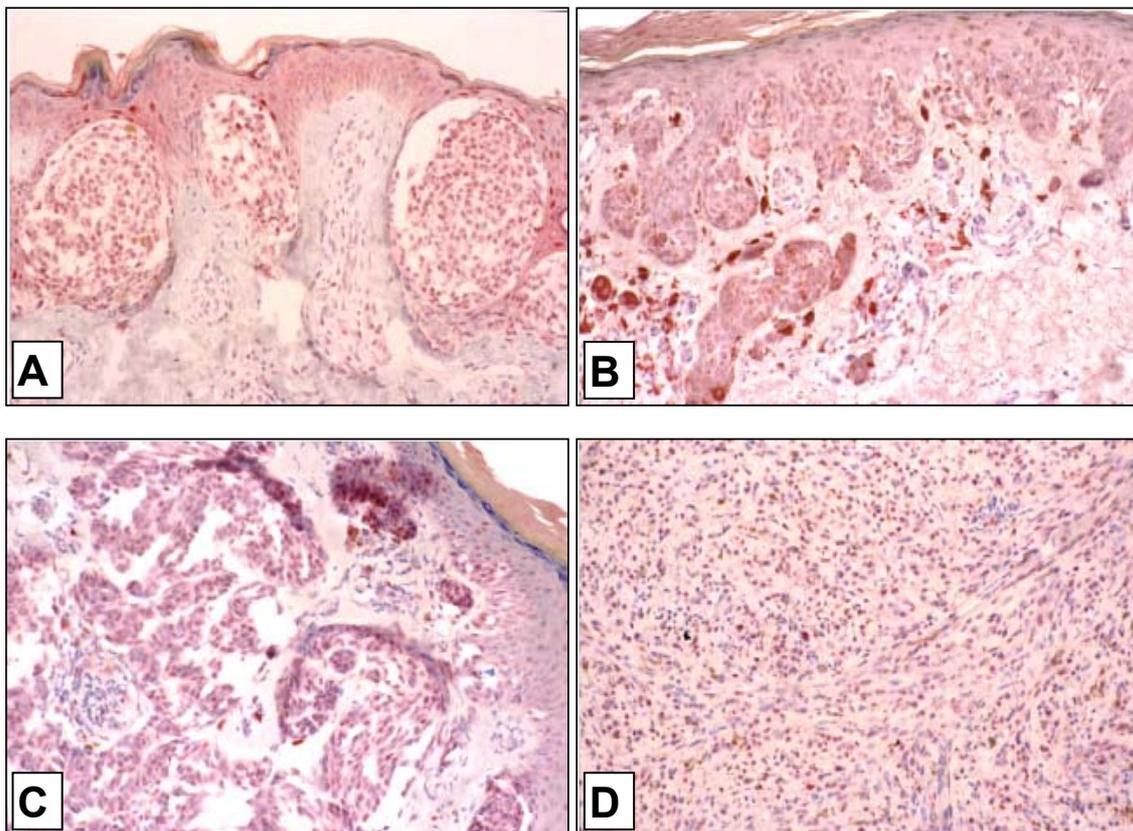


Abb. 36: Immunhistologie von Paraffinschnitten menschlicher Haut von exzidiertem Nävus (A), SSM (B), NMM (C) und Metastase (D)

3.3.2 Nachweis von AP-2 α in Melanomgewebe über Konfokale Laserscanningmikroskopie

Zur Bestätigung der immunhistologischen Färbungen in Hinsicht auf die Lokalisation von AP-2 α im Gewebe und auf die Expressionsstärke, wurde die konfokale Laserscanningmikroskopie benutzt. Dazu wurden Paraffinschnitte von menschlicher Haut zunächst mit dem polyklonalen Anti-AP-2 α A-Antikörper C18 gefärbt und anschließend mit einem Esel Anti-Kaninchen Antikörper fluoreszent markiert, der an den Farbstoff Cy5 gekoppelt ist.

Um eine bessere morphologische Auflösung der Tumor- und nicht-Tumor-Zellen zu erhalten, wurden die Tumorzellen mit einem gegen Melan A gerichteten Antikörper gefärbt, der wiederum mit einem Esel Anti-Maus Antikörper detektiert wurde, und an den der Farbstoff Cy3 gekoppelt ist. Ebenso wurden die Kerne mit dem Kernfarbstoff YOPRO gefärbt.

Über die konfokale Laserscanningmikroskopie konnte noch deutlicher gezeigt werden, was bei den immunhistologischen Färbungen schon vermutet wurde. Diese Tests zeigten bei Nävi AP-2 α A positive Zellkerne und negatives Cytoplasma (Abb. 37 (A)).

Bei superfiziell spreitenden Melanomen waren ebenfalls nahezu alle Melan A exprimierenden Zellen im Zellkern für AP-2 α A positiv und beginnend gering auch im Cytoplasma (Abb.37 (B)).

Bei nodulären malignen Melanomen wurde AP-2 α A ebenso stark im Kern, als auch im Cytoplasma nachgewiesen (Abb. 37 (C)).

Eindeutig wiesen metastatische Zellen nur noch eine AP-2 α A Expression im Cytoplasma auf (Abb. 37 (D)).

Aus Gründen der Übersicht werden auch hier nur ausgewählte immunhistologischen Färbungen dargestellt.

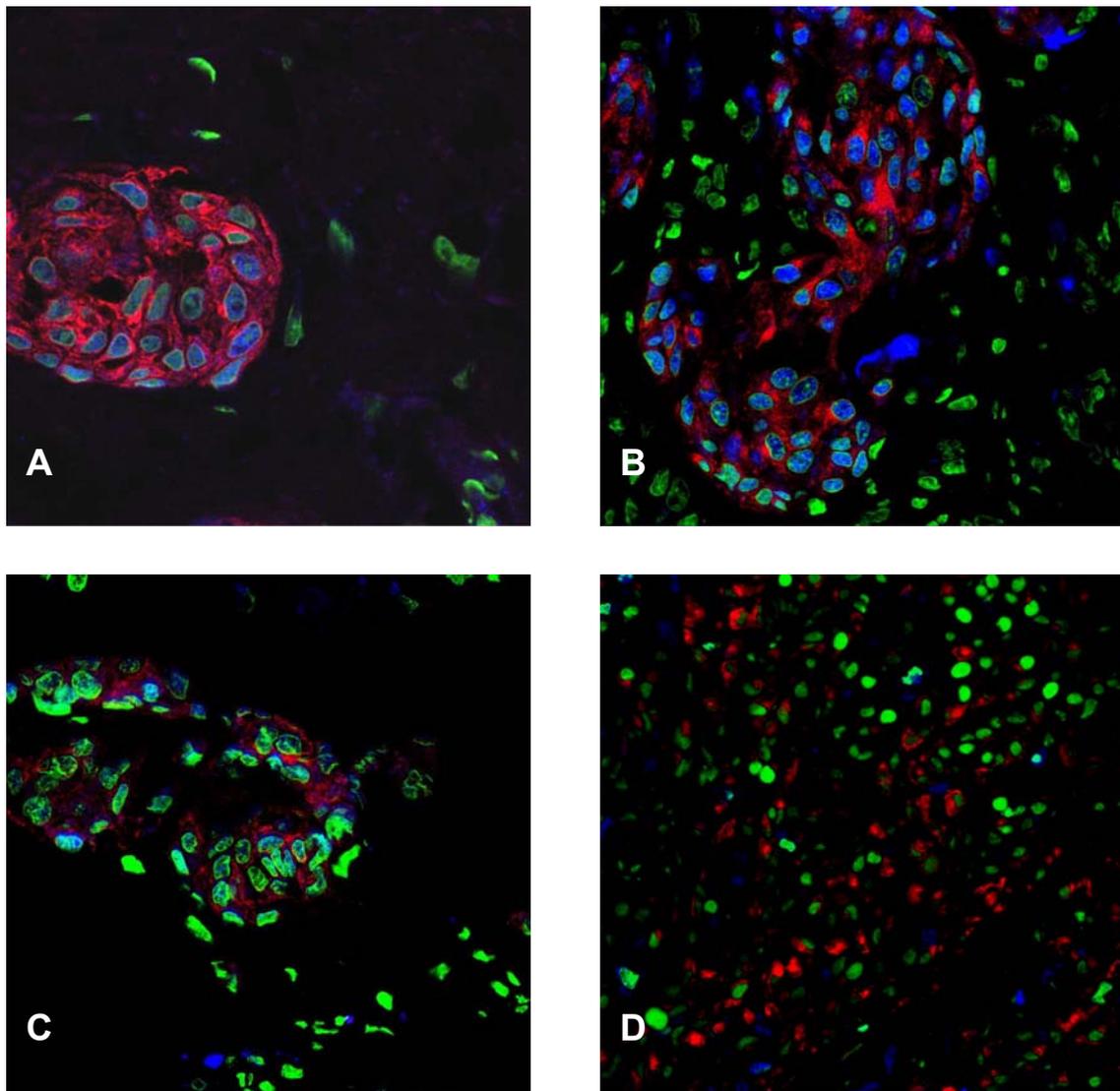


Abb. 37: Konfokale Laserscanningmikroskopie von Paraffinschnitten menschlicher Haut von exzidierten Nävus (A), SSM (B), NMM (C) und Metastase (D). AP-2 α -positive Zellen sind blau und Melan A-positive Zellen rot gefärbt. Zellkerne sind mit dem Kernfarbstoff YOPRO grün gefärbt. Die Originalvergrößerung ist 800fach. AP-2 α Expression (blau) ergibt mit Hilfe von YOPRO (grün) durch Kolokaisation blau-grün.

Bei den Nävuszellen stellte sich die AP-2 α -Expression nahezu nur in den Zellkernen dar, das durch die Blaufärbung hervorgehoben wurde. Die dargestellten superfiziell spreitenden Melanomzellen verhielten sich ähnlich (Ausschnitt B der Abbildung 37).

Die Expression von AP-2 α in Nodulären Melanomen war nicht mehr streng auf die Kerne beschränkt, wie Ausschnitt C der Abbildung 37 zeigt. Die Blaufärbung ist hier im Vergleich zu den Nävuszellen deutlich schwächer und kann auch in geringem Maße im Cytoplasma nachgewiesen werden.

Bei den metastatischen Zellen konnte AP-2 α nahezu nur noch im Cytoplasma nachgewiesen werden. Eine Kernfärbung war in den untersuchten Schnitten nicht von der Hintergrundfärbung abzugrenzen.

Zusätzlich zu diesen Paraffinschnitten wurden Schnitte von folgenden Hautrekonstrukten gefärbt:

Bezeichnung	Inhalt
Wistar TSR 26-2	SBCL2 + β_3 /Ad5
Wistar TSR 26-3	Negativ-Kontrolle
TSR 49-1	Melanozyten + bFGF/Ad5
TSR 49-6	Negativ-Kontrolle

Tab. 7: Verwendete Hautrekonstrukte

Die Färbung der Hautrekonstrukte gestaltete sich sehr schwierig, da die Schnitte meist der Vorbehandlung nicht standhielten und es nur eine geringe Anzahl an anzufärbenden Zellen gab. Nach einigen Versuchen konnten folgende Bilder festgehalten werden (siehe Abb. 38).

Dabei färbte sich die Epidermis in allen Rekonstrukt-Versuchen diffus mit AP-2 α an. Eine Expression von AP-2 α in den SBCL2-Zellen war nur im Zellkern nachweisbar. Bei den Melanozyten färbte sich das Cytoplasma eher diffus mit AP-2 α an.

