

**Identifizierung und Charakterisierung von
Tumor-Progressions-Genen in einem
Melanoma Modellsystem**

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt

von

Tobias Hildebrandt

aus Reutlingen

2000

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2000

Dekan: Prof. Dr. H. U. Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Blin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. H. Weidle

Publikationen die im Rahmen dieser Arbeit veröffentlicht wurden:

Hildebrandt T, Preiherr J, Klostermann S, Kaul S, Zendman AJW, van Muijen GNP, Weidle UH, (1999). Identification of URIM, a novel gene up-regulated in metastasis. *Anticancer Research* 19: 525-530.

Hildebrandt T, Preiherr J, Tarbé N, Klostermann S, van Muijen GNP and Weidle UH, (2000). Identification of THW, a putative new tumor suppressor gene. *Anticancer Research* 20: 2801-2801.

Hildebrandt T, van Muijen GNP, van Dijk MCRF and Weidle UH. Loss of heterozygosity of gene THW is frequently found in melanoma metastases. *Anticancer Research*, submitted.

Preiherr J, Hildebrandt T, Klostermann S, Eberhardt S, Kaul S, Weidle UH, (2000). Transcriptional profiling of human Mammary Carcinoma Cell Lines reveals PKW, a new Tumor-Specific Gene. *Anticancer Research* 20: 2255-2264.

Brehm R, Hildebrandt T, Jarsch M, van Muijen GNP and Weidle UH, (2000). Identification of metastasis-associated genes by transcriptional profiling of a metastasizing versus a non-metastasizing human melanoma cell line. *Anticancer Research*, submitted.

Patentanmeldungen:

New gene with upregulated expression in metastatic human tumor cells and a protein coded thereby, methods of production, and use thereof. Erfinder: Hildebrandt T, van Muijen GNP, Weidle UH. EP Patentanmeldung No.98118919.4 vom 7.10.98.

A nucleic acid which is downregulated in human tumor cells, a protein encoded thereby and a process for determining whether a tumor sample has tumoricidal potential. Erfinder: Hildebrandt T, van Muijen GNP, Weidle UH. EP Patentanmeldung No.1192 NDR (Case 20677) vom 10.3.2000.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	1
Zusammenfassung.....	4
1. EINLEITUNG	6
1.1. Epidemiologie	6
1.2. Äthiologie	6
1.3. Klinik und Histologie.....	8
1.4. Prognose und Stadieneinteilung.....	9
1.4.1. Histologische Kriterien mit prognostischer Bedeutung	10
1.4.2. Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation	10
1.5. Tumormarker	12
1.6. Multistrittkarzinogenese	13
1.7. Melanom-assoziierte Antigene	14
1.8. Molekulargenetische Analyse	15
1.9. Metastasierung	16
1.9.1. Zelladhäsionsmoleküle.....	17
1.9.2. Proteinase.....	18
1.9.2.1. Das uPA-System	18
1.9.2.2. Matrix-Metalloproteinase	20
1.9.3. Angiogenese.....	20
1.9.4. Wachstumsfaktoren.....	20
1.9.5. Onkogene und Tumorsuppressorgene.....	21
1.10. Methoden zur Suche nach differentiell exprimierten Genen	23
1.11. Zielsetzung der Arbeit.....	25
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1. Material	26
2.1.1. Chemikalien und biochemische Reagenzien.....	26
2.1.2. Puffer.....	27

2.1.3. Geräte	27
2.1.4. Bakterienstämme.....	28
2.1.5. Bakterienmedien	28
2.1.6. Zellen und Zelllinien	28
2.1.7. Tumorbiopsien	31
2.1.8. Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen.....	33
2.1.9. Medien für das Screening einer Phagenbank.....	33
2.2. Methoden.....	34
2.2.1. Isolierung von Nukleinsäuren	34
2.2.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA	34
2.2.1.2. Isolierung von Poly-(A ⁺) mRNA	34
2.2.1.3. Isolierung von genomischer DNA	35
2.2.1.4. Isolierung von Plasmid DNA.....	35
2.2.1.5. Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	35
2.2.2. Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren	36
2.2.2.1 Photometrische Bestimmung	36
2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung im Gel	37
2.2.3. mRNA Differential Display	37
2.2.3.1. DNase-Verdau.....	37
2.2.3.2. Reverse Transkription.....	39
2.2.3.3. Amplifizierung und Markierung der cDNA Fragmente	39
2.2.3.4. cDNA Auftrennung mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese	40
2.2.3.5. 5'-Endmarkierung des Standard VI (Boehringer Mannheim) mit [³² P]	41
2.2.3.6. cDNA-Extraktion und Reamplifizierung	41
2.2.3.7. Verwendete Primer	42
2.2.4. Methoden zur Isolierung der vollen Länge der cDNA	43
2.2.4.1. RACE-PCR	43
2.2.4.2. Isolierung rekombinanter Klone aus einer Phagen-Bibliothek	44
2.2.4.2.1. Titerbestimmung der Phagen-Bibliothek.....	44
2.2.4.2.2. Ausplattieren der Phagen-Bibliothek	44
2.2.4.2.3. Transfer und Behandlung der Phagen auf Nitrocellulosefilter	45
2.2.4.2.4. Anreicherung und Isolierung der positiven, rekombinanten Phagen.....	45

2.2.4.2.5. Anlegen eines Phagenstocks	45
2.2.4.2.6. LD-Insert PCR	46
2.2.4.3 RT-PCR.....	46
2.2.5. Expressionsanalysen	47
2.2.5.1. Reverse Northern-Blot Analyse	47
2.2.5.2. Northern-Blot Analyse	48
2.2.5.3. Genexpressionsanalysen mittels kommerzieller Blots.....	49
2.2.6. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	50
2.2.6.1. Random Primed Methode	50
2.2.6.2. Markierung durch reverse Transkription	50
2.2.7. DNA und Protein Sequenzanalyse.....	51
2.2.8. Mikrosatelliten Analyse	51
2.2.8.1. Verwendete Marker	52
2.2.8.2. PCR Analyse	53
2.2.8.3. Analyse und Kalkulation von LOH	54
2.2.9. Klonierung in E.coli, Ligation und Transformation	54
2.2.10. Zellbiologische Methoden	55
2.2.10.1. Kultivierung der Zelllinien 530 und NMCL-1	55
2.2.10.2. Kulturbedingungen für die Melanoma-Zelllinien 530 und NMCL-1	55
3. ERGEBNISSE	57
3.1. Die Differential Display Analyse.....	57
3.2. Differentielle Expression von HLA-Genen	58
3.2.1. Differentielle Expression des HLA-DR-beta-1 Gens	58
3.2.2. Differentielle Expression des HLA-SB-beta Gens	59
3.3. Differentielle Expression der Stearoyl-CoA Desaturase (Scd)	60
3.3.1. Identifizierung von verschiedenen Scd-Transkripten	62
3.4. Identifizierung des neuen Gens URIM (Up-Regulated in Metastasis)..	65
3.4.1. Isolierung der vollen Länge cDNA mittels RACE-PCR	66
3.4.2. Expressionstudien	68

3.4.2.1. Gewebespezifische Expression von <i>URIM</i>	69
3.4.2.2. Expression in Mammakarzinom-Zelllinien.....	70
3.4.3. Charakteristika des putativen Proteins von <i>URIM</i>	71
3.4.3.1. Bestimmung des isoelektrischen Punktes	72
3.4.3.2. Identifizierung sonstiger Motive:.....	72
3.4.4. Homologien.....	73
3.4.5. Charakterisierung der genomischen Sequenz von <i>URIM</i>	73
3.4.6. Charakterisierung des chromosomalen Locus	74
3.5. Identifizierung eines neuen, putativen Tumorsuppressor Gens <i>THW</i> ...	74
3.5.1 Identifizierung mittels Differential Display	74
3.5.2. Isolierung der vollen Länge cDNA.....	75
3.5.3. Charakterisierung des putativen Proteins.....	78
3.5.3.1. Bestimmung der Protein-Zusammensetzung und des Molekulargewichts	78
3.5.3.2. Identifizierung der Sekundärstruktur:	79
3.5.4. Expressionsanalysen von <i>THW</i>	81
3.5.5. Homologievergleiche	86
3.5.6. Genomische Lokalisation des Gens <i>THW</i>	86
3.5.7. LOH Untersuchungen am Chromosom 6q	87
3.5.7.1. LOH Untersuchungen an Zelllinien	87
3.5.7.2. LOH Untersuchungen an Tumorbiopsien	91
4. DISKUSSION	94
4.1. Das Modell-System.....	94
4.2. Die Differential Display Analyse.....	95
4.3. Diskussion der differentiell exprimierten Gene	96
4.3.1. Differentielle Expression von <i>HLA</i> -Genen der Klasse II.....	96
4.3.2. Differentielle Expression der Stearoyl-CoA Desaturase	98
4.3.3. Differentielle Expression des neuen Gens <i>URIM</i>	100
4.3.4. Identifizierung des putativen Transmembranproteins <i>THW</i>	103
5. LITERATURVERZEICHNIS	108

Abkürzungen

3'/5'UTR	3'/5' untranslatierte Region
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
DD	Differential Display
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tag
<i>et al.</i>	und andere
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
h	Stunde
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
IDC	invasiv ductales Karzinom

Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	Morpholinopropanschwefelsäure
mRNA	messenger (Boten-) RNA
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
³² P	Radioaktiver Phosphor
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Picomol
q	Langer Arm eines Chromosoms
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
rpm	Umdrehungen pro Minute
LOH	Verlust der Heterozygotie
³⁵ S	Radioaktiver Schwefel
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat

SSC	Zitrat gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
UV	Ultraviolett
ü.N.	Über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumenanteil
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel

Ein- und drei- Buchstabencode der Aminosäuren

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leucin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Cys	C	Cystein	Phe	F	Phenylalanin
Gln	Q	Glutamin	Pro	P	Prolin
Glu	E	Glutaminsäure	Ser	S	Serin
Gly	G	Glycin	Thr	T	Threonin
His	H	Histidin	Trp	W	Tryptophan
Ile	I	Isoleucin	Tyr	Y	Tyrosin
Asp	D	Asparaginsäure	Val	V	Valin

DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Methode des Differential Displays das Expressionsprofil zweier Melanoma-Zelllinien miteinander verglichen. Für diese Untersuchungen stand ein Melanoma-Modellsystem, bestehend aus der humanen nicht-metastasierenden Zelllinie 530 und der humanen metastasierenden Zelllinie NMCL-1, zur Verfügung. Die beiden Zelllinien wurden bezüglich ihres Metastasierungspotentials in der Nacktmaus analysiert. Durch die Analyse der Expressionsmuster dieser beiden Zelllinien sollten bekannte und/oder neue differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die in den Prozess der Metastasierung involviert sind. Mit der Methode des Differential Displays konnten fünf differentiell exprimierte Gene identifiziert und zum Teil näher charakterisiert werden.

Es handelte sich dabei um die β -Ketten von zwei verschiedenen HLA Klasse II Genen (*HLA-DR* und *HLA-SB*), sowie um eine Stearoyl-CoA Desaturase. Ferner konnten zwei, bis dahin völlig unbekannte Gene (*URIM* und *THW*) identifiziert werden.

Die Transkripte der beiden β -Ketten von *HLA-DR* und *HLA-SB* waren ausschließlich in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 nachweisbar. Ein Verlust der Expression von HLA-II Genen resultiert in einer Störung der Antigenpräsentation. Für die metastasierende Tumorzelle könnte dies einen Mechanismus darstellen, sich der Immunantwort des Wirtes zu entziehen.

Das 5,2 kb und 3,9 kb große Transkript der Stearoyl-CoA Desaturase ist in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 gegenüber der metastasierenden Zelllinie NMCL-1 überexprimiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Transkripte für das gleiche Protein kodieren und durch die alternative Verwendung der zwei, in der 3'UTR vorkommenden, Polyadenylierungssignale generiert werden. Ebenfalls unter Verwendung dieses Polyadenylierungssignals werden zwei, bis dahin unbekannte 1,0 kb und 0,5 kb große Transkripte generiert.