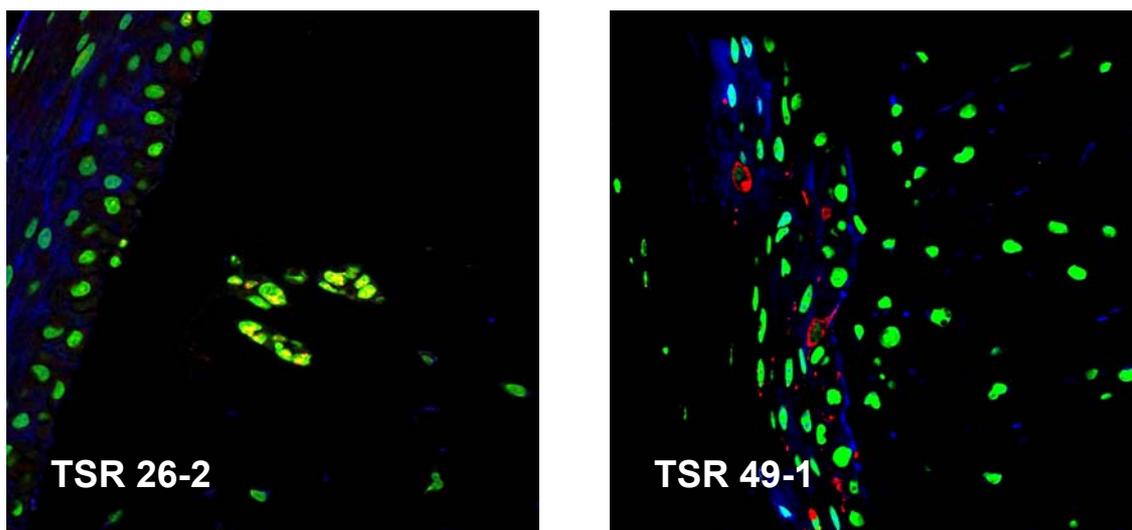


Abb. 38: Konfokale Laserscanningmikroskopie von Paraffinschnitten von Hautrekonstrukten mit SBCL2 (**TSR 26-2**) und Melanozyten (**TSR 49-1**) geimpften Zellen. AP-2 α -positive Zellen sind blau und Melan A-positive Zellen rot gefärbt. Zellkerne sind mit dem Kernfarbstoff YOPRO grün gefärbt. Die Originalvergrößerung ist 800-fach. AP-2 α Expression (blau) ergibt mit Hilfe von YOPRO (grün) durch Kolokaisation blau-grün.

Es wurde ein weiterer objektiverer Nachweis für die AP-2 α Expression in melanozytären Zellen erbracht. Durch eine Expressionsanalyse verschiedener Schnitte kann man nachweisen, dass die Expressionsstärke in melanozytären Zellen stärker ist als in nicht melaninhaltigen Zellen.

Dazu wurde ein bereits gefärbter Paraffinschnitt eines Superfiziell Spreitenden Melanoms herangezogen.

Zunächst wurde eine möglichst repräsentative Linie durch den Schnitt gezogen. Dabei galt es darauf zu achten, dass man ausreichend Zellkerne durch die Linie anschneidet. Entlang dieser Linie konnte dann eine Expressions-Analyse erstellt werden.

Beim unten aufgeführten Beispiel wurde eine Linie von Punkt A nach Punkt B gezogen (siehe Abb. 39). Betrachtet man nun die dazugehörige Expressions-Analyse von A nach B, erkennt man klar eine Intensitätsabnahme der AP-2 α -Expression (blau). Am Beginn der Expressions-Linie wurden stark Melan A

positive Zellen angefärbt. Die einzelnen Expressionsspitzen von AP-2 α (blau) und YOPRO als Kernfärbung (grün) verlaufen bis auf deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke gleichartig. AP-2 α wird in nicht melaninhaltigen Zellen nur halb so stark exprimiert (am Ende der Expressionsstrecke), wie in melanozytären Zellen (zu Beginn der Expressionsstrecke).

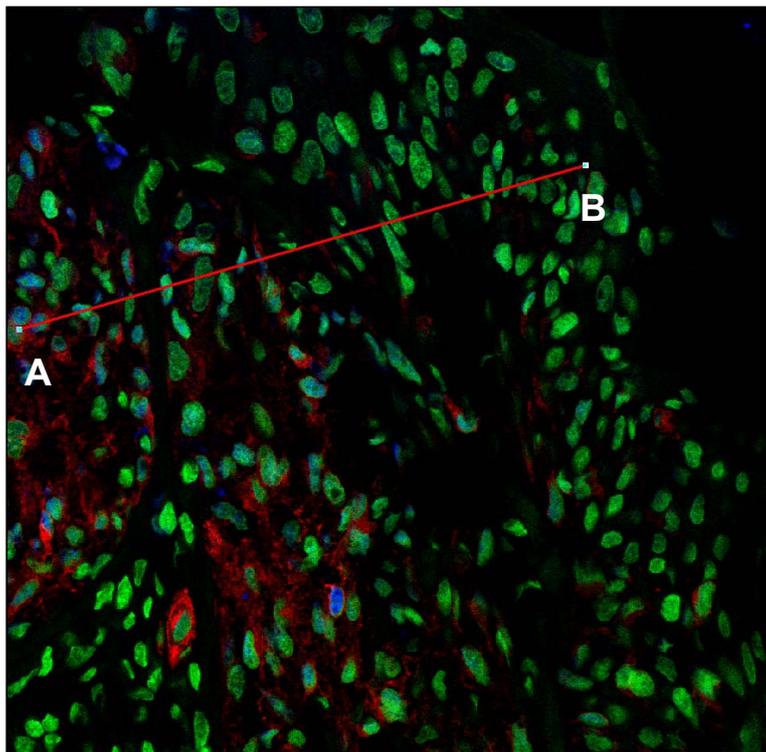


Abb. 39: Konfokale Immunfluoreszenz eines Superfiziell Spreitenden Melanoms in der Expressionsprofil-Analyse. Die rote Linie gibt die Messstrecke von A nach B an. AP-2 α -positive Zellen sind blau und Melan-A-positive Zellen sind rot gefärbt. Zellkerne sind mit dem Kernfarbstoff YOPRO grün gefärbt. Die Originalvergrößerung ist 60 fach.

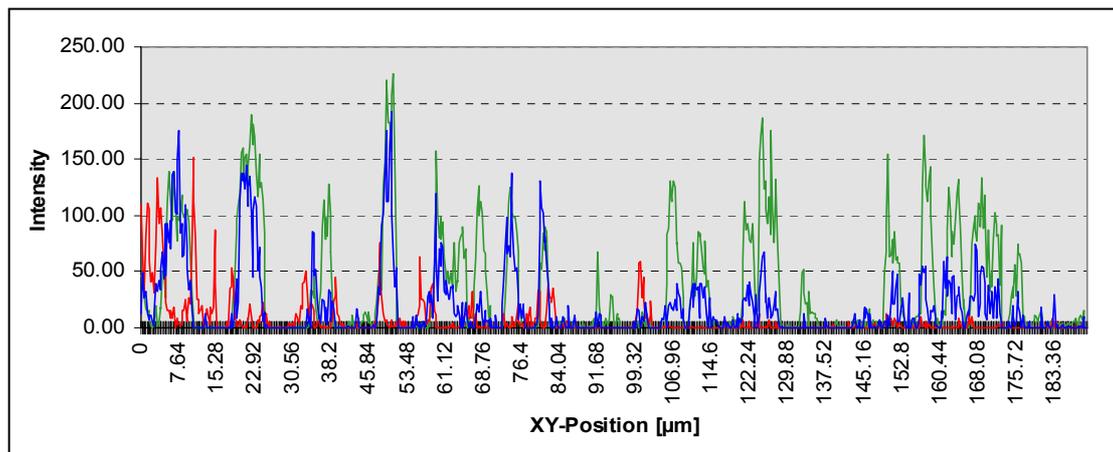


Abb. 40: Expressions-Analyse der unter Abb. 39 gezeigten Konfokalen Immunfluoreszenz eines Superfiziell Spreitenden Melanoms.

Diese Intensitätsanalyse beweist deutlich, dass die AP-2 α Expression stärker in melaninhaltigen Zellen vertreten war und im superfiziell Spreitenden Melanom noch auf den Zellkern beschränkt ist.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von AP-2 α in der Entwicklung und der Progression des malignen Melanoms untersucht.

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von AP-2 α in metastatischen Melanomzellen eine Verminderung und Herunterregulierung von c-Kit, MCAM/MUC18 und MMP-2 Genen verursacht. Zusätzlich sind zahlreiche Gene in der Progression des malignen Melanoms involviert, wie z.B. E-Cadherin, p21, HER-2, BCL-2, PAR-1 und insulin like growth factor.

Es zeigte sich, dass die Expression von AP-2 α einen bedeutenden Anteil bei der Entstehung und Entwicklung zum malignen Melanom einnimmt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass AP-2 α mit mehreren Genen in Verbindung steht. Diese spielen eine Rolle bei der Proliferation, der Zell-Zyklus Regulation, der Apoptose, der Adhäsion und der Invasion.

Aus diesem Grund war eine Untersuchung der AP-2 α Expression auf RNA und Proteinebene von Bedeutung und interessant.

Die erwartete Herunterregulierung von AP-2 α beim Übergang von radial wachsenden zu vertikalwachsenden bis hin zu metastatischen Melanomzelllinien konnte nicht beobachtet werden. Dies trifft sowohl für die Untersuchungen auf RNA-Ebenen als auch für die Untersuchungen auf Proteinebene zu.

Eine Herunterregulierung von AP-2 α A konnte jedoch eindeutig in vivo nachgewiesen werden. In situ konnte mit Hilfe von Immunhistologie und konfokaler Laserscanningmikroskopie eine deutliche Herunterregulierung der AP-2 α Expression im Verlauf der Melanomprogression beobachtet werden. Dabei war eine Verschiebung der Lokalisation des AP-2 α Proteins zu beobachten. Während bei Nävuszellen und Primärmelanomen AP-2 α vermehrt im Kern nachweisbar war, fand sich das AP-2 α Protein im malignen Melanom und insbesondere in metastatischen Zellen vorwiegend im Cytoplasma. In metastatischen Melanomzellen war AP-2 α nahezu nicht mehr nachweisbar.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch den Expressionsverlust von AP-2 α die Invasionsfähigkeit der Melanomzellen ansteigt.

4.2 Expressionsprofil von AP-2 α A und AP-2 α B in verschiedenen Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden vier RGP (Radial Growth Phase), zwei VGP (Vertical Growth Phase), zwei hochaggressive Melanomzelllinien mit einer Nävuszelllinie, primäre Melanozyten und weiteren Karzinomzelllinien verglichen.

Buettner et al. gelang es (1993), ein alternativ gesplichtetes Protein von AP-2 α , AP-2 α B, zu klonieren. AP-2 α B verhält sich dominant-negativ zu AP-2 α A. Transfektionsversuche mit AP-2 α B in AP-2 α A positiven Zellen konnten ein gesteigertes Tumorwachstum in vivo nachweisen (Gershenwald et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden die Splice-Formen AP-2 α A und AP-2 α B mit Hilfe von RT-PCR und Western Blots untersucht. Geht man von zahlreichen Publikationen aus, sollte man in Zelllinien mit hoher AP-2 α A-Expression eine geringe Expression von AP-2 α B vorfinden. Dieses Verhältnis konnte nicht nachgewiesen werden. Es ergab sich hinsichtlich der AP-2 α -Expression eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Western-Blots und denen der PCR-Analyse. Während die Ergebnisse bei den radial- und vertikalwachsenden Melanomzelllinien sehr unterschiedlich sind, zeigten die meisten metastatischen Melanomzelllinien jedoch eine geringfügig stärkere Expression der AP-2 α A-Form, das man sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene nachweisen kann. Es konnte in einigen Studien am Beispiel von nur wenigen Zelllinien experimentell nachgewiesen werden, dass durch den Übergang der Melanomzelle von der radial- hinüber zu der vertikalwachsenden Phase ein Verlust der AP-2 α Expression stattfindet (Bar-Eli, 1997). Eine verminderte AP-2 α A Expression wurde bei der malignen Transformation und Tumorprogression des malignen Melanoms beobachtet (Karjalainen et al., 1998). Die dominant-negative Form AP-2 α B steigert durch Aktivierung von MMP-2 die Invasion und das Tumorwachstum in vivo (Bar-Eli, 2001; Gershenwald et al., 2001; Bar-Eli, 1999). Klinische Studien konnten eine Korrelation zwischen dem Verlust von

AP-2 α Expression und der Tumorprogression von malignen Melanomen im Stadium I nachweisen (Karjalainen et al., 1998). Jean et al. (1998) konnten in nicht metastatischen Zelllinien (SB-2 und Hel-889) eine AP-2 α RNA Expression nachweisen. Wohingegen metastatische Zelllinien wie A375P, A3759M und WM-266u negativ für AP-2 α waren.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit sind vermutlich aus folgenden Gründen unterschiedlich zu den bereits publizierten Ergebnissen.

Dabei wurden die Primer für AP-2 α A so gewählt, dass ein circa 1,4 kb grosses cDNA Stück synthetisiert wurde. Mit den Primern für AP-2 α B konnte ein 300 bp grosses Fragment von AP-2 α B synthetisiert werden, dass sich seinen 3'-Ende von AP-2 α A unterscheidet. Die Synthetisierung eines 300 bp großen cDNA Fragmentes war sicher einfacher als die Synthetisierung des vollen Länge Klons von AP-2 α A. Um die Expression von AP-2 α A und AP-2 α B besser vergleichen zu können, sollten nahezu gleich große Fragmente synthetisiert werden. Eine Untersuchung zur Expressionsstärke ist bisher ebenfalls nicht erfolgt.

Um nun die Expression von AP-2 α A und AP-2 α B auf Proteinebene zu vergleichen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Das alternativ gesplice AP-2 α B Protein unterscheidet sich in seinem C-Terminus von AP-2 α A und verhält sich als dominat-negativer Modulator von AP-2 α A (Buettner et al., 1993).

In dieser Arbeit kommen zwei unterschiedliche Antikörper gegen AP-2 α zum Einsatz. Der C-18 Antikörper sollte nur die AP-2 α A Form erkennen. Wohingegen H-79 beide Formen erkennen sollte. Dieser Antikörper bindet mit seiner Bindungsstelle ein rekombinantes Protein, dass in der inneren Region von beiden Formen von AP-2 α vorkommt.

In den vorliegenden Ergebnissen konnte die AP-2 α A Expression auch in metastatischen Melanomzelllinien nachgewiesen werden. Dieses widerspricht einigen Publikationen (Huang et al., 1998). Die AP-2 α A Expression wird durch die beiden verschiedenen Antikörper unterschiedlich in den einzelnen Zelllinien gemessen. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte ein verschieden starkes Bindungsverhalten an die beiden AP-2 α Formen sein.

Auch die Auswertung gestaltete sich schwierig, da die beiden Banden bei 50 kDa für AP-2 α A und 43 kDa für AP-2 α B sehr eng beieinander lagen und sich teils gegenseitig überstrahlten. Dieses konnte oft nicht durch das Scanprogramm von BIO-RAD kompensiert werden. Sicher ist jedoch, dass auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit, man nicht von einer konstanten Runterregulierung von AP-2 α A beim Übergang von radialwachsenden Zelllinien über vertikalwachsenden Zelllinien bis hin zu metastatischen Zelllinien ausgehen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den Pigmentzellen und diversen Melanomzelllinien auch eine Reihe anderer Tumorzelllinien auf die AP-2 α A und AP-2 α B-Expression hin untersucht, wie etwa einige Kolonkarzinom-Zelllinien, ein Mammakarzinom, ein Blasenkarzinom, ein Retinoblastom sowie ein Pleuramesotheliom. Dabei zeigte sich, dass eine geringe RNA- und Protein-Expression von AP-2 α A und AP-2 α B in den Kolonkarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden konnte.

Über Northern-Blot Analysen konnte die RNA Expression von AP-2 α einiger Zelllinien untersucht werden. Die Northern Blot Membranen sind mit einer 28S-Sonde und mit einer β -Actin-Sonde hybridisiert worden, um die Integrität der RNA und die Menge der geladenen RNA zu verifizieren. In den durchgeführten Northern-Blot Analysen zeigte sich eine Abnahme der AP-2 α -Expression von der radialwachsenden zur vertikal wachsenden bis hin zu metastatischen Melanomzelllinie. Dies entspricht auch einer Untersuchung von Karjalainen et al. (2000). Dabei konnte AP-2 α mRNA auch in Tumorgewebe festgestellt werden, obwohl in dem jeweiligen Melanom eine reduzierte AP-2 α Proteinexpression nachgewiesen wurde. Deshalb wird vermutet, dass die mRNA und die Protein-Expression entkoppelt werden kann. Dieses kann verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte die AP-2 α mRNA durch posttranskriptionelle Prozesse des mRNA-Transkripts oder durch spezifische RNA-Interaktionen nicht adäquat translatiert werden (Day und Tuite, 1998; Kleijn et al., 1998). Zum anderen könnten AP-2 α B oder Inhibitoren der Translation (Wang et al., 1997; Liu und Redmond, 1998) als Translationsrepressoren wirken.

4.3 Vergleich der Expression von AP-2 α in Melanomzelllinien und in situ Melanompräparaten

Die Expressionen von AP-2 α Protein konnte über Immunhistologie in Nävi, SSM, NMM, Metastasen und Hautrekonstrukten nachgewiesen werden.

Wenn man davon ausgeht, dass die cytoplasmatische Form des Transkriptionsfaktors AP-2 α in seiner latenten, d.h. der inaktiven Form darstellt, müsste bei hochmetastatischen Zellen AP-2 α vermehrt im Cytoplasma und damit verringert im Kern nachgewiesen werden können.

Bei einfachen Melanozyten, die noch nicht in den malignen Transformationsprozess eingetreten sind, müsste demnach AP-2 α meist im Nukleus, und damit in der aktiven Form vorhanden sein.

Diese Hypothese konnte durch die immunhistologischen Versuche dieser Arbeit bestätigt werden. Die Kern-Plasma Relation von AP-2 α verschiebt sich zu Gunsten des Plasmas, je weiter die Zellen im malignen Transformationsprozess vorangeschritten waren.

Karjalainen et al. konnten 1998 eine AP-2 α Proteinexpression sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma von Melanomzellen nachweisen. Wobei in Tumorzellen eine weitaus geringere AP-2 α Expression im Vergleich zu normaler Epidermis nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich konnte bei ansteigender Tumordicke, höherem Clark Level und pT-Stadium eine verminderte Expression von AP-2 α festgestellt werden. Daraus kann man ableiten, dass eine Verminderung der AP-2 α Expression in Verbindung mit der malignen Transformation und der Tumorprogression bei malignen Melanomen im Stadium I steht. Nukleäre und cytoplasmatische Expression von AP-2 α konnte nicht nur in malignen Melanomen, sondern auch in Gewebe von Ovarial-Karzinomen (Anttila et al., 2000), Kolorektalen Karzinomen (Ropponen et al., 2001) und in Medulloblastomgewebe (Gilbertson et al., 1997) nachgewiesen werden. Verminderte nukleäre AP-2 α Expression konnte beim Mamma-Karzinom mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden (Gee et al., 1999). Immunhistologisch konnten Ropponen et al. in Kolorektalen Karzinomen eine verminderte Expression von AP-2 α im Cytoplasma bei weit fortgeschrittenen Tumoren nachweisen.

4.3 Vergleich der Expression von AP-2 α in Melanomzelllinien und in situ Melanompräparaten 109

In einer großen Studie zum Mamma-Karzinom wurde die Expression von AP-2 α und HER2 immunhistochemisch untersucht. Dabei ergab sich eine schlechte Prognose bei Patientinnen, die HER2-positiv und AP-2 α -negativ getestet wurden, wohingegen Patientinnen mit HER2-negativen und AP-2 α -positiven Karzinomen eine längere Überlebensrate zeigten (Pellikainen et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse der Immunhistologischen Untersuchungen zur AP-2 α Expression zusätzlich durch die konfokale Laserscanningmikroskopie bestätigt werden. Es konnte eindrücklich an Nävus-, superfiziell spreitendem, nodulärem Melanom- und Metastasengewebe nachgewiesen werden, dass AP-2 α sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma exprimiert wird. Die AP-2 α Expression nimmt jedoch im Vergleich zu den Nävuszellen stetig ab und kann in den metastatischen Zellen nahezu nur noch im Cytoplasma nachgewiesen werden. Auch in Untersuchungen von Hautrekonstrukten mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie konnte AP-2 α im Nukleus von SBC12 Zellen nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, wie sich AP-2 α -negative Zellen nach Transfektion mit AP-2 α in Hautrekonstrukten verhalten. Der mit der Melanomprogression korrelierende Expressionsverlust von AP-2 α wurde von Woenckhaus et al. (2003) in stärkstem Maße in den dermalen Schichten von Primärmelanomen gefunden.

Es ist bekannt, dass AP-2 α außer c-Kit auch MUC18, E-Cadherin, MMP-2 sowie p21 reguliert und beim Tumorwachstum und der Metastasierung so eine Rolle spielt (Bar-Eli, 2001; Jean et al., 1998a). Ein Verlust von AP-2 α löst eine Überexpression von MelCAM/MUC18, MMP-2 und PAR-1 (Tellez und Bar-Eli, 2003) aus. Eine verminderte AP-2 α Expression korreliert wiederum mit einer geringen p21/WAF1, E-Cadherin und c-Kit Expression (Baldi et al., 2001).

Außerdem konnte festgestellt werden, dass bei c-Kit-positiven Melanomzellen durch den c-Kit-Liganden SCF Apoptose getriggert werden konnte. Der Verlust der c-Kit-Rezeptorexpression in Melanomzellen führt wahrscheinlich dazu, dass sich die Melanomzellen der SCF/c-kit-vermittelten Apoptose entziehen. Dies könnte das Tumorwachstum und letztlich die Metastasierung erleichtern (Huang et al., 1996b). Ein Hinweis hierfür findet sich in der von Takahashi et al. (1995) durchgeführten immunhistologischen Studie, in welcher eine c-Kit-Expression in

epidermalen Nävuszellen und SCF-Expressionen in dermalen Komponenten von Nävi gezeigt wurde. Wohingegen bei Melanomen in nur einer von fünf Melanomzelllinien SCF und in keiner Melanomzelllinie c-Kit nachgewiesen werden konnte (Takahashi et al., 1995). Dieser Expressionsverlust der beiden Faktoren in Melanomzelllinien könnte möglicherweise zum Tumorwachstum beitragen.

4.4 AP-2 α als mögliche molekulare Zielstruktur bei der Melanomtherapie?

Da die Inzidenz und hohe Mortalitätsraten des malignen Melanoms in den letzten Jahren stetig zugenommen haben, ist eine frühzeitige Erkennung und Exzision der wichtigste Faktor bei der Behandlung des malignen Melanoms. Neben der operativen Therapie haben die postoperative adjuvante Chemotherapie, Immuntherapie, Radiotherapie und die biologische Therapie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Insbesondere immunologische Ansätze, wie die Tumolvaccine und adjuvante Therapie mit Interferon- α , wurden erfolgversprechend bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom eingesetzt. Es bestehen bereits verschiedene Versuchsansätze, die Chemotherapie mit biologischer Therapie, wie z.B. Interleukin-2, Interferon- γ und Interferon- α , zu kombinieren (Lugovic et al., 2005). Über einen rekombinantes Adenovirus Ad-AP2, der funktionales AP-2 α exprimiert, konnte bereits der Zellzyklus in der G1-Phase gestoppt werden. Das Tumorwachstum verschiedener Karzinomzelllinien konnte durch Induktion von Apoptose gestoppt werden. Zusätzlich zeigten die Karzinomzelllinien eine erhöhte Chemosensibilität auf Chemotherapeutika wie Adriamycin und Cisplatin (Wajapeyee und Kumaravel, 2003).

Der wichtigste prognostische Faktor bezüglich der Überlebensrate beim malignen Melanom ist nach klinischen Studien die Tumordicke nach Breslow, gefolgt von dem Ergebnis der Sentinel-Lymphknotenbiopsie (Moehrle et al., 2004).

Nicht nur beim malignen Melanom hat AP-2 α eine prognostische Funktion. Exprimieren Mamma-Karzinomzellen AP-2 α und sind sie negativ für HER2

bedeutet das Studien zu Folge eine bessere Prognose und länger Überlebenszeit (Friedrichs et al., 2004; Pellikainen et al., 2004).

4.5 Perspektive

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von AP-2 α auf RNA und Proteinebene untersucht. Insbesondere wurde auf die beiden Splice-Formen von AP-2 α näher eingegangen. Diesbezüglich sind noch genauere Untersuchungen nötig.

Bei mehreren Neoplasien wird AP-2 α als potentielle therapeutische Zielstruktur in Betracht gezogen. In Studien konnte durch Infektion von Karzinomzelllinien mit einem rekombinanten Adenovirus eine erhöhte Chemosensibilität erreicht werden (Wajapeyee und Kumaravel, 2003). Der Einsatz von Adenoviren, insbesondere von Ad-AP2, sollte als therapeutische Option allein oder in Kombination mit Chemotherapie weiter untersucht werden. Effekte von Transfektionsversuchen mit AP-2 α A transfizierten Zellen sollten weiter in Hautrekonstrukten erfasst werden.

In Verbindung mit c-Kit wäre ein Apoptoseassay im Hautrekonstrukt und in Monolayerkultur interessant.

In weiteren Untersuchungen könnte man mit AP-2 α A oder AP-2 α B transfizierten Zellen eine Korrelation zwischen c-Kit oder MUC-18 über Western Blot Analysen untersuchen. Neben weiteren Erkenntnissen auf diesem Gebiet wird die Identifizierung durch weitere aktivierte Signalwege vermittelt durch AP-2 α möglicherweise alternative Zielstrukturen aufzeigen können.