Bei den Expressionsanalysen konnte das bis dahin unbekannte Gen *URIM* identifiziert werden. Eine Überexpression von *URIM* wurde in der metastasierenden Zelllinie NMCL-1, gegenüber der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 gefunden. *URIM* war ebenfalls in einem Panel von metastasierenden Mammakarzinom-Zelllinien gegenüber Zelllinien aus Primär-Tumoren überexprimiert. Mit Hilfe der RACE-PCR konnte die 750 bp lange *URIM* cDNA isoliert werden. Die Nukleotidsequenz kodiert im ORF für ein aus 206 Aminosäuren

bestehendes Protein. Der isoelektrische Punkt ($pI = 10.4$) des Proteins liegt im extrem basischen Bereich. Als Motiv konnte in der Aminosäuresequenz ein putatives Kern-Lokalisierungs-Signal gefunden werden. Aufgrund des konservierten Kern-Lokalisierungs-Signals und des extrem basischen isoelektrischen Punktes, kann eine Lokalisation des Proteins im Kern angenommen werden. Die genomische Lokalisation von *URIM* konnte auf dem Chromosom 22q11, in der sogenannten "DiGeorge Critical Region" lokalisiert werden. Das Gen hat eine Größe von ca. 3,5 kb und besteht aus vier Exons. Das putative Startcodon von *URIM* liegt nur ca. 1 kb vom Startcodon des Gens *HIRA* entfernt. Die dazwischenliegende Sequenz ist extrem GC-reich. Die beiden Gene liegen dabei in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung.

Das zweite neu identifizierte Gen (*THW*) ist als ca. 2 kb Transkript in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530, gegenüber der stark-metastasierenden Zelllinie NMCL-1 überexprimiert. Die Sequenz der vollständigen cDNA besteht aus 1890 Nukleotiden, und kodiert in seinem offenen Leserahmen für ein putatives Protein von 193 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 21,3 kD. Durch computergestützte Analysen konnten in dem putativen Protein THW vier hydrophobe Transmembrandomänen identifiziert werden. Diese bilden einen kleinen und einen großen extrazellulären Loop. Das amino- und carboxyterminale Ende, sowie ein kleiner Loop liegen dabei im intrazellulären Bereich. Aufgrund dieser Membran-Topologie, die charakteristisch für die Tetraspanine ist, kann THW dieser Superfamilie zugerechnet werden. Mit Hilfe von Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Expression von *THW* mit dem Metastasierungspotential von Melanoma-Zelllinien und in einem Panel von Mammakarzinom-Zelllinien invers korreliert. Beim Vergleich der Expressionsstärke von *THW* in Tumorgewebe, versus autologem Normalgewebe konnte eine Herunterregulierung im Tumorgewebe beobachtet werden.

THW konnte auf dem langen Arm von Chromosom 6 lokalisiert werden. Allelverluststudien mit Tumor-Biopsien im Bereich des *THW* Locus ergaben eine Prävalenz von 10-20% für Melanoma-Primärtumore und 50% für Tumormetastasen. Auch in verschiedenen Tumor-Zelllinien wurden zum Teil sehr hohe Prävalenzen für diesen Bereich nachgewiesen. Die Größe des deletierten Bereiches wurde auf ca. 20 cM eingegrenzt.

1. Einleitung

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der vom melanozytären Zellsystem ausgeht und sich überwiegend an der Haut manifestiert. Selten kommt es auch am Auge (Uvea und Retina), an den Hirnhäuten und an Schleimhäuten verschiedener Lokalisationen vor. Das Melanom ist zumeist stark pigmentiert. Im Verhältnis zur Tumormasse besteht eine frühe Tendenz zur Metastasierung und zeigt damit eine ungünstige Prognose. Der Anteil des malignen Melanoms an der Mortalität durch Hautkrebs beträgt ca. 90%.

1.1. Epidemiologie

Das maligne Melanom ist in Mitteleuropa für ca. 2% aller malignen Neubildungen verantwortlich. Die Melanominzidenz nimmt weltweit zu, insbesondere bei stark sonnenexponierten, hellhäutigen Bevölkerungsgruppen (Grin-Jorgensen *et al.*, 1992; Sober *et al.*, 1990). So wurden in Teilen Australiens Inzidenzraten von 40-50 pro 100 000 Einwohner verzeichnet (Burton *et al.*, 1993). Das maligne Melanom der Haut gehört daher in Australien zu den häufigsten Krebsformen. Die Zahlen zeigen in welchen Größenordnungen für diesen Tumor bei hoher UV-Einstrahlung in weißen Bevölkerungen gerechnet werden muss. In einigen ethnischen Gruppen (Asiaten, Afrikaner) ist das maligne Melanom hingegen selten und nahezu ausschließlich im Schleimhautbereich oder palmoplantar lokalisiert. Auch in Deutschland ist eine starke Zunahme der Inzidenz festzustellen. Die Daten des saarländischen Krebsregisters zeigen seit Beginn der 70er Jahre eine deutliche Zunahme der registrierten Fälle und einen Anstieg der Inzidenzraten um etwa 3 Fälle pro 100 000 Einwohner, auf 10-12 Fälle pro 100 000 Einwohner für Anfang der 90er Jahre (Garbe *et al.*, 1992).

Am malignen Melanom sterben bei weitem mehr Menschen als an allen anderen Hauttumoren zusammen. Eine Analyse der Daten der offiziellen Todesursachenstatistik zeigte für die alten Bundesländer einen Anstieg der Fallzahlen von ca. 900 pro Jahr zu Beginn der 70er Jahre, auf mehr als 1600 Fälle zu Beginn der 90er Jahre (Garbe *et al.*, 1992).

1.2. Äthiologie

Individuen mit hoher Nävus-Zahl und Träger von Melanomvorläufern (sog. dysplastische Nävi, kongenitale Nävi) sind besonders gefährdet. Polygene Erbfaktoren können zur familiären Häufung von Melanomen führen (sog. FAMMM: familial atypical multiple mole melanoma syndrome) (Albert *et al.*, 1990; Garbe *et al.*, 1994; Greene *et al.*, 1985; Holly *et al.*, 1987). Es wird geschätzt, dass ca. 8-12% aller malignen Melanome bei Personen mit einer

familiären Prädisposition auftreten. Das Risiko der Melanomentwicklung ist für Personen mit familiärem Melanom und dysplastischem Nävussyndrom um den Faktor 100 bis 1000 erhöht und das lebenslange Risiko der Melanomentwicklung liegt bei mehr als 50%. In Studien bei familiärem Melanom wurden verschiedene chromosomale Loci identifiziert, insbesondere auf den Chromosomen 1p und 9p (Battistutta, 1994), die in Bezug zu dieser Prädisposition zu stehen scheinen. Auf dem Locus 9p21 liegt ein Tumorsuppressorgen, das für den CDK-Inhibitor p16 kodiert und bei familiären Melanomen oft mutiert vorliegt (Gruis *et al.*, 1995).

Neben diesen konstitutionellen Faktoren nimmt die UV-Belastung, unter den exogenen Einflußgrößen, eine zentrale Stellung ein. Die ultraviolette Einstrahlung auf die Haut spielt dabei eine duale Rolle. Zum Einen verursacht UV-Strahlung DNA-Schäden. Zum Anderen wirkt UV-Strahlung immunsuppressiv. Folgende Beziehung zwischen Sonnenexposition und Melanomentstehung wurde immer wieder herausgestellt: Je heller der Pigmentierungstyp ist, desto höher ist die Melanominzidenz. Innerhalb der weißen Bevölkerung kann je nach Hauttyp das Melanomrisiko um den Faktor 2-4 schwanken (Gutaman *et al.*, 1993). Die Melanominzidenz nimmt mit der Nähe zum Äquator zu (Scotto *et al.*, 1987). Da sich die Freizeitgewohnheiten in den letzten Jahrzehnten geändert haben, wurde eine Zunahme der Melanominzidenz in Körperregionen beobachtet, die dadurch vermehrt der Sonne ausgesetzt sind, wie z.B. am Rumpf des Mannes und den Beinen der Frau. Nach neueren Hinweisen scheint zwischen der Entstehung von Melanomen und UV-B-Bestrahlung ein direkter Zusammenhang zu bestehen: Die Umweltbehörde der USA geht davon aus, dass bei einer langfristigen Abnahme der Ozonschicht um 1% die Häufigkeit bösartiger Melanome um 2% ansteigt. Auch andere Hautkrebskrankungen werden häufiger: Nehmen die Ozonwerte in unseren Breiten um 1% im Mittel ab, so steigen 20 Jahre später die Nicht-Melanom-Hautkrebsfälle um 3% an. Kontrovers wird die Bedeutung toxischer, medikamentöser oder endokriner Einflüsse (z.B. Gravidität, Kontrazeptiva) beurteilt. Zahlreiche Beispiele (Spontanremissionen, aggressive Verläufe bei immunsupprimierten Personen) belegen die Bedeutung immunologischer Faktoren in der Tumorprogression dieser Neoplasie (Sauter und Herlyn, 1998).

1.3. Klinik und Histologie

Das maligne Melanom ist kein einheitlicher Tumor. Anhand morphologischer, histologischer und biologischer Kriterien lassen sich verschiedene Melanomtypen voneinander unterscheiden (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: *Klinisch-histologische Subtypen kutaner maligner Melanome im deutschsprachigen Raum. Ergebnisse des Zentralregisters Malignes Melanom 1983 - 1995 (n = 30.015) nach Barnhill et al. (1993) und Koh (1991).*

Typ	Abkürzung	Prozentualer Anteil	Medianes Alter
Superfiziell spreitendes Melanom	SSM	57,4 %	51 Jahre
Noduläres Melanom	NM	21,4 %	56 Jahre
Lentigo-maligna-Melanom	LMM	8,8 %	68 Jahre
Akral-lentiginöses Melanom	ALM	4,0 %	63 Jahre
Nicht klassifizierbares Melanom	UCM	3,5 %	54 Jahre
Sonstige		4,9 %	54 Jahre

Grundlagen der Klassifizierung sind Wachstumsverhalten, Entwicklungsweg und Lokalisation. Einige Typen sind jedoch nicht klassifizierbar oder repräsentieren Mischformen. Klinische Sonderformen sind z.B. amelanotische Melanome, Schleimhaut- oder andere extrakutane Melanome, die etwa 5% aller Melanome ausmachen (Barnhill *et al.*, 1993; Koh 1991). Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) beginnt mit einer intraepidermalen horizontalen Ausbreitungsphase zunächst als Fleck, entwickelt sich dann invasiv flach erhaben, häufig mit farblicher Vielfalt, hellen Regressionszonen und sekundär knotigen Anteilen. Histologisch charakteristisch ist ein pagetoides Muster der intraepidermalen Tumorkomponente im Randbereich. Das Lentigo-maligna-Melanom entsteht oft erst nach vielen Jahren aus einer Lentigo maligna (in-situ Melanom) nahezu ausschließlich im Gesichtsbereich älterer Patienten. Das akral-lentiginöse (akrolentiginöse) Melanom findet sich vorwiegend palmoplantar, aber auch als sub- oder periunguales Melanom. Es zeichnet sich in seiner intraepidermalen Frühphase meist durch unscharf begrenzte, inkohärente Pigmentierungen aus, ehe die knotigen Anteile das invasive Wachstum signalisieren. Das noduläre Melanom imponiert hingegen als primär knotiger, exophytischer, überwiegend

schwarzbrauner, häufig erosiv-blutiger Tumor, dem eine initiale horizontale Wachstumsphase und damit die Möglichkeit zur Frühdiagnose fehlt.

1.4. Prognose und Stadieneinteilung

Ca. 90% aller malignen Melanome kommen derzeit als Primär-Tumor ohne erkennbare Metastasierung zur ersten Diagnose. Die 10-Jahres-Überlebensrate im Gesamtkollektiv beträgt ca. 75-80%. Die wichtigsten prognostischen Faktoren beim primären malignen Melanom ohne Metastasen sind nach neueren Studien (Balch *et al.*, 1992; Barnhill *et al.*, 1993; National Instituts of Health, 1992; Garbe *et al.*, 1995) folgende: Die vertikale Tumordicke nach Breslow (s. Abbildung 1) am histologischen Präparat ($\leq 0,75$ mm: ca. 97% 10-Jahres-Überlebensrate (10-JÜR); 0,76-1,5 mm: ca. 90% 10-JÜR; 1,5-4 mm ca. 65% 10-JÜR; > 4 mm: ca. 50% 10-JÜR), der Invasionslevel nach Clark (s. Abbildung 1) (insbesondere die Unterscheidung zwischen Level II und III), der klinisch-histologische Typ (ungünstig: primär noduläre Melanome und akrolentiginöse Melanome), das Geschlecht (signifikant schlechtere Prognose für Männer), die Tumorlokalisierung (ungünstige Prognose für Rumpf, Oberarme, Hals und behaartem Kopf), sowie das Vorhandensein einer Ulzeration.

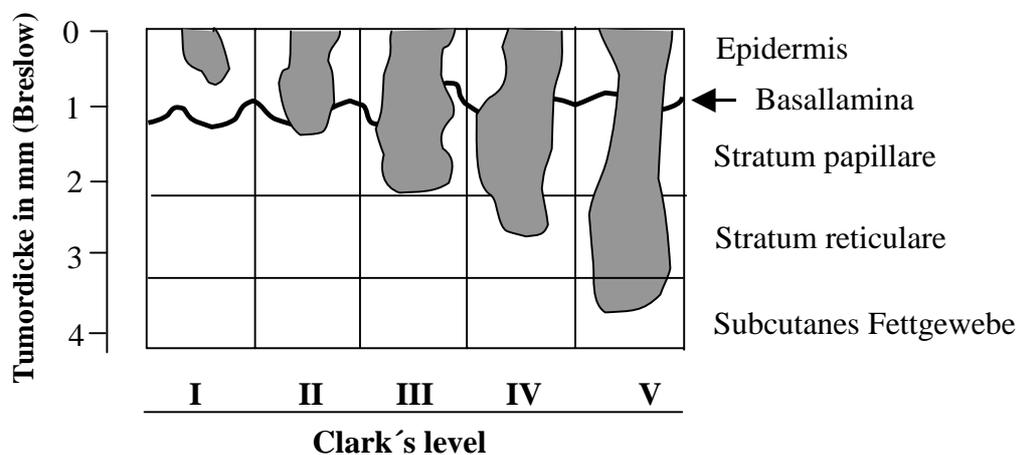


Abbildung 1: Das Diagramm zeigt kombiniert das „Microstaging“ nach Clark und Breslow. Das Invasionslevel nach Clark basiert auf der Anatomie, während Breslow die Invasionstiefe des Tumors in Millimeter misst.

Das maligne Melanom kann sowohl primär lymphogen als auch primär hämatogen metastasieren. Etwa 2/3 aller Erstmetastasierungen sind zunächst auf das regionale Lymphabflußgebiet beschränkt. Eine regionale Metastasierung kann manifest werden mit Satelliten-Metastasen (bis 2 cm um den Primär-Tumor), sowie mit lokalen Rezidiven nach

Entfernung des Primär-Tumors mit ungenügendem Sicherheitsabstand, mit In-transit-Metastasen und mit regionalen Lymphknotenmetastasen.

1.4.1. Histologische Kriterien mit prognostischer Bedeutung

Die Tumordicke nach Breslow ist das wichtigste, histologisch zu bestimmende, prognostische Merkmal eines malignen Melanoms. Dazu wird die zur Hautoberfläche vertikale Distanz zwischen Stratum granulosum und den untersten Tumorzellen in mm am geeichten Mikroskop bestimmt. Der histologische Schnitt muss dazu aus der dicksten Stelle des Melanoms stammen. Gegenüber der Tumordicke scheint das Invasionslevel nach Clark nachrangig zu sein. Beide Merkmale gehen jedoch in die TNM-Klassifikation ein, die Tumordicke jedoch vorrangig gegenüber der Eindringtiefe.

1.4.2. Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation

Die Stadieneinteilung des malignen Melanoms basiert auf Tumordicke und Invasionslevel des Primärtumors (pT) und dem Umfang der feststellbaren Metastasierung, wobei regionale Metastasen (N) von Fernmetastasen (M) unterschieden werden (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Melanoms (UICC, 1997).

pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Melanoma in situ (Clark-Level I)
pT1	Tumordicke $\leq 0,75$ mm und Clark-Level II
pT2	Tumordicke 0,76 - 1,5 mm und/oder Clark-Level III
pT3a	Tumordicke 1,51 - 4,0 mm und/oder Clark-Level IV
pT4a	Tumordicke $> 4,0$ mm und/oder Clark-Level V
pT4b	Satelliten innerhalb von 2 cm vom Primärtumor
pTb	In-transit-Metastasen* vor der regionalen Lymphknotenstation

Die pT-Klassen werden nach der vertikalen Tumordicke nach Breslow festgelegt, nur bei fehlender Tumordickenangabe wird der Invasionslevel nach Clark herangezogen.

* In-transit-Metastasen sind Metastasen der Haut oder Subkutis, die mehr als 2 cm vom Primärtumor entfernt, aber nicht jenseits der regionalen Lymphknoten liegen.

Die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei Patienten mit Satelliten- und In-transit-Metastasen ca. 25-40% und bei Patienten mit klinisch manifesten regionalen LK-Metastasen ca. 15-30%. Bei Fernmetastasierung ist die Prognose in der Regel ungünstig, die mediane Überlebenszeit ohne Behandlung beträgt nur ca. 4-6 Monate.

Basierend auf der TNM-Klassifikation wurde von der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft eine mehr Prognose-orientierte Stadieneinteilung empfohlen, die auch die Ausbreitung des Tumors jeweils eindeutig erkennen läßt (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Stadieneinteilung nach den Empfehlungen der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (Orfanos et al., 1994).

Stadium	pT	N	M	10 Jahre Überlebenswahrscheinlichkeit
Ia	pT1 ($\leq 0,75$ mm)	N0	M0	97 %
Ib	pT2 (0,76 - 1,5 mm)	N0	M0	90 %
IIa	pT3 (1,51 - 4,0 mm)	N0	M0	67 %
IIb	pT4 ($> 4,0$ mm)	N0	M0	43 %
IIIa	pTa, pTb*	N0	M0	28 %
IIIb	jedes pT	N1, N2	M0	19 %
IV	jedes pT	jedes N	M1	3 %

* Satelliten-Metastasen werden als pTa und In-transit-Metastasen als pTb bezeichnet

N0=Keine regionalen Lymphknotenmetastasen, N1=Metastase(n) 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung in irgend einem regionalen Lymphknoten, N2= Metastase(n) mehr als 3 cm in größter Ausdehnung in irgendeinem regionalen Lymphknoten und/oder In-transit-Metastasen M0=keine Fernmetastasen, M1=Befall von Haut, Subkutis oder Lymphknoten jenseits der regionalen LK und Viszerale Metastasen.

1.5. Tumormarker

Die steigende Inzidenz von Melanomen sowie die schlechte Prognose bei Metastasierung veranlaßte in den letzten Jahren verschiedene Arbeitsgruppen, potentielle Tumormarker auf ihre klinische Eignung zu untersuchen. Tumormarker sind im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten zirkulierende Makromoleküle oder zelluläre Veränderungen, deren Auftreten und Konzentrationsänderung in Beziehung mit der Entstehung und dem Wachstum von malignen Tumoren eines Individuums steht. Etablierte Tumormarker gibt es für das maligne Melanom nicht. Es wurde versucht, Melaninmetaboliten wie das 5-S-Cysteindopa als mögliche Tumormarker im Urin von Patienten zu bestimmen. Diese treten jedoch erst bei weit fortgeschrittener Metastasierung vermehrt auf, steigen aber auch bei Aktivierung des Pigmentsystems z.B. durch Sonneneinstrahlung (Horiskoshi *et al.*, 1994). Berichte über erhöhte Konzentrationen von ICAM-1-Molekülen, einem Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, im Serum von Patienten mit Fernmetastasen konnten in größeren Studien nicht bestätigt werden. Auch die Aussagekraft erhöhter Serumwerte des Proteins S-100 bei metastasierendem Melanom kann als nicht gesichert gelten (Guo *et al.*, 1995). S-100 ist als saures Kalziumbindendes Protein ein Mitglied einer Genfamilie, die bisher 16 Mitglieder umfaßt. Seine Funktion liegt in der Zellzyklusprogression und Differenzierung. Auch durch den Einsatz von sensitiven molekularbiologischen Techniken (z.B. Tyrosinase-RT-PCR) war es bisher nicht möglich einen frühen Progressionsmarker des Melanoms zu etablieren (Battayani *et al.*, 1995).

1.6. Multistrittkarzinogenese

Die maligne Transformation von Zellen und die Progression von Tumoren sind Folgen einer Anhäufung verschiedener genetischer Veränderungen. So verläuft die Veränderung von normalen Melanozyten bis hin zur metastasierenden Melanomazelle über mehrere Progressionsstufen (s. Abbildung 2). Innerhalb der verschiedenen Stufen kommt es zu verschiedenen mutagenen Ereignissen. Die daraus resultierenden zytogenetischen Veränderungen manifestieren sich phänotypisch und in unterschiedlichem Wachstumsverhalten der Zellen. Die Karzinogenese des malignen Melanoms besteht in einer Anhäufung von Schäden auf unterschiedlichen biologischen Ebenen. Durch ein Initiationsereignis (z.B. UV-Strahlung oder chemische Karzinogene) werden normale Melanozyten für die Tumorentstehung prädisponiert. Durch weitere Promotionsereignisse werden die Zellen weiter entdifferenziert.

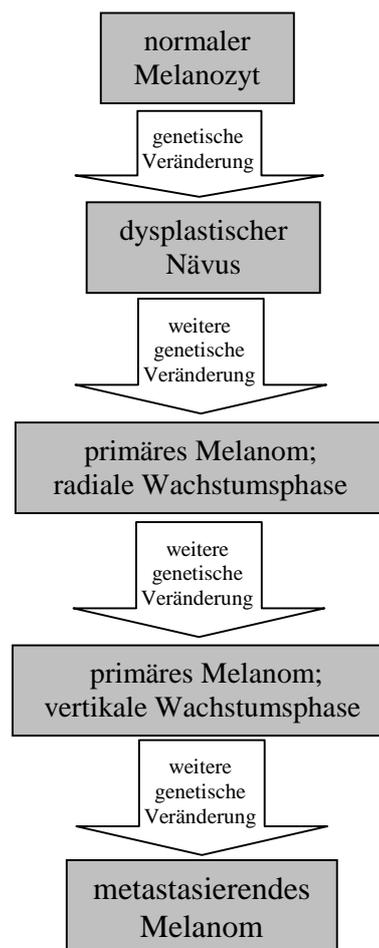


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Multistrittkarzinogenese.

1.7. Melanom-assoziierte Antigene

MAGE, BAGE und GAGE sind die wichtigsten Melanom-assoziierten Antigene. Sie sind in drei verschiedene Genfamilien eingeteilt. Zur *MAGE*-Genfamilie gehören mindestens 12 Mitglieder, die alle auf dem X-Chromosom lokalisiert sind. Die Mitglieder der *MAGE*-, *BAGE*- und *GAGE*-Genfamilien werden von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und zeichnen sich durch ein typisches Expressionsmuster aus (Gaugler *et al.*, 1994; van den Eynde *et al.*, 1995; van Pel *et al.*, 1995). In normalen Geweben zeigen sie außer in Testis keine Expression. Auch in normalen Melanozyten findet man keine Expression. In einigen Tumoren sind sie recht häufig exprimiert (Melanom, Lungenkarzinom, Sarkom, Blasenkarzinom), während sie in anderen Tumoren (Gehirntumor, Nierenkarzinom, Leukämie) nur sehr selten nachweisbar sind. Die Funktion der Genprodukte ist noch nicht bekannt. Beim Vergleich der Expression von *MAGE-1*, *MAGE-3* und *BAGE* (s. Tabelle 4) ergibt sich folgendes Bild (van Pel *et al.*, 1995).

Tabelle 4: Vergleich der Expression von *MAGE-1*, *MAGE-3* und *BAGE* in primären Melanomen und Metastasen.

	Melanom gesamt	Primäres Melanom	Metastase
MAGE-1	36%	14%	42%
MAGE-3	65%	36%	74%
BAGE	22%	8%	26%

In neueren Publikationen wird eine weitere Antigenklasse beschrieben. Aufgrund ihres Expressionsprofils und ihrer genomischen Lokalisation auf dem X-Chromosom wird diese Klasse als CTA-Klasse I (Cancer/Testis Antigen) bezeichnet. Dazu gehören zum Einen *NY-ESO-1* (Chen *et al.*, 1997), *CTp11* (Zendman *et al.*, 1999), sowie die *SSX*-Gen-Familie (Tureci *et al.*, 1998).

1.8. Molekulargenetische Analyse

Zytogenetisch zeigen mehrere Chromosomen bevorzugte Lokalisationen für Veränderungen und geben Hinweise auf molekulargenetische Faktoren.