Die verfügbaren Daten zeigten insgesamt, dass die Entstehung sowie die Progression des malignen Melanoms durch das komplexe Zusammenspiel vieler Faktoren und Signalwege gesteuert werden, die noch nicht ausreichend verstanden sind. Neue Einblicke in diese Mechanismen werden nötig sein, um Erfolge in der Melanomtherapie erzielen zu können. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet sind dringend erforderlich, denn die bislang verfügbaren Therapien konnten trotz allen Bemühungen beim Stadium IV-Melanom nur eine 10-Jahres-Überlebensrate von unter 1% erzielen.

5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor AP-2 α spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Expression von verschiedenen Genen, die für das Wachstum und die Progression des malignen Melanoms wichtig sind.

In bislang verfügbaren Arbeiten über AP-2 α wurde der Schwerpunkt größtenteils auf einzelne Funktionen von AP-2 α gelegt oder es wurde nur eine kleine Anzahl an unterschiedlichen Tumorzelllinien untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erstellung eines umfassenden Expressionsprofils von AP-2 α . Die AP-2 α -Expression wurde einerseits durch die Untersuchung einer Vielfalt an Zelllinien analysiert, die von Melanozyten über Nävi, Melanome mit radialen und vertikalen Wachstum hinweg bis hin zu Melanommetastasen und einigen anderen Tumorzelllinien sowie Nativgewebe und Hautrekonstrukte reichte. Andererseits wurde die Expressionsuntersuchung der Zelllinien auf verschiedenen Ebenen durchgeführt, dass bedeutet auf DNA-, RNA- und Proteinebene. Hierzu wurden die Methoden der PCR, des Northern Blottings, des Western Blottings, der Immunhistologie und der konfokalen Laserscanningmikroskopie angewandt.

Vor dem Hintergrund der bislang verfügbaren Daten sollte anhand dieser Zelllinien- und Methodenvielfalt untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der AP-2 α -Expression und der Progression des malignen Melanoms hergestellt werden kann. Von zentralem Interesse war hier die Frage, ob und zu welchem Zeitpunkt der Melanomprogression die Expression von AP-2 α verloren geht. Zusätzlich wurden die beiden unterschiedlichen Formen von AP-2 α , AP-2 α A und AP-2 α B, verglichen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine eindeutige Herunterregulierung von AP-2 α A auf DNA-Ebene beim Übergang von radial zu vertikal wachsenden und metastatischen Melanomzelllinien jedoch nicht gefunden werden. Mit Hilfe der proteinchemischen Methode des Western Blots konnten diese Ergebnisse ebenfalls bestätigt werden.

Weiter wurde untersucht, wie die alternative Splice-Form AP-2 α B in den verschiedenen Zelllinien exprimiert wurde. Dabei konnte keine Korrelation

zwischen der Expression von AP-2 α A und AP-2 α B festgestellt werden. In allen untersuchten Zelllinien konnte sowohl auf Protein-, als auch auf DNA-Ebene eine Expression von beiden AP-2 α Formen nachgewiesen werden.

In situ konnte mit Hilfe von Immunhistologie und konfokaler Laserscanningmikroskopie eine deutliche Herunterregulation der AP-2 α Expression im Verlauf der Melanomprogression beobachtet werden. Dabei fiel eine Verschiebung der Lokalisation des AP-2 α Proteins auf. Während bei Nävuszellen und Primärmelanomen AP-2 α vermehrt im Kern nachweisbar war, fand sich das AP-2 α Protein im malignen Melanom und insbesondere in metastatischen Zellen vorwiegend im Cytoplasma. In metastatischen Melanomzellen war AP-2 α nahezu nicht mehr nachweisbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch den Expressionsverlust von AP-2 α die Invasionsfähigkeit der Melanomzellen ansteigt.

Es konnte zudem noch gezeigt werden, dass Untersuchungen, die nur von Zelllinien ausgehen, möglicherweise ein artifizielles Ergebnis ergeben. Eine Herunterregulierung der AP-2 α -Expression konnte aber eindeutig in vivo nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Methode der PCR gelang es einen volle Länge Klon von AP-2 α A zu amplifizieren und anschließend in einen Vektor zu ligieren. Dieses Plasmid könnte man einsetzen, um weitere Zelllinien zu transfizieren damit diese AP-2 α überexprimieren. Das Verhalten der so veränderten Zellen kann man dann weiter in Hautrekonstrukten und immunhistochemischen Färbungen weiter untersuchen.

Abschließend kann man sagen, dass AP-2 α eine Schlüsselrolle bei der Regulation verschiedener Gene einnimmt, die im Tumorwachstum und bei der Metastasierung eine Rolle spielen. Es besteht eine negative Korrelation zwischen der Progression des malignen Melanoms und der Expression von AP-2 α Protein in vivo. Letztendlich ist die Regulation von AP-2 α A und die Rolle, die es bei der Tumorentstehung und Progression einnimmt, nicht eindeutig geklärt und sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

6 Literatur

Ahern, T. E., Bird, R. C., Bird, A. E., & Wolfe, L. G. (1993). Overexpression of c-erbB-2 and c-myc but not c-ras, in canine melanoma cell lines, is associated with metastatic potential in nude mice. *Anticancer Res.* 13, 1365-1371.

Albelda, S. M., Mette, S. A., Elder, D. E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., & Buck, C. A. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 50, 6757-6764.

Albino, A. P. (1992). The role of oncogenes and growth factors in progressive melanoma-genesis. *Pigment Cell Res. Suppl* 2, 199-218.

Albino, A. P., Shea, C. R., & McNutt, N. S. (1992). Oncogenes in melanomas. *J. Dermatol.* 19, 853-867.

Anttila, M. A., Kellokoski, J. K., Moisio, K. I., Mitchell, P. J., Saarikoski, S., Syrjanen, K., & Kosma, V. M. (2000). Expression of transcription factor AP-2alpha predicts survival in epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 82, 1974-1983.

Arnaout, M.A., Goodman, S.L., and Xiong, J.P. (2002). Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 641-651.

Bakker, T.R., Reed, D., Renno, T., and Jongeneel, C.V. (1999). Efficient adenoviral transfer of NF-kappaB inhibitor sensitizes melanoma to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Int. J. Cancer* 80, 320-323.

Balch, C. M., Buzaid, A. C., Soong, S. J., Atkins, M. B., Cascinelli, N., Coit, D. G., Fleming, I. D., Gershenwald, J. E., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J. M., McMasters, K. M., Mihm, M. F., Morton, D. L., Reintgen, D. S., Ross, M. I., Sober, A., Thompson, J. A., & Thompson, J. F. (2001a). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 19, 3635-3648.

Balch, C. M. & Lange, J. R. (2001b). Lymphatic mapping and sentinel node lymphadenectomy for cancer: an overview. *Ann. Surg. Oncol.* 8, 1S-4S.

Balch, C. M., Soong, S. J., Gershenwald, J. E., Thompson, J. F., Reintgen, D. S., Cascinelli, N., Urist, M., McMasters, K. M., Ross, M. I., Kirkwood, J. M., Atkins, M. B., Thompson, J. A., Coit, D. G., Byrd, D., Desmond, R., Zhang, Y., Liu, P. Y., Lyman, G. H., & Morabito, A. (2001c). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J. Clin. Oncol.* 19, 3622-3634.

Balch, C. M. & Cascinelli, N. (2001). The new melanoma staging system. *Tumori* 87, S64-S68.

Baldi, A., Santini, D., Battista, T., Dragonetti, E., Ferranti, G., Petitti, T., Groeger, A. M., Angelini, A., Rossiello, R., Baldi, F., Natali, P. G., & Paggi, M. G. (2001). Expression of AP-2 transcription factor and of its downstream target genes c-kit, E-cadherin and p21 in human cutaneous melanoma. *J. Cell Biochem.* 83, 364-372.

Bale, S.J. and Dracopoli, N.C. (1989). Chromosome 9p and hereditary cutaneous malignant melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 70.

Bale, S.J., Dracopoli, N.C., Tucker, M.A., Clark, W.H., Jr., Fraser, M.C., Stanger, B.Z., Green, P., Donis-Keller, H., Housman, D.E., and Greene, M.H. (1989). Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. *N. Engl. J. Med.* 320, 1367-1372.

Bao, W. & Stromblad, S. (2004). Integrin α -mediated inactivation of p53 controls a MEK1-dependent melanoma cell survival pathway in three-dimensional collagen. *J. Cell Biol.* 167, 745-756.

Bar-Eli, M. (1997). Molecular mechanisms of melanoma metastasis. *J. Cell Physiol* 173, 275-278.

Bar-Eli, M. (1999a). Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* 67, 12-18.

Bar-Eli, M. (1999b). Role of AP-2 in tumor 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.

Bauer, J. and 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. and Garbe, C. (2004). Risk estimation for malignant transformation of melanocytic nevi. *Arch. Dermatol.* 140, 127.

Bauer, R., Imhof, A., Pscherer, A., Kopp, H., Moser, M., Seegers, S., Kerscher, M., Tainsky, M. A., Hofstaedter, F., & Buettner, R. (1994). The genomic structure of the human AP-2 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 22, 1413-1420.

Bedogni, B., O'Neill, M.S., Welford, S.M., Bouley, D.M., Giaccia, A.J., Denko, N.C., and Powell, M.B. (2004). Topical treatment with inhibitors of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt and Raf/mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways reduces melanoma development in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 64, 2552-2560.

Bennet, W. M., Connacher, A. A., Scrimgeour, C. M., & Rennie, M. J. (1990). The effect of amino acid infusion on leg protein turnover assessed by L-[15N]phenylalanine and L-[1-13C]leucine exchange. *Eur. J. Clin. Invest* 20, 41-50.

Bennett, V. J. & Chang, P. L. (1990). Suppression of immunological response against a novel gene product delivered by implants of genetically modified fibroblasts. *Mol. Biol. Med.* 7, 471-477.

Berking, C., Takemoto, R., Satyamoorthy, K., Elenitsas, R., and Herlyn, M. (2001a). Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin. *Am. J. Pathol.* 158, 943-953.

Berking, C., Takemoto, R., Schaidt, H., Showe, L., Satyamoorthy, K., Robbins, P., and Herlyn, M. (2001b). Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res.* 61, 8306-8316.

Berking, C., Takemoto, R., Satyamoorthy, K., Shirakawa, T., Eskandarpour, M., Hansson, J., VanBelle, P.A., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2004). Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B. *Cancer Res.* 64, 807-811.

Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T.J., Bille, K., Fisher, D.E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* 142, 827-835.

Bhatia, N. & Spiegelman, V. S. (2005). Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling in mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 42, 213-221.

Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* 4, 197-250.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

Blood, C.H. and Zetter, B.R. (1990). Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* 1032, 89-118.

Blume-Jensen, P., Janknecht, R., and Hunter, T. (1998). The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.* 8, 779-782.

Blume-Jensen, P., Jiang, G., Hyman, R., Lee, K.F., O'Gorman, S., and Hunter, T. (2000). Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat. Genet.* 24, 157-162.

Boon, T., van der Bruggen, P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183, 725-729.

Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682-4689.

Bosher, J. M., Williams, T., & Hurst, H. C. (1995). The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 744-747.

Bosher, J. M., Totty, N. F., Hsuan, J. J., Williams, T., & Hurst, H. C. (1996). A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene* 13, 1701-1707.

Bowen, M.A., Patel, D.D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A.R., Wang, W.C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J.M., Francke, U., and . (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J. Exp. Med.* 181, 2213-2220.

Brichard, V., Van, P. A., Wolfel, T., Wolfel, C., De, P. E., Lethe, B., Coulie, P., & Boon, T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 178, 489-495.

Brichard, V. G., Herman, J., Van, P. A., Wildmann, C., Gaugler, B., Wolfel, T., Boon, T., & Lethe, B. (1996). A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26, 224-230.

Broome, P.M., Gause, P.R., Hyman, P., Gregus, J., Lloria-Prevatt, M., Nagle, R., and Bowden, G.T. (1999). Induction of melanoma in TPras transgenic mice. *Carcinogenesis* 20, 1747-1753.

Brown, J.D. and Moon, R.T. (1998). Wnt signaling: why is everything so negative? *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 182-187.

Buettner, R., Kannan, P., Imhof, A., Bauer, R., Yim, S.O., Glockshuber, R., Van Dyke, M.W., and Tainsky, M.A. (1993). An alternatively spliced mRNA from the AP-2 gene encodes a negative regulator of transcriptional activation by AP-2. *Mol. Cell Biol.* 13, 4174-4185.

Burchill, S.A., Thody, A.J., and Ito, S. (1986). Melanocyte-stimulating hormone, tyrosinase activity and the regulation of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in the hair follicular melanocytes of the mouse. *J. Endocrinol.* 109, 15-21.

Burchill, S.A., Virden, R., Fuller, B.B., and Thody, A.J. (1988). Regulation of tyrosinase synthesis by alpha-melanocyte-stimulating hormone in hair follicular melanocytes of the mouse. *J. Endocrinol.* 116, 17-23.

Busca, R. and Ballotti, R. (2000). Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 13, 60-69.

- Cannon-Albright, L. A., Goldgar, D. E., Meyer, L. J., Lewis, C. M., Anderson, D. E., Fountain, J. W., Hegi, M. E., Wiseman, R. W., Petty, E. M., Bale, A. E., & . (1992). Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 258, 1148-1152.
- Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Chambon, P., & Dolle, P. (1996). AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 54, 83-94.
- Chin, L., Pomerantz, J., Polsky, D., Jacobson, M., Cohen, C., Cordon-Cardo, C., Horner, J. W., and DePinho, R. A. (1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev.* 11, 2822-2834.
- Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., Horner, J. W., Cordon-Cardo, C., Yancopoulos, G. D., and DePinho, R. A. (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400, 468-472.
- Choi, D. S., Handa, M., Young, H., Gordon, A. S., Diamond, I., & Messing, R. O. (2000). Genomic organization and expression of the mouse equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporter 1 (ENT1) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 200-208.
- Clark, W. H., Jr., Reimer, R. R. (1978). Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. *Arch. Dermatol.*, 114.732-738.
- Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* 15, 1147-1165.
- Clark, W. H., Jr. (1991a). Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 10, 83-88.
- Clark, W. H., Jr., Evans, H. L., Everett, M. A., Farmer, E. R., Graham, J. H., Mihm, M. C., Jr., Rosai, J., Sagebiel, R. W., and Wick, M. R. (1991b). Early melanoma. Histologic terms. *Am. J. Dermatopathol.* 13, 579-582.
- Collins, K. A. and White, W. L. (1995). Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and bcl-2 are differentially expressed in early evolving malignant melanoma. *Am. J. Dermatopathol.* 17, 429-438.
- Cowley, G. P. and Smith, M. E. (1996). Cadherin expression in melanocytic naevi and malignant melanomas. *J. Pathol.* 179, 183-187.
- Crombie, D. L. (1977). Information for and from general practice. *Proc. R. Soc. Med.* 70, 407-410.
- Crombie, I. K. (1979). Racial differences in Melanoma incidence. *Br. J. Cancer*, 40:185-193.

Czajkowski,R., Placek,W., Drewa,G., Czajkowska,A., and Uchanska,G. (2004). FAMMM syndrome: pathogenesis and management. *Dermatol. Surg.* 30, 291-296.

Davies,H., Bignell,G.R., Cox,C., Stephens,P., Edkins,S., Clegg,S., Teague,J., Woffendin,H., Garnett,M.J., Bottomley,W., Davis,N., Dicks,E., Ewing,R., Floyd,Y., Gray,K., Hall,S., Hawes,R., Hughes,J., Kosmidou,V., Menzies,A., Mould,C., Parker,A., Stevens,C., Watt,S., Hooper,S., Wilson,R., Jayatilake,H., Gusterson,B.A., Cooper,C., Shipley,J., Hargrave,D., Pritchard-Jones,K., Maitland,N., Chenevix-Trench,G., Riggins,G.J., Bigner,D.D., Palmieri,G., Cossu,A., Flanagan,A., Nicholson,A., Ho,J.W., Leung,S.Y., Yuen,S.T., Weber,B.L., Seigler,H.F., Darrow,T.L., Paterson,H., Marais,R., Marshall,C.J., Wooster,R., Stratton,M.R., and Futreal,P.A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.

Day, D. A. & Tuite, M. F. (1998). Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J. Endocrinol.* 157, 361-371.

Degen,W.G., van Kempen,L.C., Gijzen,E.G., van Groningen,J.J., van Kooyk,Y., Bloemers,H.P., and Swart,G.W. (1998). MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am. J. Pathol.* 152, 805-813.

Descheemaeker, K. A., Wyns, S., Nelles, L., Auwerx, J., Ny, T., & Collen, D. (1992). Interaction of AP-1-, AP-2-, and Sp1-like proteins with two distinct sites in the upstream regulatory region of the plasminogen activator inhibitor-1 gene mediates the phorbol 12-myristate 13-acetate response. *J. Biol. Chem.* 267, 15086-15091.

Detmar,M. (2000). The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J. Dermatol. Sci.* 24 *Suppl* 1, S78-S84.

Didier, E. S., Maddy, J. A., Kwong, C. D., Green, L. C., Snowden, K. F., & Shadduck, J. A. (1998). Screening of compounds for antimicrosporidial activity in vitro. *Folia Parasitol. (Praha)* 45, 129-139.

Diehl,J.A., Cheng,M., Roussel,M.F., and Sherr,C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499-3511.

Dong, J., Phelps, R. G., Qiao, R., Yao, S., Benard, O., Ronai, Z., & Aaronson, S. A. (2003). BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res.* 63, 3883-3885

Elder,D.E., Rodeck, U., Thurin, J., Cardillo, F., Clark, W.H., Stewart, R., Herlyn, M. (1989). Antigenic profile of tumor progression stages in human melanocytic nevi and melanomas. *Cancer Res.* 49, 5091-5096.

- Elder, D.E., Clark, W.H., Jr., Elenitsas, R., Guerry, D., and Halpern, A.C. (1993). The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. *Semin. Diagn. Pathol.* 10, 18-35.
- Ellen, R. P., Schwarz-Faulkner, S., & Grove, D. A. (1988). Coaggregation among periodontal pathogens, emphasizing *Bacteroides gingivalis*--*Actinomyces viscosus* cohesion on a saliva-coated mineral surface. *Can. J. Microbiol.* 34, 299-306.
- Esteve, J. (1993). Background mortality in clinical survival studies. *Lancet* 341, 1416-1417.
- Felding-Habermann, B., Fransvea, E., O'Toole, T.E., Manzuk, L., Faha, B., and Hensler, M. (2002). Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 19, 427-436.
- Fidler, I.J., Kumar, R., Bielenberg, D.R., and Ellis, L.M. (1998). Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis. *Cancer J. Sci. Am.* 4 Suppl 1, S58-S66.
- Fleischman, R. A., Saltman, D. L., Stastny, V., & Zneimer, S. (1991). Deletion of the c-kit protooncogene in the human developmental defect piebald trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 10885-10889.
- Friedrichs, N., Jager, R., Paggen, E., Rudlowski, C., Merkelbach-Bruse, S., Schorle, H., & Buettner, R. (2005). Distinct spatial expression patterns of AP-2alpha and AP-2gamma in non-neoplastic human breast and breast cancer. *Mod. Pathol.* 18, 431-438.
- Frisch, S. M. & Morisaki, J. H. (1990). Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol. Cell Biol.* 10, 6524-6532.
- Fritsch, P., *Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas* (1998). Aufbau und Funktionen der Haut
- Fogel, M., Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Smirnov, A., Edler, L., Ben Arie, A., Huszar, M., and Altevogt, P. (2003). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362, 869-875.
- Fuchs, J. & Packer, L. (1990). Electron paramagnetic resonance in dermatologic research with particular reference to photodermatology. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 7, 229-232.
- Gallagher, R. P., McLean, D. I., Yang, C. P., Coldman, A. J., Silver, H. K., Spinelli, J. J., & Beagrie, M. (1990). Suntan, 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., Bertz, J., Orfanos C.E. (1986). Malignant melanoma: increase in incidence and mortality in West Germany. *Z. Hautkr.* 61, 1751-1764.
- Garbe, C., Thiess, S., Nurnberger, F., Ehlers, G., Albrecht, G., Lindlar, F., and Bertz, J. (1991). Incidence and mortality of malignant melanoma in Berlin (West) from 1980 to 1986. *Acta Derm. Venereol.* 71, 506-511.
- Gaubatz, S., Imhof, A., Dosch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R., & Eilers, M. (1995). Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *EMBO J.* 14, 1508-1519.
- Gaugler, B., Van den, E. B., van der, B. P., Romero, P., Gaforio, J. J., De, P. E., Lethe, B., Brasseur, F., & Boon, T. (1994). Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179, 921-930.
- Gaynor, R. B., Muchardt, C., Xia, Y. R., Klisak, I., Mohandas, T., Sparkes, R. S., & Lusk, A. J. (1991). Localization of the gene for the DNA-binding protein AP-2 to human chromosome 6p22.3-pter. *Genomics* 10, 1100-1102.
- Gee, J. M., Robertson, J. F., Ellis, I. O., Nicholson, R. I., & Hurst, H. C. (1999). Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *J. Pathol.* 189, 514-520.
- Gershenwald, J. E., Sumner, W., Calderone, T., Wang, Z., Huang, S., & Bar-Eli, M. (2001). Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumor growth in vivo. *Oncogene* 20, 3363-3375.
- Gilbertson, R. J., Perry, R. H., Kelly, P. J., Pearson, A. D., & Lunec, J. (1997). Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res.* 57, 3272-3280.
- Gille, J., Swerlick, R. A., & Caughman, S. W. (1997). Transforming growth factor- α -induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J.* 16, 750-759.
- Goding, C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* 14, 1712-1728.
- Graells, J., Vinyals, A., Figueras, A., Llorens, A., Moreno, A., Marcoval, J., Gonzalez, F. J., & Fabra, A. (2004). Overproduction of VEGF concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. *J. Invest Dermatol.* 123, 1151-1161.
- Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Frye, C., Eeles, R., Orlow, I., Lacombe, L., Ponce-Castaneda, V., Lianes, P., Latres, E., & . (1995). Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression. *Am. J. Pathol.* 146, 1199-1206.

Gumbiner, B.M. and Yamada, K.M. (1995). Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 615-618.

Hadjeb, N. & Berkowitz, G. A. (1996). Preparation of T-overhang vectors with high PCR product cloning efficiency. *Biotechniques* 20, 20-22.

Halaban, R. (1993a). Growth regulation in normal and malignant melanocytes. *Recent Results Cancer Res.* 128, 133-150.

Halaban, R. (1993b). Molecular correlates in the progression of normal melanocytes to melanomas. *Semin. Cancer Biol.* 4, 171-181.

Halaban, R. and Moellmann, G. (1990). Murine and human b locus pigmentation genes encode a glycoprotein (gp75) with catalase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 4809-4813.

Happle, R., Traupe, H., Vakilzadeh, F., & Macher, E. (1982). Arguments in favor of a polygenic inheritance of precursor nevi. *J. Am. Acad. Dermatol.* 6, 540-543.

Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T., & Fisher, D. E. (1998). MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 391, 298-301.

Hemler, M.E., Elices, M.J., Chan, B.M., Zetter, B., Matsuura, N., and Takada, Y. (1990). Multiple ligand binding functions for VLA-2 (alpha 2 beta 1) and VLA-3 (alpha 3 beta 1) in the integrin family. *Cell Differ. Dev.* 32, 229-238.

Henriet, P., Blavier, L., and Declerck, Y.A. (1999). Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* 107, 111-119.

Henrikson, K. P., Salazar, S. L., Fenton, J. W., & Pentecost, B. T. (1999). Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br. J. Cancer* 79, 401-406.

Henry, H., Thomas, A., Shen, Y., and White, E. (2002). Regulation of the mitochondrial checkpoint in p53-mediated apoptosis confers resistance to cell death. *Oncogene* 21, 748-760.

Herlyn, D., Iliopoulos, D., Jensen, P. J., Parmiter, A., Baird, J., Hotta, H., Adachi, K., Ross, A. H., Jambrosic, J., Koprowski, H., & . (1990a). In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice. *Cancer Res.* 50, 2296-2302.

Herlyn, M., Clark, W.H., Rodeck, U., Mancianti, M.L., Jambrosic, J., and Koprowski, H. (1987a). Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 56, 461-474.

Herlyn, M., Rodeck, U., Mancianti, M., Cardillo, F.M., Lang, A., Ross, A.H., Jambrosic, J., and Koprowski, H. (1987b). Expression of melanoma-associated antigens in rapidly dividing human melanocytes in culture. *Cancer Res.* 47, 3057-3061.