Chromosom	1	6	7	9	10	11	17
betroffene Regionen	1p 11-22 1q 11-32	6p 6q 11-26	7p 7q 11	9p 24 9q 12	10p 25-26	11p 11-14 11q 23-25	17p 13

Während ein spezifisches Melanomgen weiterhin nicht bekannt ist, ereignen sich in der Kaskade von Mutationen auf dem Weg vom Melanozyt zur metastasierenden Melanomazelle sowohl frühe als auch vielfältige späte Mutationen. Die frühen und charakteristischen Promotionseffekte werden oft durch UV-induzierte Punktmutationen an Tumorsuppressorgen hervorgerufen (Kress *et al.*, 1992; Piepkorn, 1994). Weiss *et al.* (1994) konnten am Tumorsuppressorgen *p53* in primären humanen Melanomen nachweisen, dass überwiegend C→T und CC→TT Transitionen in den Exons 5-8 des Chromosoms 17p13.1 vorkommen. Dies entspricht einer UV-induzierten Punktmutation in den pyrimidinreichen Domänen der DNA. Gleiches gilt für das Tumorsuppressorgen *CDKN2* (Herbst *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994). Somit gelingt es, UV-induzierte Mutationen in der frühen Melanomprogression als Pyrimidin-Transitionen zu charakterisieren und somit von den vielfältigen Transversionen, verursacht durch andere Karzinogene, zu unterscheiden.

durch Transition

UV-B	C→T
UV-ähnliche Karzinogene	CC→TT

durch Transversion

alkylierende Karzinogene	G→C
Benz(a)pyrene	T→A
Andere Chemikalien	G→T

1.9. Metastasierung

Die medizinische Relevanz des malignen Melanoms liegt nicht so sehr in einer örtlichen Aggressivität des Primärtumors, als vielmehr in seiner ausgeprägt starken und oft recht frühzeitigen Neigung zu lymphogener oder/und hämatogener Metastasierung mit letalem Ausgang. Die Zehnjahresüberlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei Patienten mit Satelliten- und In-transit Metastasen ca. 25-40% und bei Patienten mit regionalen Lymphknotenmetastasen 15-30%. Bei Fernmetastasen beträgt die mediane Überlebenszeit nur ca. 4-6 Monate. Der Prozess der Metastasierung ist sehr komplex und kann in mehrere Schritte unterteilt werden (Bastida *et al.*, 1988; Fidler, 1989).

1. Auswachsen des Primärtumors:

Das Melanom geht von der radialen Wachstumsphase in ein invasives Wachstum (vertikale Wachstumsphase) über. Die Tumorzellen durchdringen die Basalmembran und wandern in das subepitheliale Bindegewebe. Sie bewegen sich in Lymphspalten und im Bindegewebe weiter (Invasion) und können Teile des Bindegewebes abbauen (Destruktion).

2. Angiogenese und Dissoziation:

Aus vorhandenen Blutgefäßen sprossen Kapillaren in den wachsenden Tumor ein und es bildet sich ein bindegewebiges Stroma. Einzelne Tumornester oder einzelne Tumorzellen lösen sich aus dem Zellverband. Voraussetzung hierfür ist der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, die für den Zusammenhalt des normalen Epithels verantwortlich ist.

3. Überleben und Embolisierung:

Wenn adhärent wachsende Zellen den Substratkontakt, z.B. zur Basalmembran oder zu Keratinozyten verlieren, wird in der Regel ein Apoptose-Programm ausgelöst. In Tumorzellen, die in der Blutbahn überleben, müssen Mechanismen zum Schutz vor Apoptose aktiv sein. In ca. 90% aller Karzinome bilden sich Fernmetastasen in denjenigen Kapillarnetzen, in die die Tumorzellen entsprechend der anatomischen Lokalisation des Tumors zuerst gelangen. Beim malignen Melanom bilden sich die meisten Metastasen im Gehirn, der Lunge und der Leber. Dies kann über eine Embolisierung der Endostrombahn oder durch Adhärenz der Tumorzellen an das Endothel geschehen.

4. Metastasenwachstum:

Die Tumorzellen durchdringen das Endothel mit der endothelialen Basalmembran, invadieren das subendotheliale bindegewebige Stroma und im weiteren Verlauf das Parenchym des betreffenden Organs. Hier bilden sich schließlich solide Metastasen heran (Wagener, 1999).

An dem Prozess der Metastasierung sind eine Vielzahl von Faktoren, wie Zelladhäsionsmoleküle, Proteasen, Wachstumsfaktoren, Onkogene, Tumorsuppressor-Gene, Moleküle der DNA Reparatur, Motilitätsfaktoren, Zytokine und Faktoren der Angiogenese, beteiligt.

1.9.1. Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle vermitteln den Kontakt von Zellen untereinander und die Adhärenz von Zellen an die Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM). Zelladhäsionsmoleküle sind an allen Schritten der malignen Progression beteiligt. Durch Verlust und/oder Dysregulation von diesen Proteinen geht die geordnete Gewebestruktur verloren und Tumorzellen lösen sich aus dem Gewebeverband. Voraussetzung für die Infiltration bindegewebiger Strukturen ist die Expression von Adhäsionsmolekülen die an Bestandteile der ECM binden.

Die Expression von E-Cadherin, einem Zelladhäsionsmolekül, das die Bindung von Melanozyten an Keratinozyten vermittelt (Nesbit *et al.*, 1994) ist herunterreguliert, während die Expression von N-Cadherin hochreguliert wird (Hsu *et al.*, 1996).

Mitglieder der Integrin-Familie vermitteln die Bindung von Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Komponenten der ECM wie z.B. Fibronectin und Kollagene fördern *in vitro* und *in vivo* die Migration von Zellen. Tumorzellen benötigen Kontaktstellen um sich im interstitiellen Bindegewebe fortbewegen zu können, daher setzt invasives Wachstum eine Expression der entsprechenden Rezeptoren voraus. Bei Melanomen hängt die Häufigkeit von Fernmetastasen und damit die Prognose des Patienten von der Eindringtiefe der Tumorzellen in die Dermis ab. Bei malignen Melanomen korreliert die Eindringtiefe in die Dermis mit der Expressionsstärke des Adhäsionsmoleküls $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Albelda *et al.*, 1990; Natali *et al.*, 1997). $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet an das Tripeptid RGD, welches z.B in Fibronectin vorkommt. Im Tiermodell ließ sich, durch Zugabe von RGD-Peptiden, die Integrinbindung und somit die Metastasierung inhibieren (Humphries *et al.*, 1986).

Auch bei *MCAM* und *ICAM-1*, zwei Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie, korreliert die Eindringtiefe in die Dermis mit der Expressionsstärke (Johnson, 1991). So zeigen Melanome *in situ* keine *ICAM-1*-Expression, während invasive Tumore eine sehr starke Expression zeigen, die auch in Metastasen bestehen bleibt (Collins und White, 1995).

MUC18, ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, wird mit zunehmender Progression des Tumors stärker exprimiert (Johnson *et al.*, 1989) und verleiht Melanomzellen ein höheres Metastasierungspotential (Xie *et al.*, 1997). Die verminderte Expression des Transkriptionsfaktors *AP-2* korreliert mit der Hochregulierung von *MUC-18*. In normalen

Melanozyten in der Epidermis wird die Expression durch Keratinozyten unterdrückt (Shih *et al.*, 1994).

CD44 umfasst eine Gruppe heterogener Glykoproteine (mit mindestens 20 Isoformen), deren Hauptligand Hyaluronsäure ist. Die Beteiligung dieses Moleküls an der malignen Progression ist zwar nicht gesichert, dennoch zeigen Versuche, dass eine Überexpression von CD44 mit einer erhöhten Metastasierungsrate korreliert (Bartolazzi *et al.*, 1994).

Auch die Expression von Selektinen (Selective lectin dependent cell adhesion molecule) scheint mit dem Metastisierungspotential von Melanomzellen zu korrelieren. Biancone *et al.* (1996) zeigten, dass die experimentelle Metastasierung durch Blockierung der Interaktion von E-Selektin mit Glykokonjugaten der Tumorzellen gehemmt werden kann.

1.9.2. Proteinasen

Proteinasen sind an der Degradierung der Basalmembran, des Endothels und der extrazellulären Matrix beteiligt und fördern so das invasive Wachstum von Tumoren. Proteinasen werden entsprechend struktureller Eigenschaften des enzymatisch aktiven Zentrums, Unterschieden im pH-Optimum, Abhängigkeit von Kationen und der Empfindlichkeit gegen Inhibitoren, in Serin-, Cystein-, und Metalloproteinasen eingeteilt. Im folgenden werden zwei Systeme, Serin- und Metalloproteinasen vorgestellt, denen im Rahmen der malignen Progression von Melanomen ein besonderer Stellenwert zukommt (Pöllänen *et al.*, 1991; Mignatti und Rifkin, 1993).

1.9.2.1. Das uPA-System

Der Serinprotease Plasmin kommt eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression zu. Plasminogen, das inaktive Proenzym von Plasmin, wird durch den Plasminogenaktivator uPA in seine aktive Form überführt. Plasmin spaltet neben Fibrin auch Bestandteile der extrazellulären Matrix und der Basalmembran wie Fibronectin, Laminin, Thrombospondin und nicht-fibrilläre Kollagene (Liotta *et al.*, 1981). Plasmin aktiviert durch proteolytische Spaltung andere Proteinase wie Metalloproteinase, die dann Kollagen vom Typ IV und weitere Komponenten der Basallamina degradieren (Coussens, 1996). Zum uPA-System zählen außerdem auch die beiden in der ECM vorkommenden Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren 1 und 2 (PAI-1 und PAI-2). Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA), sein Rezeptor (uPAR), sowie die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 bilden ein komplexes System, das Proteolyse, Zelladhäsion und ECM-Struktur reguliert. An der Zelloberfläche der Tumorzellen kann uPA nach Bindung an den uPA-Rezeptor Plasminogen in Plasmin spalten.

Plasmin selbst kann dann direkt ECM-Bestandteile lysieren oder weitere Kollagenasen und Wachstumsfaktoren aktivieren (Reuning *et al.*, 1998). Die Aktivität von uPA wird außerdem durch die Bindung der Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 kontrolliert.

Prinzipiell können die Komponenten des uPA-Systems von den Tumorzellen sowie von Endothelzellen, Fibroblasten oder infiltrierenden Leukozyten synthetisiert werden. Lokalisierungs- und Expressions-Studien ergaben aber, daß der uPA-Rezeptor in erster Linie von den Tumorzellen, uPA allerdings nur von den Tumorzellen der Invasionsfront und von den Stromazellen gebildet wurde. PAI-1 war überwiegend in der extrazellulären Matrix nachweisbar (Weidle *et al.*, 1994). Eine Reihe von experimentellen Daten, die die Bedeutung des Systems für die Invasivität von Zellen *in vitro* und *in vivo* belegen, konnten in klinischen Studien bestätigt werden. Beim Mammakarzinom gelten uPA und PAI-1 als unabhängige Prognosefaktoren für den Verlauf bei Patientinnen mit metastasefreien Lymphknoten (Grondahl-Hansen *et al.*, 1993). Die Komponenten des uPA-Systems werden nur in fortgeschrittenen Primärtumoren und in Metastasen exprimiert. PAI-1 war dabei in der extrazellulären Matrix nachweisbar, die den Tumor umgab (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Expression von Komponenten des uPA-Systems in fortgeschrittenen primären Melanomen und Melanommetastasen (nach deVries *et al.*, 1994).

	Benigne Naevi (%)	Melanome (%)	Lokalisation
uPA	0	41 41	Tumorzellen Stromazellen
uPAR	0	38 15	Tumorzellen Stromazellen
PAI-1	0	24 10 13	ECM Tumorzellen Stromazellen
PAI-2	0	31 15	Tumorzellen Stromazellen

1.9.2.2. Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) umfassen eine Gruppe sezernierter und membranständiger Enzyme, die Bestandteile des interstitiellen Bindegewebes und der Basalmembran abbauen können. Basierend auf ihrer Substratspezifität und Sequenzhomologie werden die MMPs in drei Hauptgruppen eingeteilt. Kollagenasen bauen fibrilläre Kollagene ab, Stromelysine bauen Proteoglykane und Glykoproteine ab und Gelatinasen degradieren nicht-fibrilläre- und denaturierte fibrilläre Kollagene.