Herlyn, M., Kath, R., Williams, N., Valyi-Nagy, I., & Rodeck, U. (1990a). Growth-regulatory factors for normal, premalignant, and malignant human cells in vitro. *Adv. Cancer Res.* 54, 213-234.

Herlyn, M., Menrad, A., & Koprowski, H. (1990b). Structure, function, and clinical significance of human tumor antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1883-1889.

Herlyn, M., (1993) Tumor progression in the melanocytic system. In: molecular and cellular biology of melanoma, S. 21-43. The Wistar Institute, Philadelphia, R.G. Landes Company, Austin.

Herlyn, M., Berking, C., Li, G., and Satyamoorthy, K. (2000). Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res.* 10, 303-312.

Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Waas, E.T., Zendman, A.J., Cornelissen, I.M., Ruiter, D.J., and Van Muijen, G.N. (1999). Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br. J. Cancer* 81, 774-782.

Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Van Kraats, A.A., Ruiter, D.J., and Van Muijen, G.N. (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.

Hsu, M.Y., Shih, D.T., Meier, F.E., Van Belle, P., Hsu, J.Y., Elder, D.E., Buck, C.A., and Herlyn, M. (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, M.Y., Meier, F.E., Nesbit, M., Hsu, J.Y., Van Belle, P., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2000). E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am. J. Pathol.* 156, 1515-1525.

Huang, J., Asawa, T., Takato, T., and Sakai, R. (2003). Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *J. Biol. Chem.* 278, 48367-48376.

Huang, S., Luca, M., Gutman, M., McConkey, D.J., Langley, K.E., Lyman, S.D., and Bar-Eli, M. (1996). Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene* 13, 2339-2347.

Huang, S., Jean, D., Luca, M., Tainsky, M. A., & Bar-Eli, M. (1998). Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J.* 17, 4358-4369.

Huhtala, P., Chow, L. T., & Tryggvason, K. (1990). Structure of the human type IV collagenase gene. *J. Biol. Chem.* 265, 11077-11082.

Hussein, M.R., Haemel, A.K., and Wood, G.S. (2003). Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J. Pathol.* 199, 275-288.

Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H., Jr, Tucker M.A., Dracopoli, N.C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat. Genet.* 1, 3-5.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

Imagawa, M., Chiu, R., & Karin, M. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51, 251-260.

Janji, B., Melchior, C., Gouon, V., Vallar, L., & Kieffer, N. (1999). Autocrine TGF-beta-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.

Jean, D., Gershenwald, J. E., Huang, S., Luca, M., Hudson, M. J., Tainsky, M. A., & Bar-Eli, M. (1998a). Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 16501-16508.

Jean, D., Harbison, M., McConkey, D.J., Ronai, Z., and Bar-Eli, M. (1998b). CREB and its associated proteins act as survival factors for human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 24884-24890.

Jean, D. and Bar-Eli, M. (2000). Regulation of tumor growth and metastasis of human melanoma by the CREB transcription factor family. *Mol. Cell Biochem.* 212, 19-28.

Jemal, A., Devesa, S.S., Hartge, P., and Tucker, M.A. (2001). Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 678-683.

Jiang, W. G., Hiscox, S., Hallett, M. B., Scott, C., Horrobin, D. F., & Puntis, M. C. (1995a). Inhibition of hepatocyte growth factor-induced motility and in vitro invasion of human colon cancer cells by gamma-linolenic acid. *Br. J. Cancer* 71, 744-752.

Jiang, H., Lin, J., Su, Z.Z., Herlyn, M., Kerbel, R.S., Weissman, B.E., Welch, D.R., and Fisher, P.B. (1995b). The melanoma differentiation-associated gene mda-6,

which encodes the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, is differentially expressed during growth, differentiation and progression in human melanoma cells. *Oncogene* 10, 1855-1864.

Jimbow,K., Takahashi,M., Sato,S., and Kukita,A. (1971). Ultrastructural and cytochemical studies of melanogenesis in melanocytes of normal human hair matrix. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* 20, 87-92.

Jimbow,K., Quevedo,W.C., Jr., Fitzpatrick,T.B., and Szabo,G. (1976). Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J. Invest Dermatol.* 67, 72-89.

Jimbow,K., Lee,S.K., King,M.G., Hara,H., Chen,H., Dakour,J., and Marusyk,H. (1993). Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *J. Invest Dermatol.* 100, 259S-268S.

Johnson,J.P., Lehmann,J.M., Stade,B.G., Rothbacher,U., Sers,C., and Riethmuller,G. (1989). Functional aspects of three molecules associated with metastasis development in human malignant melanoma. *Invasion Metastasis* 9, 338-350.

Johnson,J.P. (1992). Cell adhesion molecules in neoplastic disease. *Int. J. Clin. Lab Res.* 22, 69-72.

Johnson, J. P., Rothbacher, U., & Sers, C. (1993). The progression associated antigen MUC18: a unique member of the immunoglobulin supergene family. *Melanoma Res.* 3, 337-340.

Johnson, W., Albanese, C., Handwerger, S., Williams, T., Pestell, R. G., & Jameson, J. L. (1997). Regulation of the human chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit promoters by AP-2. *J. Biol. Chem.* 272, 15405-15412.

Junqueira, A. C., Chiari, E., & Wincker, P. (1996). Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 129-132.

Kahari,V.M. and Saarialho-Kere,U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6, 199-213.

Kanoko, M., Ueda, M., Nagano, T., & Ichihashi, M. (1996). Expression of p53 protein in melanoma progression. *J. Dermatol. Sci.* 12, 97-103.

Karelina,T.V., Bannikov,G.A., and Eisen,A.Z. (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.

Karin, M. & Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5, 747-757.

Karjalainen, J. M., Kellokoski, J. K., Eskelinen, M. J., Alhava, E. M., & Kosma, V. M. (1998). Downregulation of transcription factor AP-2 predicts poor survival in stage I cutaneous malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 16, 3584-3591.

Karlen, S. and Braathen, L.R. (1999). Regulation of the melanoma cell adhesion molecule gene in melanoma: modulation of mRNA synthesis by cyclic adenosine monophosphate, phorbol ester, and stem cell factor/c-kit signaling. *J. Invest Dermatol.* 113, 711-719.

Karlsson, P., Boeryd, B., Sander, B., Weatmark, P., Rosdahl, I. (1998) Increasing incidence of cutaneous malignant melanoma in children and adolescents 12-19 years of age in Sweden 1973-92. *Acta Derm. Venereol.* 78, 289-292.

Karst, A. M., Dai, D. L., Martinka, M., & Li, G. (2005). PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene* 24, 1111-1116.

Katayama, M., Iwamatsu, A., Masutani, H., Furuke, K., Takeda, K., Wada, H., Masuda, T., and Ishii, K. (1997). Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct. Funct.* 22, 511-516.

Kemler, R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9, 317-321.

Kennedy, C., ter Huurne, J., Berkhout, M., Gruis, N., Bastiaens, M., Bergman, W., Willemze, R., and Bavinck, J.N. (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.

Kim, S.G., Ravi, G., Hoffmann, C., Jung, Y.J., Kim, M., Chen, A., and Jacobson, K.A. (2002). p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, CI-IB-MECA. *Biochem. Pharmacol.* 63, 871-880.

Kleijn, M., Scheper, G. C., Voorma, H. O., & Thomas, A. A. (1998a). Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *Eur. J. Biochem.* 253, 531-544.

Kobayashi, H., Mizuki, T., Wada, A., & Izumi, F. (1992). Cell-cell contact modulates expression of cell adhesion molecule L1 in PC12 cells. *Neuroscience* 49, 437-441.

Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787.

Krasagakis, K., Garbe, C., & Orfanos, C. E. (1993). Cytokines in human melanoma cells: synthesis, autocrine stimulation and regulatory functions--an overview. *Melanoma Res.* 3, 425-433.

Kristiansen, G., Yu, Y., Schluns, K., Sers, C., Dietel, M., & Petersen, I. (2003). Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer. *Anal. Cell Pathol.* 25, 77-81.

Larson, R.S. and Springer, T.A. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114, 181-217.

Leask, A., Byrne, C., & Fuchs, E. (1991). Transcription factor AP2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7948-7952.

Lehmann, J.M., Riethmüller, G., Johnson, J.P. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9891-9895.

Leiter, U., Buettner, P. G., Eigentler, T. K., & Garbe, C. (2004a). Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. *J. Clin. Oncol.* 22, 3660-3667.

Leiter, U., Meier, F., Schitteck, B., & Garbe, C. (2004b). The natural course of cutaneous melanoma. *J. Surg. Oncol.* 86, 172-178.

Leslie, M. C. & Bar-Eli, M. (2005). Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment. *J. Cell Biochem.* 94, 25-38.

Lewis, T.S., Shapiro, P.S., and Ahn, N.G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74, 49-139.

Libow, L. F., Scheide, S., & DeLeo, V. A. (1988). Ultraviolet radiation acts as an independent mitogen for normal human melanocytes in culture. *Pigment Cell Res.* 1, 397-401.

Li, G. and Herlyn, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today* 6, 163-169.

Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 61, 3819-3825.

Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2002). Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* 13, 62-70.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Liu, S. Y. & Redmond, T. M. (1998). Role of the 3'-untranslated region of RPE65 mRNA in the translational regulation of the RPE65 gene: identification of a specific translation inhibitory element. *Arch. Biochem. Biophys.* 357, 37-44.

Lopansri, S. and Mihm, M.C., Jr. (1979). Clinical and pathological correlation of malignant melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 6, 180-194.

Luca, M., Hunt, B., Bucana, C.D., Johnson, J.P., Fidler, I.J., and Bar-Eli, M. (1993). Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells. *Melanoma Res.* 3, 35-41.

Luca, M.R. and Bar-Eli, M. (1998). Molecular changes in human melanoma metastasis. *Histol. Histopathol.* 13, 1225-1231.

Lugovic, L., Situm, M., & Kos, L. (2005). Malignant melanoma - Future Prospects. *Acta Dermatovenerol. Croat.* 13, 36-43.

Luscher, B., Mitchell, P. J., Williams, T., & Tjian, R. (1989). Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev.* 3, 1507-1517.

Madireddi, M. T., Dent, P., & Fisher, P. B. (2000). AP-1 and C/EBP transcription factors contribute to mda-7 gene promoter activity during human melanoma differentiation. *J. Cell Physiol* 185, 36-46.

Mansson-Brahme, E., Johansson, H., Larsson, O., Rutqvist, L.E., and Ringborg, U. (2002). Trends in incidence of cutaneous malignant melanoma in a Swedish population 1976-1994. *Acta Oncol.* 41, 138-146.

Maragoudakis, M.E., Tsopanoglou, N.E., Andriopoulou, P., and Maragoudakis, M.M. (2000). Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression. *Matrix Biol.* 19, 345-351.

Mareel, M., Boterberg, T., Noe, V., Van Hoorde, L., Vermeulen, S., Bruyneel, E., and Bracke, M. (1997). E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *J. Cell Physiol* 173, 271-274.

Marquardt, H. & Todaro, G. J. (1982). Human transforming growth factor. Production by a melanoma cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.* 257, 5220-5225.

Marrett,L.D., Nguyen,H.L., and Armstrong,B.K. (2001). Trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma in New South Wales, 1983-1996. *Int. J. Cancer* 92, 457-462.

McGary,E.C., Lev,D.C., and Bar-Eli,M. (2002). Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol. Ther.* 1, 459-465.

McGary,E.C., Onn,A., Mills,L., Heimberger,A., Eton,O., Thomas,G.W., Shtivelband,M., and Bar-Eli,M. (2004). Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor receptor phosphorylation of melanoma cells but does not affect tumorigenicity in vivo. *J. Invest Dermatol.* 122, 400-405.

McGill,G.G., Horstmann,M., Widlund,H.R., Du,J., Motyckova,G., Nishimura,E.K., Lin,Y.L., Ramaswamy,S., Avery,W., Ding,H.F., Jordan,S.A., Jackson,I.J., Korsmeyer,S.J., Golub,T.R., and Fisher,D.E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 109, 707-718.

Meier, F., Nesbit, M., Hsu, M. Y., Martin, B., Van, B. P., Elder, D. E., Schaumburg-Lever, G., Garbe, C., Walz, T. M., Donatien, P., Crombleholme, T. 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., and 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., Satyamoorthy, K., Schitteck, B., Bauer, J., Berking, C., Moller, H., Maczey, E., Rassner, G., Herlyn, M., & Garbe, C. (2003). Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or beta3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma. *Exp. Dermatol.* 12, 296-306.