In Melanomen wird die Kollagenase Typ IV (MMP-2) durch Interleukin 8 induziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion. Die Metastasierung wird durch ihre Fähigkeit die ECM aufzulösen und Angiogenese zu induzieren begünstigt (Luca *et al.*, 1997). Aktives MMP-2 wird an der Zelloberfläche von Melanomen über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine gebunden und kann so wirksam werden (Brooks *et al.*, 1996).

1.9.3. Angiogenese

Die Angiogenese, d.h. die Ausbildung neuer Blutgefäße aus bestehenden Gefäßen und somit Anschluß eines soliden Tumors an das Blutgefäßsystem, ist ein weiterer wichtiger Schritt bei der Tumorprogression. Eine Korrelation zwischen Tumordicke, Ausmaß der Vaskularisierung und Metastasierung wurde beschrieben (Srivastava *et al.*, 1986). Die abnormale Morphologie und Größe der Endothelzellen in den neu gebildeten Blutgefäßen erleichtert das Einwandern von disseminierenden Tumorzellen in das Blutgefäßsystem und fördert so die Metastasierung (Harries, 1997). In Melanomen gilt der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) als Angiogenese-Induktor (Erhard *et al.*, 1997).

1.9.4. Wachstumsfaktoren

Um an einer distanten Stelle einen Sekundärtumor zu etablieren, ist die Fähigkeit zur Proliferation der metastasierenden Zelle von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Wachstumsfaktoren wirken als Regulatoren der Tumorproliferation, wobei gezeigt wurde, dass Tumore zunehmend unabhängig von exogenen Faktoren werden. So produzieren Melanomzellen selbst viele positive Wachstumsregulatoren (Edward *et al.*, 1993). Zu diesen autokrinen Wachstumsfaktoren gehört bFGF (basic fibroblast growth factor) (Halaban, 1988; Rodeck; 1991), ebenso wie IL-8 (Schadendorf *et al.*, 1993). Eine Korrelation von Tumorprogression bei Melanomen und Expressionsstärke wurde für *TGF- β 2* und *TGF- β 3* (Transforming growth factor) beschrieben (Schmid *et al.*, 1995). *TGF- β 2* und *TGF- β 3* sind

nicht in Melanozyten zu finden, zeigen aber in Nävi, Melanomen und Metastasen eine zunehmende Expression.

Die Expression des *erbB*-Gens, welches für den EGF-Rezeptor (epidermal growth factor) kodiert, korreliert ebenfalls mit der Tumorprogression. So zeigen Melanozyten und Nävi keine Expression, dysplastische Nävi und Melanome in der radialen Wachstumsphase zeigen eine schwache Expression, während Melanome in der vertikalen Wachstumsphase und Metastasen eine sehr starke Expression zeigen (Elder *et al.*, 1989; Ahern *et al.*, 1993).

1.9.5. Onkogene und Tumorsuppressorgene

Das *p16^{ink4}*-Gen (*CDKN2*, *MLM*, *MTS1*) auf Chromosom 9p21 kodiert für ein Protein (p16) mit wichtigen Funktionen in der Regulation des Zellzyklus. Das p16-Genprodukt bindet an den Komplex von CDK4 (Cyclin dependent kinase 4) und Cyclin D oder CDK6 und Cyclin D und verhindert so die Phosphorylierung von RB1. Dies hat eine Blockierung des Zellzyklus in der späten G1-Phase zur Folge. Drei von vier nachgewiesenen *CDKN2A*-Austauschmutationen stören offenbar die Ausbildung stabiler Komplexe zwischen p16 und den Kinasen. Als Resultat solcher Austauschmutationen ist eine massive Zellproliferation vorstellbar (Renade *et al.*, 1995).

In Melanomen konnte nachgewiesen werden, dass das *p16*-Gen durch homozygote Deletionen oder Mutationen inaktiviert ist. Es konnte gezeigt werden, dass 91 von 128 Melanoma-Zelllinien genetische Veränderungen im *p16*-Gen hatten (Gruis *et al.*, 1995). Immunhistochemische Untersuchungen in melanocytären Tumoren ergaben weitere Hinweise, dass p16 eine wichtige Rolle in der Progression dieser Tumore haben könnte. Wang *et al.* (1996) fanden in 61% der benignen Nävi, jedoch nur in 16% der malignen Melanome eine Expression von p16.

Unklar bleibt jedoch, warum *CDKN2A*-Keimbahnmutationen eine vermehrte Melanomsuszeptibilität zur Folge haben, während das funktionell eng gekoppelte keimbahnmutierte *RBI*-Gen ein gänzlich anderes Tumorspektrum induziert.

Das *TP-53*-Gen kodiert für ein nukleäres Protein (p53), das wichtige Funktionen in der Regulation des Zellzyklus, Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms und der Tumorprogression übernimmt. Während für eine Vielzahl von Tumoren die gestörte Funktion von p53 belegt ist, wird die Bedeutung von p53 für das maligne Melanom kontrovers diskutiert (Strech *et al.*, 1991; Weiss *et al.*, 1995).

Die *ras*-(Onko-)Genfamilie im engeren Sinne setzt sich aus den sehr nahe verwandten *Ha-ras*, *Ki-ras* und *N-ras* Genen zusammen. Diese Genprodukte haben eine zentrale Position bei der Signaltransduktion von der Zellmembran in den Zellkern und können so die Proliferation, die Differenzierung und den Zellmetabolismus kontrollieren. Untersuchungen durch Albino *et al.* (1989) konnten zeigen, dass mutante und dadurch aktivierte *ras*-Gene nur selten in Nävi exprimiert werden. Sie werden erst sehr spät in der Melanomprogression exprimiert. Ras-Aktivierungen werden vor allem in Melanomen beobachtet, die in lichtexponierten Körperregionen entstanden sind. Hierbei betreffen die auslösenden Mutationen pyrimidinreiche Abschnitte des Gens. Die Bildung von Pyrimidindimeren ist ein typischer, durch UV-Strahlung induzierter Lichtschaden.

Das Neurofibromatose-1-(*NF1*-)Gen kodiert für Neurofibromin, ein GTPase aktivierendes Protein, das die Aktivität von *ras*-p21-Proteinen regulieren kann. Es ist an der Kaskade der Signaltransduktion von der Zellmembran zum Zellkern beteiligt und hat somit Einfluß auf die proliferationsstimulierenden Effekte von *ras*-p21-Proteinen. Die Inzidenz von Melanomen ist bei Patienten mit Neurofibromatose, bei denen vermehrt kongentiale Nävi beobachtet werden, höher als bei anderen Patienten. Diese Befunde weisen darauf hin, dass NF-1 eine Rolle in der Melanompathogenese spielen könnte (Andersen *et al.*, 1993).

In verschiedenen Tumortypen wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression der Nukleotid-Diphosphat-Kinase (NM₂₃) und dem Metastasierungspotential gefunden. NM₂₃ wurde deshalb auch als Antimetastasierungsprotein bezeichnet. In Melanoma-Zelllinien ist ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression von NM₂₃ und deren Metastasierungsfähigkeit nachgewiesen worden (Caligo *et al.*, 1994).

1.10. Methoden zur Suche nach differentiell exprimierten Genen

Das humane Genom beinhaltet ca. 50 000 bis 100 000 verschiedene Gene, deren Expression restriktiven Regulations- und Kontrollmechanismen unterliegen. Nur ein kleiner Teil, ca. 10-15% aller Gene wird in einer individuellen Zelle exprimiert (Alberts *et al.*, 1989). Die Wahl der Gene welche exprimiert werden, bestimmen alle Lebensprozesse wie Entwicklung, Differenzierung, Homeostase, Zellzyklusregulation, Alterung und Zelltod. Der Ablauf physiologischer, aber auch pathologischer Prozesse, wie sie bei Krebs vorkommen, geht mit einer Veränderung der Genexpression einher. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene stehen prinzipiell mehrere Möglichkeiten zur Verfügung.

1. Konventionelle subtraktive Hybridisierung:

Dabei werden die cDNAs zweier zu vergleichender Zellpopulationen miteinander hybridisiert. cDNAs, die in beiden Populationen vorkommen, werden abgetrennt und differentielle cDNAs werden angereichert.

2. Representational Difference Analysis (RDA):

Die RDA (Lisitsyn *et al.*, 1993) besteht aus einer Kombination von subtraktiver Hybridisierung mit einer nachfolgenden selektiven PCR-Amplifikation.

3. Suppression-PCR:

Das RDA Verfahren wurde nochmals durch Diatschenko *et al.* (1996) unter Verwendung langer Oligonukleotide, die an die cDNA der Zellpopulationen ligiert werden, verbessert. Diese Nukleotide hybridisieren mit sich selbst und blockieren so die PCR. Damit läßt sich die Amplifikation von unerwünschten Produkten im RDA-Verfahren unterdrücken.

Die oben beschriebenen Methoden beinhalten jedoch einige Nachteile. Im Vergleich zum Differential Display wird relativ viel RNA benötigt. Die Methoden sind komplexer und es ist nur ein einseitiger Vergleich möglich, d.h. die Betrachtung des Expressionsmusters bezieht sich nur auf eine der untersuchten Zelllinien.

4. mRNA Differential Display Technologie (Peng Liang und Arthur Pardee, 1992):

Das mRNA DD dient der Identifizierung und Klonierung differentiell exprimierter Gene. Das Differential Display ist eine sehr sensitive Methode, bei der auch sehr kleine Expressionsunterschiede dargestellt werden können. Es können hierbei zwei oder mehr Proben parallel miteinander verglichen werden. Prinzipiell basiert die Methode auf einer reversen Transkription der mRNA mit drei verschiedenen oligo dT-Primern. Dadurch wird die Gesamt-Population der mRNAs in drei verschiedene Subpopulationen aufgeteilt. Die drei

Subpopulationen werden dann in einer PCR-Reaktion mit dem entsprechenden oligo dT-Primer und einem statistischen 13mer Primer amplifiziert und radioaktiv markiert. Die cDNA-Fragmente werden in einer anschließenden Gelelektrophorese aufgetrennt. Differentielle Banden, die potentiell unterschiedlich exprimierten cDNAs entsprechen, lassen sich dann relativ schnell und einfach aus dem Gel isolieren, amplifizieren und klonieren (s. Abbildung 3). Die isolierten cDNAs können dann weiter charakterisiert werden. Mit dieser Methode lassen sich nach theoretischen Berechnungen durch den Einsatz von 80 Zufallsprimern in Kombination mit den drei oligo dT-Primern 96% aller mRNAs einer Zelle darstellen.

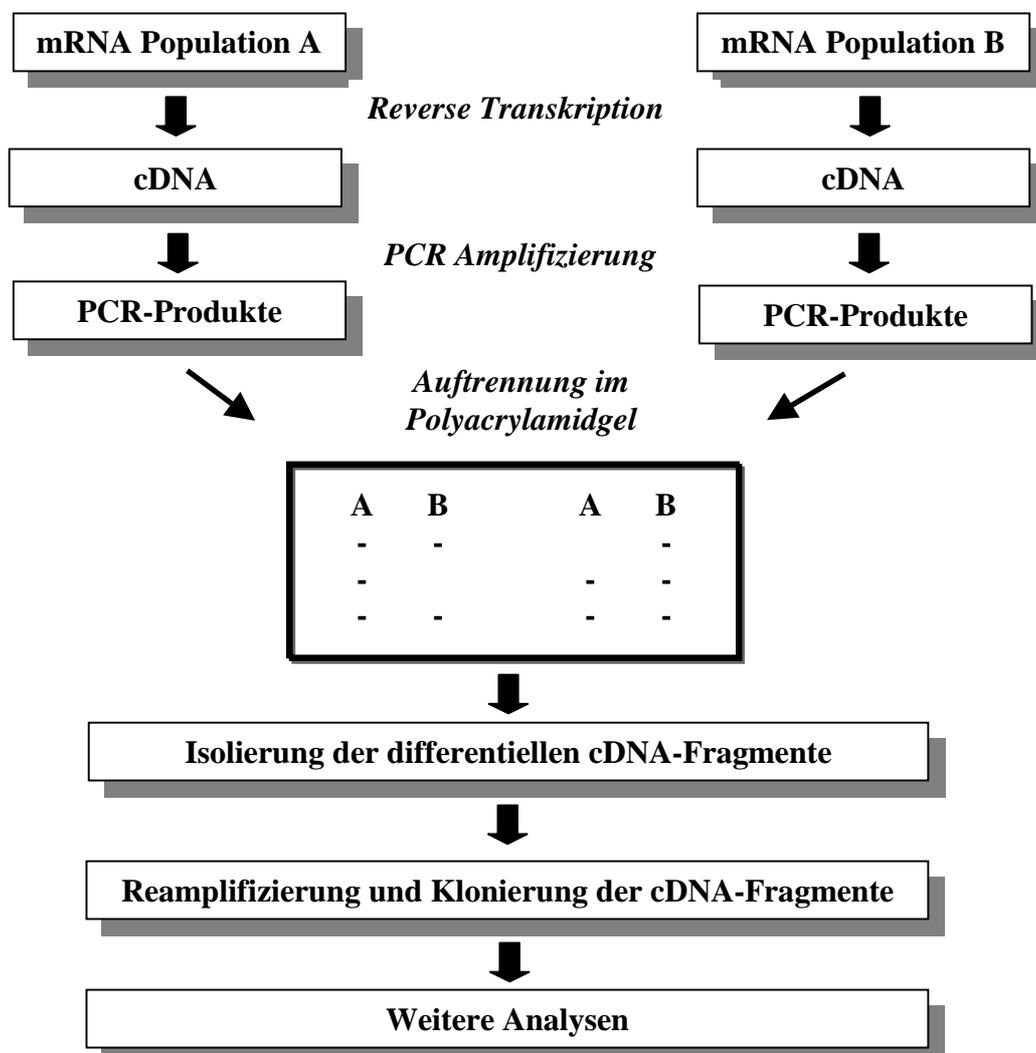


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Methode des Differential Displays.

1.11. Zielsetzung der Arbeit

Die Progression des malignen Melanoms beruht auf einer Akkumulation mehrerer unabhängiger Mutationen. Die Akkumulation von Mutationen erfolgt schrittweise, wobei jede Mutation bei jedem Schritt der Zelle einen zusätzlichen selektiven Vorteil verschafft (Vogelstein und Kinzler, 1993). Den verschiedenen Stadien der Tumorprogression liegen vielfältige genetische Veränderungen zugrunde, welche sich im Expressionsprofil der verschiedenen Stadien widerspiegeln.

Am oben beschriebenen Expressionsprofil wird deutlich, dass zwar schon viele Gene beschrieben wurden, die an der Tumorprogression beteiligt sind, jedoch ist die Tumorprogression und Metastasierung ein sehr komplexer und heterogener Vorgang. An den zum Großteil noch unverstandenen Prozessen sind vermutlich viele verschiedene Mechanismen bzw. Gene und Genprodukte beteiligt. Einige der beschriebenen Gene gelten zwar als recht aussichtsreiche Kandidaten, bei Anderen gelten die kausalen Zusammenhänge als eher unsicher. Es ist daher zu erwarten, dass noch weitere, differentiell exprimierte Gene bei den verschiedenen Mechanismen der Metastasierung eine Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen mit Hilfe der Methode des Differential Display in einem Melanoma-Modellsystem, bestehend aus einer nicht-metastasierenden Zelllinie (530) und einer stark-metastasierenden Zelllinie (NMCL-1), differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. In diesem gut definierten und charakterisierten System soll ein klares Expressionsprofil dargestellt werden. Die Identifizierung bekannter und bisher unbekannter differentiell exprimierter Gene könnte das Verständnis über die molekularen Ursachen der Metastasierung erleichtern. Sie könnten außerdem in der Prognose und Diagnostik von verschiedenen Melanomen, sowie als molekulare Targets in der Therapie von Nutzen sein.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und biochemische Reagenzien

Alle unten nicht extra aufgeführten Lösungsmittel und Chemikalien wurden von der Firma Roche (Molecular Biochemicals) bzw. von der Boehringer Mannheim GmbH, von Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Soweit nicht anders vermerkt, stammten alle Enzyme, Reaktionspuffer, Nukleotide, Längenstandards und sonstige molekularbiologische Reagenzien von Roche (Molecular Biochemicals) oder GibcoBRL (Eggenstein).

Enzyme und Chemikalien	Bezugsquelle
Agarose MP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Pharmacia Biotech, Freiburg
AmpliTaq Polymerase	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA
BSA	Boehringer Mannheim, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
EDTA (Titriplex III)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Expresshyb Solution	Clontech, Palo Alto, USA
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Freiburg
Long Ranger Gellösung	AT Biochem Malvern, PA
Nu Sieve 3:1 Agarose Gel	FMC, Rockland, ME, USA
Phenol	Sigma, Deisenhofen
Radiochemikalien α -[³⁵ S]dATP, α -[³² P]dCTP, γ -[³² P]dATP	Amersham, Braunschweig
Quick Spin Columns Sephadex G50	Boehringer Mannheim, Mannheim
Röntgenfilme Biomax MS	Kodak
Röntgenfilme Cronex 4	Du Pont, München
Trypsin 1:250	Merck, Darmstadt
TEMED	Biorad, München
Velcorin (Dimethydicarbonat)	Bayer AG, Leverkusen

2.1.2. Puffer

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden folgende Standard-Puffer verwendet.

Standard-Puffer	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KC; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
20xSSC	3 M NaCl ; 0,3 M Natriumcitrat·2H ₂ O pH 7,0
10xMOPS	0,2 M MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA pH 7,0
RNA-Probenpuffer	250 µl Formamid, deionisiert, 83 µl Formaldehyd 37%ig , 50 µl 10x MOPS, 0,5 µl Bromphenol-Blau-Lösung (10%ig) <i>ad.</i> 500 ml DEPC-H ₂ O
TAE	0,4 M Tris Base; 0,2 M Eisessig; 0,1 M EDTA pH 8,4
TE	10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA pH 8,0
Tris-HCL	1 M Tris-Base pH 7,5 – pH 8,5
10xTBE	890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH 8,0

2.1.3. Geräte

Geräte	Bezugsquelle
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus Instruments, München
Elektrophoresekammer	GibcoBRL, Eggenstein
Tischzentrifuge, 5417R	Eppendorf, Hamburg
Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Zentrifuge, RC-5B	Sorvall, Bad Homburg
Spektrophotometer Uvikon 931	Kontron Instruments, Mailand, Italien
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl

2.1.4. Bakterienstämme

E. coli INV α : F⁻ *endA1 recA1 hsdR17* (r_k⁻, m_k⁺) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1* ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169

2.1.5. Bakterienmedien

LB (*Luria Broth*) Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Bacto Hefe-Extrakt
0,5% (w/v) NaCl
pH 7,4

Das Medium wurde für 20 Minuten bei 121°C und 2 bar autoklaviert. 100 μ g/ml Ampicillin wurde nach Abkühlen auf etwa 50°C zugegeben.

LB-Agar wurde aus LB Medium plus 15 g/l Agar hergestellt und ebenfalls autoklaviert.

2.1.6. Zellen und Zelllinien

Verwendete Zelllinien und deren Eigenschaften.

Typ	Bezeichnung	Referenz / Eigenschaft
Kolon	COLO-206F	Etabliert aus Ascites DSMZ No: ACC 21; Semple TU <i>et al.</i> , 1978
	LOVO	Etabliert aus einer Metastase Drewinko B und Yand LY 1976
	SW-948	Etabliert aus einem Primärtumor ATCC (CCL 237), Rockville, Maryland; Leibovitz A <i>et al.</i> , 1976
Ovar	EFO-21	Etabliert aus Ascites Kunzmann R und Holzel F, 1987
	EFO-27	Etabliert aus einer Metastase Kunzmann R und Holzel F, 1987
	COLO-704	Etabliert aus Ascites Semple TU <i>et al.</i> , 1978
Prostata	BM-1604	Etabliert aus einer Metastase van-Helden PD <i>et al.</i> , 1994
	BPH-1	Etabliert aus einer benignen Hyperplasie Hayward SW <i>et al.</i> , 1995
	LNCAP	Etabliert aus einer Metastase Horoszewicz JS <i>et al.</i> , 1983

Typ	Bezeichnung	Referenz / Eigenschaft	
Zervix	BT-B	Subklon von HELA Wang MH, 1991	
	KB-V1	KB-V1 ist ein "multidrug-resistent (mdr)" Subklon von KB-3-1. KB-3-1 selbst ist ein Subklon von HeLa; Akiyama S <i>et al.</i> , 1985	
	SISO	Etabliert aus einem chirurgisch entnommenen, Chemotherapie-Resistenten Zervix-Adenokarzinom; Kaku T <i>et al.</i> , 1999	
Pankreas	Capan-1	Etabliert aus einer Metastase; Fogh J <i>et al.</i> , 1977	
	HUP-T3	Etabliert aus einer malignen Ascites-Flüssigkeit Nishimura N <i>et al.</i> , 1993	
	PA-TU-8902	Etabliert aus einem primären Adenokarzinom Elsasser HP <i>et al.</i> , 1993	
	K2	Etabliert aus einem Primärtumor	Die Zelllinien wurden in einem orthotopen Maus Modell etabliert. Dr. F. Alves, Klinikum Göttingen, Abt. Hämatologie und Onkologie
	K7	Etabliert aus einer Mesenterial-Metastase	
K13	Etabliert aus einer Metastase an der Porta Hepatis		
K16	Etabliert aus einer Lungen Metastase		
Melanoma	HEMn	Humane epidermale Melanozyten Cascade Biologics Inc.	
	530	Nicht metastasierend ; Westphal JR <i>et al.</i> , 1997	
	IF6	Schwach metastasierend; Westphal JR <i>et al.</i> , 1997	
	MV1	Mittelstark metastasierend; Westphal JR <i>et al.</i> , 1997	
	M14	Mittelstark metastasierend; Westphal JR <i>et al.</i> , 1997	
	MEL57	Mittelstark metastasierend; Westphal JR <i>et al.</i> , 1997	
	NMCL-1	Stark metastasierend; Westphal JR <i>et al.</i> , 1997	
	IF6m	Stark metastasierend; Westphal JR <i>et al.</i> , 1997	
	MV3	Stark metastasierend; Westphal JR <i>et al.</i> , 1997	
	BLM	Stark metastasierend; Westphal JR <i>et al.</i> , 1997	

Typ	Bezeichnung	Referenz / Eigenschaft
Brust	HMEC	"Human mammary epithelial cells" (Bio Wittaker, Heidelberg)
	AR	Etabliert aus einem invasiv, medullären Primärtumor, im Onkologischen Labor der Frauenklinik Heidelberg (Dr. S Kaul)
	WA	Etabliert aus einem invasiv ductalen Primärtumor, im Onkologischen Labor der Frauenklinik Heidelberg. (Dr. S Kaul)
	1590	Etabliert aus einer Knochenmarkmikrometastase eines IDC, im Onkologischen Labor der Frauenklinik Heidelberg (Dr. S Kaul)
	HG15	Etabliert von einer Knochenmarkmikrometastase eines IDC, im Onkologischen Labor der Frauenklinik Heidelberg (Dr. S Kaul)
	KM22	Etabliert von einer Knochenmarkmikrometastase eines IDC, im Onkologischen Labor der Frauenklinik Heidelberg (Dr. S Kaul)
	KS	Etabliert aus einem malignen Ascites eines IDC, Onkologisches Labor der Frauenklinik Heidelberg von Dr. S Kaul
	MCF7	metastasierend, Soule HD <i>et al.</i> , 1973
	MCF7 ADR	Nicht- metastasierend; Fairchild CR <i>et al.</i> , 1987
	LCC1	Subklon von MCF-7. Lokal invasiv und metastasierend: Leonessa F <i>et al.</i> , 1992
	LCC2	Etabliert von LCC1 durch Exposition mit 4OH Tamoxifen Lokal invasiv und metastasierend; Wakeling AE <i>et al.</i> , 1993
	LCC3	Subklon von ZR-75; Kristensen CA <i>et al.</i> , 1995
	MDA-MB231	Invasiv; Thompson EW <i>et al.</i> , 1992
	MDA-MB468	Nicht-invasiv; Thompson EW <i>et al.</i> , 1992
	MDA-MB435	Invasiv; Thompson EW <i>et al.</i> , 1992
	ZR-75	Nicht-invasiv; Thompson EW <i>et al.</i> , 1992
	T47 D	Nicht-invasiv; Thompson EW <i>et al.</i> , 1992
	4A4	Metastasierende Sublinie von MDA-MB435; Thompson EW <i>et al.</i> , 1992
	2C5	Nicht-metastasierende Sublinie von MDA-MB435; Thompson EW <i>et al.</i> , 1992

2.1.7. Tumorbiopsien

Die Tumorbiopsien wurden vom Pathologischen Institut in Nijmegen (Holland) zur Verfügung gestellt.