Merkel, P. A., Herlyn, K., Martin, R. W., Anderson, J. J., Mayes, M. D., Bell, P., Korn, J. H., Simms, R. W., Csuka, M. E., Medsger, T. A., Jr., Rothfield, N. F., Ellman, M. H., Collier, D. H., Weinstein, A., Furst, D. E., Jimenez, S. A., White, B., Seibold, J. R., & Wigley, F. M. (2002). Measuring disease activity and functional status in patients with scleroderma and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum.* 46, 2410-2420.

Mills,L., Tellez,C., Huang,S., Baker,C., McCarty,M., Green,L., Gudas,J.M., Feng,X., and Bar-Eli,M. (2002). Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res.* 62, 5106-5114.

Mitchell, P. J., Wang, C., & Tjian, R. (1987). Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50, 847-861.

Mitchell,P.J., Timmons,P.M., Hebert,J.M., Rigby,P.W., and Tjian,R. (1991). Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5, 105-119.

Moehrle, M., Kraemer, A., Schippert, W., Garbe, C., Rassner, G., & Breuninger, H. (2004a). Clinical risk factors and prognostic significance of local recurrence in cutaneous melanoma. *Br. J. Dermatol.* 151, 397-406.

Moehrle, M., Schippert, W., Rassner, G., Garbe, C., & Breuninger, H. (2004b). Micrometastasis of a sentinel lymph node in cutaneous melanoma is a significant prognostic factor for disease-free survival, distant-metastasis-free survival, and overall survival. *Dermatol. Surg.* 30, 1319-1328.

Montesano, R. (1986a). Cell-extracellular matrix interactions in morphogenesis: an in vitro approach. *Experientia* 42, 977-985.

Montesano, R., Vassalli, J. D., Baird, A., Guillemin, R., & Orci, L. (1986b). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 7297-7301.

Morin,P.J., Sparks,A.B., Korinek,V., Barker,N., Clevers,H., Vogelstein,B., and Kinzler,K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.

Moser, M., Imhof, A., Pscherer, A., Bauer, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Hofstadter, F., Schule, R., & Buettner, R. (1995). Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta. *Development* 121, 2779-2788.

Muller, J. & Yoshida, T. (1995). Interaction of murine peritoneal leukocytes and mesothelial cells: in vitro model system to survey cellular events on serosal membranes during inflammation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75, 231-238.

Murphy,G., Stanton,H., Cowell,S., Butler,G., Knauper,V., Atkinson,S., and Gavrilovic,J. (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 107, 38-44.

Natali, P. G., Nicotra, M. R., Winkler, A. B., Cavaliere, R., Bigotti, A., & Ullrich, A. (1992). Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *Int. J. Cancer* 52, 197-201.

Natali, P. G., Nicotra, M. R., Di Renzo, M. F., Prat, M., Bigotti, A., Cavaliere, R., & Comoglio, P. M. (1993). Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br. J. Cancer* 68, 746-750.

Natali, P. G., Berlingieri, M. T., Nicotra, M. R., Fusco, A., Santoro, E., Bigotti, A., & Vecchio, G. (1995). Transformation of thyroid epithelium is associated with loss of c-kit receptor. *Cancer Res.* 55, 1787-1791.

Nesbit,M., Nesbit,H.K., Bennett,J., Andl,T., Hsu,M.Y., Dejesus,E., McBrian,M., Gupta,A.R., Eck,S.L., and Herlyn,M. (1999). Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene* 18, 6469-6476.

Niu,G., Bowman,T., Huang,M., Shivers,S., Reintgen,D., Daud,A., Chang,A., Kraker,A., Jove,R., and Yu,H. (2002). Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21, 7001-7010.

Nolte,C., Moos,M., and Schachner,M. (1999). Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in epithelia of rodents. *Cell Tissue Res.* 298, 261-273.

Noonan, F. P., De Fabo, E. C., & Morrison, H. (1988). Cis-urocanic acid, a product formed by ultraviolet B irradiation of the skin, initiates an antigen presentation defect in splenic dendritic cells in vivo. *J. Invest Dermatol.* 90, 92-99.

Noonan,F.P., Dudek,J., Merlino,G., and De Fabo,E.C. (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.

Orfanos,C.E., Jung,E.G., Rassner,G., Wolff,H.H., and 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, 285-291.

Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Chazaud, C., Dolle, P., & Chambon, P. (1996). AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 225, 338-347.

Oya, M., Mikami, S., Mizuno, R., Miyajima, A., Horiguchi, Y., Nakashima, J., Marumo, K., Mukai, M., & Murai, M. (2004). Differential expression of activator protein-2 isoforms in renal cell carcinoma. *Urology* 64, 162-167.

Palmer,J.S., Duffy,D.L., Box,N.F., Aitken,J.F., O'Gorman,L.E., Green,A.C., Hayward,N.K., Martin,N.G., and Sturm,R.A. (2000). Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* 66, 176-186.

Pancook,J.D., Reisfeld,R.A., Varki,N., Vitiello,A., Fox,R.I., and Montgomery,A.M. (1997). Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J. Immunol.* 158, 4413-4421.

- Pearson,G., Robinson,F., Beers,G.T., Xu,B.E., Karandikar,M., Berman,K., and Cobb,M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153-183.
- Pellikainen, J., Naukkarinen, A., Ropponen, K., Rummukainen, J., Kataja, V., Kellokoski, J., Eskelinen, M., & Kosma, V. M. (2004). Expression of HER2 and its association with AP-2 in breast cancer. *Eur. J. Cancer* 40, 1485-1495.
- Pickl,W.F., Majdic,O., Fischer,G.F., Petzelbauer,P., Fae,I., Waclavicek,M., Stockl,J., Scheinecker,C., Vidicki,T., Aschauer,H., Johnson,J.P., and Knapp,W. (1997). MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 158, 2107-2115.
- Pollock,P.M., Harper,U.L., Hansen,K.S., Yudt,L.M., Stark,M., Robbins,C.M., Moses,T.Y., Hostetter,G., Wagner,U., Kakareka,J., Salem,G., Pohida,T., Heenan,P., Duray,P., Kallioniemi,O., Hayward,N.K., Trent,J.M., and Meltzer,P.S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* 33, 19-20.
- Polsky,D. and Cordon-Cardo,C. (2003). Oncogenes in melanoma. *Oncogene* 22, 3087-3091.
- Poser, I., Dominguez, D., de Herreros, A. G., Varnai, A., Buettner, R., & Bosserhoff, A. K. (2001). Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J. Biol. Chem.* 276, 24661-24666.
- Puerschel, W. C., Gawaz, M., Worret, W. I., & Ring, J. (1996). Immunoreactivity of glycoprotein IIb is present in metastasized but not in non-metastasized primary malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* 135, 883-887.
- Qin, H., Sun, Y., & Benveniste, E. N. (1999). The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J. Biol. Chem.* 274, 29130-29137.
- Ramsay,J.A., From,L., and Kahn,H.J. (1995). bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin. *Mod. Pathol.* 8, 150-154.
- Rassner, G., (2002). *Dermatologie, Lehrbuch und Atlas*
- Raza,S.L. and Cornelius,L.A. (2000). Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 47-54.
- Real, F. X., Rettig, W. J., Chesa, P. G., Melamed, M. R., Old, L. J., & Mendelsohn, J. (1986). Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation. *Cancer Res.* 46, 4726-4731.

Reed, J.A., McNutt, N.S., and Albino, A.P. (1994). Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression. *Am. J. Pathol.* 144, 329-336.

Reed, J.C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236.

Rigel, D. S. (1997). Malignant melanoma: incidence issues and their effect on diagnosis and treatment in the 1990s. *Mayo Clin. Proc.* 72, 367-371.

Rodeck, U., Herlyn, M., (1991). Growth factors in melanoma. *Cancer Met. Rev.* 10, 89-101.

Rodeck, U. (1993). Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development. *Cancer Metastasis Rev.* 12, 219-226.

Ronai, Z. A., Okin, E., & Weinstein, I. B. (1988). Ultraviolet light induces the expression of oncogenes in rat fibroblast and human keratinocyte cells. *Oncogene* 2, 201-204.

Ropponen, K. M., Kellokoski, J. K., Lipponen, P. K., Pietilainen, T., Eskelinen, M. J., Alhava, E. M., & Kosma, V. M. (1999). p22/WAF1 expression in human colorectal carcinoma: association with p53, transcription factor AP-2 and prognosis. *Br. J. Cancer* 81, 133-140.

Ropponen, K. M., Kellokoski, J. K., Pirinen, R. T., Moisio, K. I., Eskelinen, M. J., Alhava, E. M., & Kosma, V. M. (2001). Expression of transcription factor AP-2 in colorectal adenomas and adenocarcinomas; comparison of immunohistochemistry and in situ hybridisation. *J. Clin. Pathol.* 54, 533-538.

Ruiz, M., Pettaway, C., Song, R., Stoeltzing, O., Ellis, L., & Bar-Eli, M. (2004). Activator protein 2alpha inhibits tumorigenicity and represses vascular endothelial growth factor transcription in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64, 631-638.

Rudroff, C., Schafberg, H., Nowak, G., Weinel, R., Scheele, J., & Kaufmann, R. (1998). Characterization of functional thrombin receptors in human pancreatic tumor cells (MIA PACA-2). *Pancreas* 16, 189-194.

Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T., and Goding, C.R. (1997). CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene* 14, 3083-3092.

Schadendorf, D., Gawlik, C., Haney, U., Ostmeier, H., Suter, L., & Czarnetzki, B. M. (1993). Tumour progression and metastatic behaviour in vivo correlates with integrin expression on melanocytic tumours. *J. Pathol.* 170, 429-434.

Schmid, P., Itin, P., and 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. *Carcinogenesis* 16, 1499-1503.

- Sensi, M., Traversari, C., Radrizzani, M., Salvi, S., Maccalli, C., Mortarini, R., Rivoltini, L., Farina, C., Nicolini, G., Wolfel, T., & . (1995). Cytotoxic T-lymphocyte clones from different patients display limited T-cell-receptor variable-region gene usage in HLA-A2-restricted recognition of the melanoma antigen Melan-A/MART-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5674-5678.
- Sers, C., Kirsch, K., Rothbacher, U., Riethmuller, G., & Johnson, J. P. (1993). Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 8514-8518.
- Shih, I.M., Elder, D.E., Hsu, M.Y., and Herlyn, M. (1994a). Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes. *Am. J. Pathol.* 145, 837-845.
- Shih, I. M. & Herlyn, M. (1994b). Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma. *In Vivo* 8, 113-123.
- Shih, I.M., Speicher, D., Hsu, M.Y., Levine, E., and Herlyn, M. (1997). Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic Mel-CAM/ligand adhesion. *Cancer Res.* 57, 3835-3840.
- Shiojima, I. and Walsh, K. (2002). Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ. Res.* 90, 1243-1250.
- Silins, G., Grimmond, S., Egerton, M., and Hayward, N. (1997). Analysis of the promoter region of the human VEGF-related factor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 413-418.
- Slade, J., Marghoob, A. A., Salopek, T. G., Rigel, D. S., Kopf, A. W., & Bart, R. S. (1995). Atypical mole syndrome: risk factor for cutaneous malignant melanoma and implications for management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 32, 479-494.
- Smalley, K.S. (2003). A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int. J. Cancer* 104, 527-532.
- Snape, A. M., Winning, R. S., & Sargent, T. D. (1991). Transcription factor AP-2 is tissue-specific in *Xenopus* and is closely related or identical to keratin transcription factor 1 (KTF-1). *Development* 113, 283-293.
- Somasundaram, K., Jayaraman, G., Williams, T., Moran, E., Frisch, S., and Thimmapaya, B. (1996). Repression of a matrix metalloprotease gene by E1A correlates with its ability to bind to cell type-specific transcription factor AP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3088-3093.
- Springer, T.A. (1990a). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.

Springer, T.A. (1990b). Leucocyte adhesion to cells. *Scand. J. Immunol.* 32, 211-216.

Streck, R. J., Hurley, E. L., & Pauly, J. L. (1991). Expression and capping of a proliferation-associated surface membrane p34 kDa antigen on different human hematopoietic cell lines. *J. Leukoc. Biol.* 50, 182-191.

Streit, M. and Detmar, M. (2003). Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* 22, 3172-3179.

Sturm, R.A., Satyamoorthy, K., Meier, F., Gardiner, B.B., Smit, D.J., Vaidya, B., and Herlyn, M. (2002). Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Res.* 62, 226-232.

Sugawara, F., Ninomiya, H., Okamoto, Y., Miwa, S., Mazda, O., Katsura, Y., and Masaki, T. (1996). Endothelin-1-induced mitogenic responses of Chinese hamster ovary cells expressing human endothelinA: the role of a wortmannin-sensitive signaling pathway. *Mol. Pharmacol.* 49, 447-457.