Sample Nr.	Patienten Nr.	Diagnose	Typ	Lokalisation	Meta-stasen	Breslow Dicke	Clark level	M* / F*	Alter
1	T96-03684	Melanoma	SSM	Abdomen	keine	7 mm	III	M	57
2	T96-03684	Normal							
3	T95-12824	Melanoma	NM	Rechter Oberschenkel	keine	4,2 mm	III	F	61
4	T95-12824	Normal							
11	T92-10906	Melanoma	NM	Rechter Oberarm	keine	4,2 mm	IV	M	36
12	T92-10906	Normal							
41	T98-31635	Melanoma	SSM	Rechtes Ohr	?	6 mm	V	M	
42	T98-31635	Normal							
43	T98-35491	Melanoma	SSM	Thorax links	?	2,28 mm	IV	M	
44	T98-35491	Normal							
51	T97-3272	Metastase		Lymphknoten	ja			F	48
52	T97-3272	Normal							
63	T98-4436	Metastase		Mammae links	ja			F	63
64	T98-4436	Normal							
65	T97-11277	Metastase		Lymphknoten	ja			M	65
66	T97-11277	Normal							
69	T98-9960	Metastase		Lymphknoten	ja			M	52
70	T98-9960	Normal							
77	T98-6041	Metastase		Lymphknoten	ja			F	31
78	T98-6041	Normal							
79	T98-6165	Metastase		Lymphknoten	ja			F	56
80	T98-6165	Normal							
99	T97-29284	Melanoma			?				?
100	T97-29284	Normal							

Sample Nr.	Patienten Nr.	Diagnose	Typ	Lokalisation	Meta- stasen	Breslow Dicke	Clark level	M* / F*	Alter
101	T98-2837	Melanoma			?				?
102	T98-2837	Normal							
109	T98-27248	Melanoma	SSM	Linker Unterschenkel	?	1,5 mm	IV	M	?
110	T98-27248	Normal							
115	T98-30400	Melanoma	SSM	Rücken	?	5,5 mm	IV	M	?
116	T98-30400	Normal							
129	T98-31002	Melanoma	SSM	Rücken	?	0,37 mm	III	M	?
130	T98-31002	Normal							
131	T98-30090	Melanoma	SSM	Linker Unterschenkel	?	0,5 mm	II-III	M	?
132	T98-30090	Normal							
163	T97-1147	Melanoma	NM	Rechtes Ohr	keine	1 mm	III	F	77
164	T97-1147	Normal							
167	T97-10215	Melanoma	NM	Rücken	keine	4,3 mm	III	M	52
168	T97-10215	Normal							
171	T92-6918	Melanoma	NM	Nacken	Lymph knoten	1,6 mm	III-V	M	28
172	T92-6918	Normal							
193	T98-19681	Melanoma	NM	Oberschenkel	?	2,1 mm	IV	F	?
194	T98-19681	Normal							
281	T99-5144	Metastase		Lymphknoten	ja			F	59
282	T99-5144	Normal							
287	T98-4507	Metastase		Lymphknoten	ja			F	42
288	T98-4507	Normal							
293	T98-12454	Melanoma	malign. blauer Nevus	Rechter Oberarm	Lymph knoten Leber	5,7 mm	V	M	29
294	T98-12454	Normal							

* M = Männlich

* F = Weiblich

2.1.8. Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

Kulturmedium: 88 ml DMEM (Dulbecco`s modification of Eagles Medium)
 10 ml FKS (BioWhittaker)
 2 ml Pen/Strep (BioWhittaker)
 DMEM mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin (BioWhittaker)

Trypsin-Lösung: in 100 ml PBS-Lösung, pH 7,4 gelöst
 125 mg Trypsin
 100 mg EDTA
 100 mg Glucose

2.1.9. Medien für das Screening einer Phagenbank

10 x Lamda dilution buffer	58,3 g 1,0 M NaCl 24,6 g 0,1 M MgSO ₄ •7H ₂ O 350 ml 1,0 M Tris-HCL (pH 7,5)
LB broth (pH 7,0)	10 g/l Bacto-tryptone 5 g/l Bacto-yeast extract 5 g/l NaCl
LB Agar Platten	LB broth + 15 g/l Agar
LB Agar Platten + 10 mM MgSO ₄	LB broth + 15 g/l Agar + 2,4 g/l MgSO ₄
LB broth + 10 mM MgSO ₄	LB broth + MgSO ₄ (Endkonzentration 10 mM)
LB broth + 10 mM MgSO ₄ + 0,2% Maltose	LB broth + MgSO ₄ (Endkonzentration 10 mM) nach dem Autoklavieren Zugabe von 0,2% Maltose
Top Agarose + 10 mM MgSO ₄	LB broth + 2,4 g/l MgSO ₄ + 7,2 g/l Agarose
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCL 0,5 M Tris-HCL (pH 8,0)
Denaturierungslösung	1,5 M NaCL 0,5 N NaOH

2.2. Methoden

Alle grundlegenden molekularbiologischen Methoden wurden entweder wie in Sambrook *et al.* (1989) oder unter Verwendung der genannten Komplettsysteme durchgeführt.

2.2.1. Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde die RNeasy Methode von Qiagen angewendet. Diese Methode kombiniert die selektiven Bindungseigenschaften einer Silica-Membran mit Zentrifugationsschritten.

Unter stark denaturierenden Bedingungen wurden die Zellen zuerst mit einem Guanidinium Isothiocyanat und β -Mercaptoethanol -haltigen Puffer lysiert und mit einem konventionellen Stabrotor homogenisiert. Das Lysat wurde anschließend auf die Membran gebracht.

Die RNA (> 200 Nukleotidide) wird in Gegenwart eines Puffersystems mit einer hohen Konzentration an chaotropen Salzen an die Silica-Gel Membran gebunden. Nach mehreren Waschschrinen wurde die RNA mit 500 μ l nukleasefreiem, bidestilliertem Wasser eluiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch (OD bei 260 nm) bestimmt, ebenso deren Reinheitsgrad aus dem Quotienten $A_{260/280}$.

2.2.1.2. Isolierung von Poly-(A⁺) mRNA

Die Isolierung von Poly-(A⁺) mRNA aus Gesamt-RNA (2.2.1.1.) wurde mit der Oligotex mRNA Methode von Qiagen durchgeführt.

Die Oligotex Methode macht sich die Tatsache zunutze, dass die meisten eukaryotischen RNAs am 3'-Ende ein Homopolymer von 20-250 Adenosin Nukleotiden den sogenannten Poly-(A)-Schwanz besitzen. Im Gegensatz dazu sind tRNAs und rRNAs nicht polyadenyliert. Die Abtrennung erfolgt durch eine Bindung des Poly-(A)-Schwanzes an einen oligo dT-Primer, der an eine Festphasen-Matrix (Polystyrene-Latex-Partikel) gebunden ist. Diese spezifische Hybridisierung geschieht unter hohen Konzentrationen von chaotropen Salzen. In mehreren Waschschrinen wird die Poly-(A⁺) mRNA gereinigt und anschließend in einem Puffer mit geringer Salzkonzentration eluiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch (OD bei 260 nm) bestimmt, ebenso deren Reinheitsgrad aus dem Quotienten $A_{260/280}$.

2.2.1.3. Isolierung von genomischer DNA

Für die Mikrosatelliten Analyse wurde "High molecular weight DNA" aus 17 Primärtumoren und 8 Melanoma Metastasen isoliert. Die DNA wurde von micro-dissektierten Paraffin Schnitten isoliert, sowie jeweils von Normalgewebe des selben Patienten. Für diese Analyse wurde auch genomische DNA von 48 Zelllinien isoliert.

Für diese Isolierungen wurde der QIAamp DNA (Qiagen) Mini Kit verwendet. Die Methode besteht aus vier Schritten: Im ersten Schritt werden die Zellen mit der Protease K lysiert. Im Zweiten wird die DNA unter geeigneten Pufferbedingungen an eine Silica-Gel Membran gebunden. Proteine und andere Verunreinigungen werden anschließend in mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten von der gebundenen DNA gewaschen. Im vierten Schritt wird die genomische DNA mit 200 µl Wasser eluiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch (OD bei 260 nm) bestimmt, ebenso deren Reinheitsgrad aus dem Quotienten $A_{260/280}$.

2.2.1.4. Isolierung von Plasmid DNA

Alle Plasmidisolierungen wurden mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit durchgeführt. Das Protokoll basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse, gefolgt von einer Bindung der Plasmid-DNA (unter geeigneten Salz- und pH- Bedingungen), an einen Anionenaustauscher Harz. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden anschließend gewaschen. Anschließend wird die Plasmid-DNA eluiert und in einer Fällung mit Isopropanol entsalzt und konzentriert. Die Plasmid DNA wurde dann, je nach erwarteter Ausbeute in 50 - 500 µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.5. Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Für präparative Gelelektrophoresen zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden "Low-Melt Agarose" Gele (Boehringer-Mannheim) verwendet. Je nach Fragmentgröße wurde die Agarose in einer Endkonzentration von 0,8 bis 2% (w/v) in der Mikrowelle aufgeköcht und in 1x TAE gelöst. Die Proben wurden nach Zugabe eines Auftragspuffers (ca. 1/3 ihres Volumens) in die Geltaschen eingebracht und im elektrischen Feld (5 V/cm) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wird Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml in das Agarose-Gel einpolymerisiert.

Die zu isolierenden Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

In diesem System wird das Agarosestückchen mit der DNA aufgeschmolzen (50°C für 10 min) und die Lösung anschließend auf eine Silica-Membran gebracht. Unter hohen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert von 7,5 bindet die DNA an diese Membran. In mehreren Waschschrritten werden Verunreinigungen (Agarose, Ethidiumbromid, DMSO) gewaschen. Anschließend wird die DNA mit 100-200 µl Puffer (10mM Tris-CL, pH 8,5) eluiert.

2.2.2. Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Photometrische Bestimmung

Die exakte Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ist für die Durchführung der meisten molekularbiologischen Analysen unabdingbar. Die Konzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer (Uvikon 931) bestimmt. Nach Abgleichen der Nullwerte konnte das Absorptionsmaximum der untersuchten Nukleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 230 nm) festgelegt werden. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$C \text{ [mg/ml]} = (E_{260} - E_{320}) \times f \times c$$

C = Konzentration der gemessenen Probe

E = Extinktion

f = Verdünnungsfaktor

c = Konzentration standard /Extinktion standard

für doppelsträngige DNA: $c = 0.05 \text{ mg/ml}$

für einzelsträngige DNA: $c = 0.025 \text{ mg/ml}$

für RNA: $c = 0.04 \text{ mg/ml}$

E_{230} = Absorptionsmaximum von Salzen

E_{260} = Absorptionsmaximum von DNA/RNA

E_{280} = Absorptionsmaximum vieler Proteine

E_{320} = Nullwert

Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte 2.0 ± 0.2 betragen.

2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung im Gel

Bei sehr kleinen Mengen an DNA wurde die Konzentration im Agarose-Gel semi-quantitativ abgeschätzt. Als Referenz wurde ein Mengenstandard (Low DNA Mass Ladder, Gibco BRL), mit genau definierten Mengen an DNA in den einzelnen Banden, verwendet.

2.2.3. mRNA Differential Display

Die mRNA Differential Display Technologie, von Peng Liang und Arthur Pardee (1992) entwickelt, dient zur Identifizierung und Klonierung differentiell exprimierter Gene. Es können hierbei zwei oder mehr Proben parallel miteinander verglichen werden.

Die Methode des Differential Display wurde mit Hilfe der RNAimageTm - Kits (GeneHunter Corporation, Nashville, TN) durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial wurde dazu Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Proben verwendet. Ein kritischer Schritt dabei ist die Isolierung, bzw. die Reinheit der RNA. Um die Gesamt-RNA absolut frei von DNA zu machen, wurde vor das eigentliche mRNA Differential Display ein DNase-Verdau geschaltet. Die DD-Methode besteht aus einer reversen Transkription der mRNA mit 3 verschiedenen oligo dT- Primern, einer PCR-Amplifizierung und einer anschließenden Gelelektrophorese.