Swart, G. W. (2002). Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 313-321.

Takahashi, H., Saitoh, K., Kishi, H., and Parsons, P.G. (1995). Immunohistochemical localisation of stem cell factor (SCF) with comparison of its receptor c-Kit proto-oncogene product (c-KIT) in melanocytic tumours. *Virchows Arch.* 427, 283-288.

Takahashi, H., Oyama, N., Itoh, Y., Ishida-Yamamoto, A., Kaneko, F., & Iizuka, H. (2000). Transcriptional factor AP-2gamma increases human cystatin A gene transcription of keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 719-723.

Tamura, S. (1997). The E-cadherin-mediated cell-cell adhesion system in human cancers. *Br. J. Surg.* 84, 899-900.

Tellez, C. and Bar-Eli, M. (2003). Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene* 22, 3130-3137.

Tellez, C., McCarty, M., Ruiz, M., and Bar-Eli, M. (2003). Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma. *J. Biol. Chem.* 278, 46632-46642.

Thies, A., Schachner, M., Moll, I., Berger, J., Schulze, H.J., Brunner, G., and Schumacher, U. (2002). Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* 38, 1708-1716.

- Titus-Ernstoff, L., Perry, A. E., Spencer, S. K., Gibson, J. J., Cole, B. F., & Ernstoff, M. S. (2005). Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int. J. Cancer*.
- Tsutsumida, A., Hamada, J., Tada, M., Aoyama, T., Furuuchi, K., Kawai, Y., Yamamoto, Y., Sugihara, T., & Moriuchi, T. (2004). Epigenetic silencing of E- and P-cadherin gene expression in human melanoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 25, 1415-1421.
- Tummala, R., Romano, R. A., Fuchs, E., & Sinha, S. (2003). Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family. *Gene* 321, 93-102.
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J.L., and Thody, A.J. (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* 11, 328-330.
- Valyi-Nagy, I.T., Hirka, G., Jensen, P.J., Shih, I.M., Juhasz, I., and Herlyn, M. (1993). Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. *Lab Invest* 69, 152-159.
- Van Belle, P., Rodeck, U., Nuamah, I., Halpern, A.C., and Elder, D.E. (1996). Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms. *Am. J. Pathol.* 148, 1887-1894.
- Van den, E. B., Peeters, O., De, B. O., Gaugler, B., Lucas, S., & Boon, T. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Exp. Med.* 182, 689-698.
- van der, B. P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De, P. E., Van den, E. B., Knuth, A., & Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- van den Oord, J.J., Vandeghinste, N., De Ley, M., and Wolf-Peeters, C. (1994). Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *Am. J. Pathol.* 145, 294-300.
- Van, P. A., van der, B. P., Coulie, P. G., Brichard, V. G., Lethe, B., van den, E. B., Uyttenhove, C., Renauld, J. C., & Boon, T. (1995). Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 145, 229-250.
- van Kempen, L.C., van den Oord, J.J., Van Muijen, G.N., Weidle, U.H., Bloemers, H.P., and Swart, G.W. (2000). Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am. J. Pathol.* 156, 769-774.
- van Kempen, L.C., Meier, F., Egeblad, M., Kersten-Niessen, M.J., Garbe, C., Weidle, U.H., Van Muijen, G.N., Herlyn, M., Bloemers, H.P., and Swart, G.W.

(2004). Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis. *J. Invest Dermatol.* 122, 1293-1301.

Vidal, M.J., Loganzo, F., Jr., de Oliveira, A.R., Hayward, N.K., and Albino, A.P. (1995). Mutations and defective expression of the WAF1 p21 tumour-suppressor gene in malignant melanomas. *Melanoma Res.* 5, 243-250.

Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489-501.

Vogt, T., Zipperer, K.H., Vogt, A., Holzel, D., Landthaler, M., Stolz, W., (1997). p53 protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathology*, 30, 57-63.

Wajapeyee, N. & Somasundaram, K. (2003). Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha-mediated growth inhibition. *J. Biol. Chem.* 278, 52093-52101.

Walker, G.J., Flores, J.F., Glendening, J.M., Lin, A.H., Markl, I.D., and Fountain, J.W. (1998). Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes. Cancer* 22, 157-163.

Wang, W.L., Healy, M.E., Sattler, M., Verma, S., Lin, J., Maulik, G., Stiles, C.D., Griffin, J.D., Johnson, B.E., and Salgia, R. (2000). Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571. *Oncogene* 19, 3521-3528.

Wang, Y. and Becker, D. (1996). Differential expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p16 and p21 in the human melanocytic system. *Oncogene* 12, 1069-1075.

Wang, Y. and Becker, D. (1997). Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat. Med.* 3, 887-893.

Wang, H. V., Vaupel, K., Buettner, R., Bosserhoff, A. K., & Moser, M. (2004). Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 epsilon. *Dev. Dyn.* 231, 128-135.

Wanner, R., Zhang, J., Henz, B. M., & Rosenbach, T. (1996). AP-2 gene expression and modulation by retinoic acid during keratinocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 666-669.

Weber, C.H. and Vincenz, C. (2001). The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem. Sci.* 26, 475-481.

Weeraratna,A.T., Jiang,Y., Hostetter,G., Rosenblatt,K., Duray,P., Bittner,M., and Trent,J.M. (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1, 279-288.

Wellbrock,C., Gomez,A., and Scharl,M. (2002). Melanoma development and pigment cell transformation in xiphophorus. *Microsc. Res. Tech.* 58, 456-463.

Wellbrock,C., Ogilvie,L., Hedley,D., Karasarides,M., Martin,J., Niculescu-Duvaz,D., Springer,C.J., and Marais,R. (2004). V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res.* 64, 2338-2342.

Wellbrock,C., Weisser,C., Geissinger,E., Troppmair,J., and Scharl,M. (2002b). Activation of p59(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 6443-6454.

Westermarck,J. and Kahari,V.M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 13, 781-792.

Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Price, E. R., Cui, J., Lessnick, S. L., Wu, M., He, X., & Fisher, D. E. (2002). Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J. Cell Biol.* 158, 1079-1087.

Wiecker,T.S., Luther,H., Buettner,P., Bauer,J., and Garbe,C. (2003). Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* 97, 628-638.

Williams, T., Admon, A., Luscher, B., & Tjian, R. (1988). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.* 2, 1557-1569.

Williams, T. & Tjian, R. (1991). Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 5, 670-682.

Williamson, J. A., Boshier, J. M., Skinner, A., Sheer, D., Williams, T., & Hurst, H. C. (1996). Chromosomal mapping of the human and mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription factors. *Genomics* 35, 262-264.

Winning, R. S., Shea, L. J., Marcus, S. J., & Sargent, T. D. (1991). Developmental regulation of transcription factor AP-2 during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Nucleic Acids Res.* 19, 3709-3714.

Woenckhaus,C., Giebel,J., Failing,K., Fenic,I., Dittberner,T., and Poetsch,M. (2003). Expression of AP-2alpha, c-kit, and cleaved caspase-6 and -3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression? *J. Pathol.* 201, 278-287.

Wojtukiewicz, M. Z., Tang, D. G., Ben-Josef, E., Renaud, C., Walz, D. A., & Honn, K. V. (1995). Solid tumor cells express functional "tethered ligand" thrombin receptor. *Cancer Res.* 55, 698-704.

Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-1284.

Woods, D., Cherwinski, H., Venetsanakos, E., Bhat, A., Gysin, S., Humbert, M., Bray, P.F., Saylor, V.L., and McMahon, M. (2001). Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 21, 3192-3205.

Worm, J., Christensen, C., Gronbaek, K., Tulchinsky, E., and Guldberg, P. (2004). Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene* 23, 5215-5226.

Wu, X. and Deng, Y. (2002). Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci.* 7, d151-d156.

Wu, X. and Hammer, J.A., III (2000). Making sense of melanosome dynamics in mouse melanocytes. *Pigment Cell Res.* 13, 241-247.

Xie, K., Huang, S., Wang, Y., Beltran, P.J., Juang, S.H., Dong, Z., Reed, J.C., McDonnell, T.J., McConkey, D.J., and Fidler, I.J. (1996). Bcl-2 protects cells from cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 43, 109-115.

Xie, S., Price, J.E., Luca, M., Jean, D., Ronai, Z., and Bar-Eli, M. (1997). Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Oncogene* 15, 2069-2075.

Xu, W., Gong, L., Haddad, M.M., Bischof, O., Campisi, J., Yeh, E.T., and Medrano, E.E. (2000). Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp. Cell Res.* 255, 135-143.

Yap, A.S., Brieher, W.M., and Gumbiner, B.M. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 119-146.

Yazdi, A.S., Palmedo, G., Flaig, M.J., Puchta, U., Reckwerth, A., Rutten, A., Mentzel, T., Hugel, H., Hantschke, M., Schmid-Wendtner, M.H., Kutzner, H., and Sander, C.A. (2003). Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J. Invest Dermatol.* 121, 1160-1162.

Zhang, H., Zhang, R., Liang, P., (1996). Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acids Res.* 24, 2454-2455.

Zhang, X. D. & Hersey, P. (1999). Expression of catenins and p120cas in melanocytic nevi and cutaneous melanoma: deficient alpha-catenin expression is associated with melanoma progression. *Pathology* 31, 239-246.

Danksagung

Frau PD Dr. rer. nat. Birgit Schittek danke ich für ihr Vertrauen und ihre stetige Unterstützung und Geduld sowie die zahlreichen konstruktiven Gespräche. Ihre Anregung und Kritik trugen sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. med. C. Garbe, Leiter der Sektion Dermatologische Onkologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen, danke ich für seine umfassende Unterstützung und die Diskussionsbereitschaft während der Planung und Anfertigung dieser Arbeit und die von ihm geschaffenen Voraussetzungen, die mir die Möglichkeit gaben, diese Dissertationsarbeit zu erstellen.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors der Sektion Dermatologische Onkologie. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Birgit Sauer und Frau Evelyn Maczey bedanken, ohne deren große Hilfe und Geduld diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Abteilung medizinische Virologie unter der Leitung von Prof. Dr. Iftner für die Hilfestellung und Durchführung der Sequenzierung von AP-2 α .

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, ohne deren vielfältige Unterstützung dieses Studium nicht möglich gewesen wäre, und meinem Ehemann Markus Grieb für dessen unentwegte Hilfsbereitschaft und liebevolle Geduld.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Cornelia Grieb, geb. Feike
geboren am: 20.11.1976 in Sindelfingen
Familienstand: verheiratet
Eltern: Alfred Feike
Angelika Feike
Geschwister: Frank Feike

Schulbildung

08/1983 – 07/1987 Buchhalden-Grundschule in Aidlingen
09/1987 – 07/1996 Goldberggymnasium in Sindelfingen

Hochschulbildung

04/1997 – 03/1999 Vorklinik an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
29.03.1999 Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
04/1999 – 03/2000 Erster klinischer Abschnitt an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
23.03.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
04/2000 – 08/2002 Zweiter klinischer Abschnitt an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
17.09.2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
10/2002 – 02/2003 Erstes Tertial des Praktischen Jahres in der Universitäts-Hautklinik in Tübingen
02/2003 – 05/2003 Zweites Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgie des Kreiskrankenhauses Böblingen
05/2003 – 09/2003 Drittes Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin des Kreiskrankenhauses Böblingen
18.11.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeiten

01/1997 – 02/1997	Krankenpflegepraktikum im Kreiskrankenhaus Böblingen
09/1999 – 10/1999	Famulatur in der Inneren Medizin im Kreiskrankenhaus Böblingen (Kardiologie)
10/2000 – 12/2002	Doktorarbeit in der Sektion Dermatologische Onkologie in der Hautklinik Tübingen bei Herrn Prof. Dr. med. Garbe. Thema: „Die Rolle von AP-2 bei der Melanomentstehung und Progression“
02/2001 – 03/2001	Famulatur in der Universitäts-Hautklinik Tübingen (Poliklinik)
08/2001 – 09/2001	Famulatur in der Inneren Medizin im Kreiskrankenhaus Böblingen (Gastroenterologie)
02/2002 – 03/2002	Famulatur in der Universitäts-Hautklinik Tübingen (Poliklinik und Labore)
seit 12/2003	Assistenzärztin im Städtischen Krankenhaus Friedrichshafen in der Medizinischen Klinik I

Sprachkenntnisse

Englisch in Wort und Schrift, Französisch Grundlagen, Spanisch Grundlagen, Grosses Latinum