2.2.3.1. DNase-Verdau

Der DNase-Verdau wurde mit dem MessageClean Kit (GenHunter Corporation) durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz wurde gemacht:

1. DNase-Verdau:

Gesamt-RNA in DEPC-H ₂ O	50 µl (10-50 µg)
10x Reaktions Puffer	5,7 µl
DNase I (10 unit/µl)	1 µl

Der Mix wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

2. Phenol/CHCl₃ Extraktion:

Zugabe von 40 µl Phenol/CHCl₃. Vortexen des Mixes für 30 Sekunden und 10 Minuten auf Eis. Anschließend wird bei 4°C mit 13000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und die obere Phase abgenommen.

3. Fällung der RNA:

Zu der (oberen) abgenommenen Phase werden 5 µl 3M NaOAc und 200 µl EtOH zugegeben und die Lösung für mindestens 1 Stunde in -80°C gestellt. Anschließend wird bei 4°C mit 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen. Um den Alkohol zu entfernen wird nochmals für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das RNA Pellet in 20 µl DEPC-H₂O gelöst.

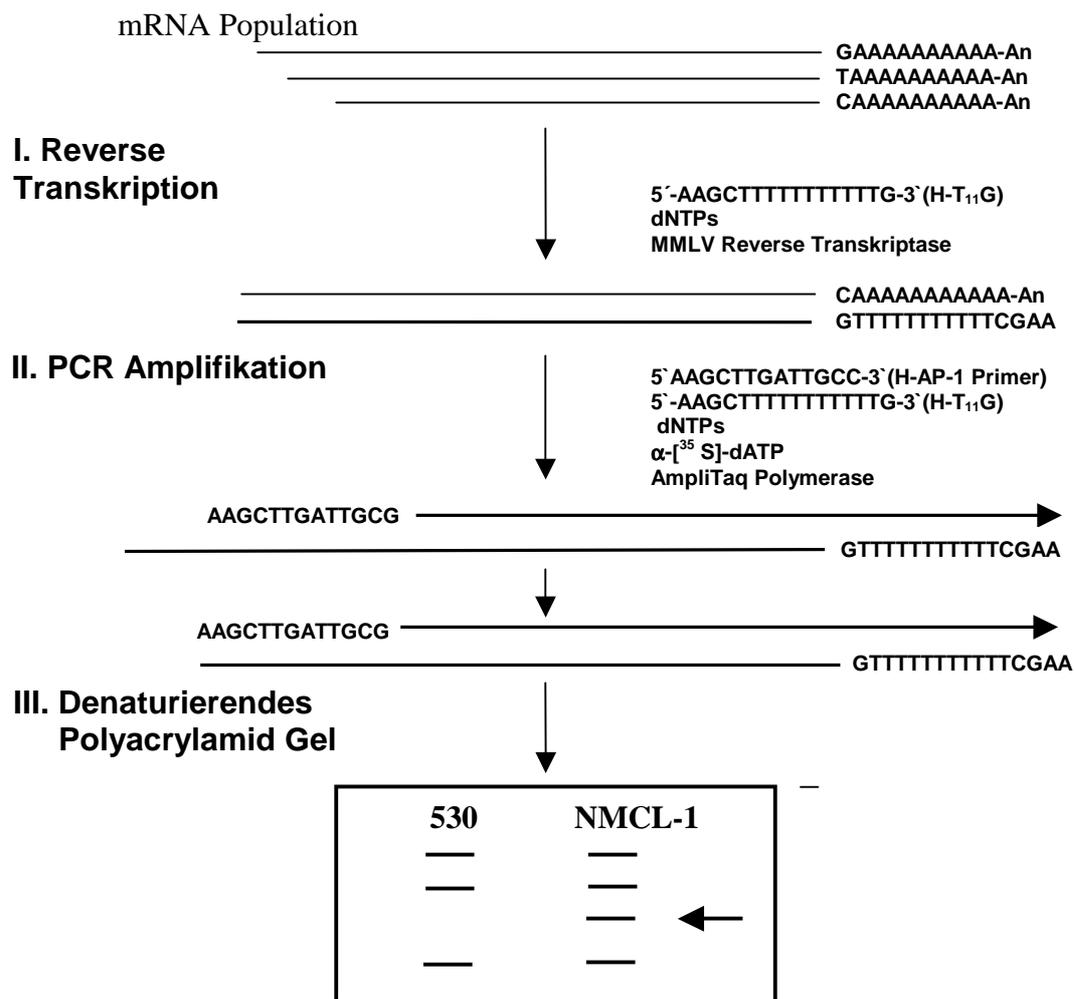


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Methode des Differential Displays. Mit Hilfe von drei verschiedenen oligo-dT-Primern die an den Poly-(A)-Schwanz der mRNA binden, wird die mRNA revers transkribiert. In einer anschließenden Polymerasekettenreaktion mit dem selben oligo-dT-Primer der schon in der reversen Transkription verwendet wurde und einem 13-mer Zufallsprimer werden die cDNA-Fragmente amplifiziert und ³⁵S markiert. Die cDNA-Fragmente werden anschließend in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Differenziell auftretende Banden, die mRNA-Fragmenten entsprechen, werden isoliert und amplifiziert. Die cDNA-Fragmente werden dann nochmals auf ihre differentielle Expression überprüft.

2.2.3.2. Reverse Transkription

Die reverse Transkription der mRNA wurde nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Jede Reaktion wurde jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

Folgende Komponenten und Konzentrationen wurden dabei verwendet:

Komponenten	μl	Endkonzentration
dH ₂ O	9,4	
5x RT-Puffer (125 mM Tris-Cl, pH 8,3; 188 mM KCl; 7,5 mM MgCl ₂ ; 25 mM DTT)	4,0	1x RT-Puffer
dNTP (250 μM)	1,6	25 μM
Gesamt-RNA (DNA-frei)	2,0	0,2 μg pro Zelllinie
H-T ₁₁ M (2 μM); M = G , C oder A	2,0	1,0 μM
MMLV Reverse Transkriptase (200 U/ μl)	1,0	100 U
Total	20	

Für die reverse Transkription wurden je 0,2 μg Gesamt-RNA der Zelllinien 530 und NMCI-1 als Matrize für die cDNA-Erststrangsynthese eingesetzt. Für die Synthese wurde je ein "one-base-anchored Primer" (H-T₁₁G, H-T₁₁C, H-T₁₁A) verwendet. Dadurch wird die Gesamtpopulation der poly-(A⁺) mRNA in drei Subpopulationen unterteilt.

Der Ansatz wurde zur Denaturierung für 5 min auf 65°C erhitzt. Nach 10 min bei 37°C wurde die MMLV Reverse Transkriptase (100 U) zugegeben und der Reaktionsansatz für weitere 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der MMLV Reversen Transkriptase wurde der Ansatz anschließend für 5 Minuten auf 75°C erhitzt ohne dabei das mRNA/cDNA Hybrid zu denaturieren.

Um genomische DNA oder sonstige DNA-Kontamination aufzudecken, wurde je ein Kontrollansatz ohne Zugabe von MMLV Reverse Transkriptase gemacht.

2.2.3.3. Amplifizierung und Markierung der cDNA Fragmente

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurden die drei durch die reverse Transkription entstandenen Subpopulationen weiter amplifiziert und radioaktiv markiert (Saiki *et al.*, 1988).

Für die PCR-Reaktion wurden als 5'-Primer arbiträre Primer (AP1 - AP32) aus den RNAimage Kits 1-4 von GenHunter verwendet. Der 3'-Primer muss derselbe sein, wie er schon in der reversen Transkription verwendet wurde.

Der 20 µl Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Komponenten	µl	Endkonzentration
dH ₂ O	9,2	
10x PCR-Puffer (100 mM Tris-Cl, pH 8,4; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; 0,01 % Gelatine)	2,0	1x PCR-Puffer
dNTP (25 µM)	1,6	2,0 µM
H-AP Primer (5'Primer) (2 µM)	2,0	0,2 µM
H-T ₁₁ M (3'Primer) (2 µM)	2,0	0,2 µM
RT-Mix von vorhergehender Reaktion	2,0	0,1 Volumen der RT-Reaktion
α-[³⁵ S]dATP (1200 Ci/mmol)	1,0	10 µCi α-[³⁵ S]dATP
AmpliTaq (DNA-Polymerase)	0,2	1 U Taq-Polymerase (Perkin Elmer)

Die PCR-Reaktionsbedingungen waren dabei 40 Zyklen mit 30 sec 94°C Denaturierung, 2 min 40°C Primer Annealing und 30 sec 72°C Primer Elongation und einem 5-minütigen 72°C Schritt am Ende der Reaktion.

2.2.3.4. cDNA Auftrennung mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Anschließend an die PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Zusammensetzung des 5%igen denaturierenden Polyacrylamidgel:

Harnstoff	42g
10x TBE	12 ml
Long Ranger TM Gellösung (50%)	10 ml
TEMED	0,05 ml
10 % APS	0,5 ml
Bidest H ₂ O	ad 100 ml

3,5 µl der PCR-Ansätze wurden mit 2 µl Ladepuffer (95% Formamid, 10 mM EDTA, pH8,0, 0,09% Xylenecyanol, 0,09% Bromphenolblau) vermischt und für zwei Minuten bei 80°C

inkubiert. Anschließend wurden die denaturierten Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstant 60 Watt für 3,5 Stunden in 0,6x TBE als Laufpuffer durchgeführt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein [³²P] endmarkierter (s. 2.2.3.5.) Standard (Standard VI, Boehringer Mannheim) mit auf das Gel aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel auf ein Filterpapier (Whatman, Maidstone) transferiert und anschließend für 1 Stunde bei 80°C im Vakuumtrockner getrocknet. Ein Röntgenfilm (X-OMAT/AR, Kodak, Rochester, NY) wurde dann auf das Gel gelegt und für 24 bis 72 Stunden exponiert.

2.2.3.5. 5'-Endmarkierung des Standard VI (Boehringer Mannheim) mit [³²P]

Der Standard VI (Boehringer Mannheim) wurde zur Größenbestimmung der im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Fragmente verwendet. Um den Standard auf einem Röntgenfilm sichtbar zu machen, musste er mit einem Radioisotop markiert werden.

Hierzu wurde der Standard nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) durch direkte Phosphorylierung des freien 5'-OH Endes mit T4-Polynukleotid-Kinase in Gegenwart von γ -[³²P]ATP markiert. Es wird ein direkter Austausch der vorhandenen 5'-terminalen Phosphatgruppen vorgenommen. Diese Methode bedient sich der Gleichgewichtsreaktion der T4-Polynukleotid-Kinase. Eine vorherige Dephosphorylierung ist überflüssig.

Der durch Ethanol-fällung gereinigte Standard VI (25 pmol 5'-Enden = 0,81 µg) wurde in 10 mmol/l Tris-HCL; 0,1 mmol/l EDTA gelöst. Anschließend wurde 2 µl Puffer D (500 mmol/l Imidazol-HCL; 0,1 mmol/l MgCl₂; 1 mmol/l EDTA; 50 nmol/l Dithiothreitol; 1mmol/l Spermidin; 3mmol/l ADP; pH 6,6), 40 pmol γ -[³²P]ATP zugegeben, mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und gut gemischt. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde 1µl T4-Polynukleotid-Kinase gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch rasches Abkühlen auf Eis gestoppt. Die Abtrennung nicht-eingebauter Nukleotide erfolgte mit den Mini Quick Spin Columns (Boehringer Mannheim) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3.6. cDNA-Extraktion und Reamplifizierung

Die im Differential Display reproduzierbar differentiell auftretenden Banden wurden aus dem getrockneten Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden in 100 µl sterilem bidest. H₂O für 15 min gekocht und mit 70%igem EtOH und 5,5 M NH₄Ac in Gegenwart von Glycogen (10 mg/ml) gefällt. Nach dem Waschen der cDNAs mit 85%igem eiskaltem EtOH

wurden diese in 10 μl H_2O aufgenommen. Die isolierten cDNAs wurden anschließend mit den entsprechenden Primerkombinationen reamplifiziert.

Komponenten	μl
d H_2O	20,4
10x PCR Puffer	4,0
dNTP (250 μM)	3,2
AP-Primer (2 μM)	4,0
H-T ₁₁ M (2 μM)	4,0
cDNA Template	4,0
AmpliTaq (Perkin-Elmer)	0,4
Total	40,0

Die PCR-Reaktionsbedingungen waren dabei 40 Zyklen mit 30 sec 94°C Denaturierung, 2 min 40°C Primer Annealing und 30 sec 72°C Primer Elongation und einem 5-minütigen 72°C Schritt am Ende der Reaktion.

Um die Größe zu kontrollieren und die cDNA aufzureinigen, wurde sie im Agarosegel aufgetrennt und daraus mit der unter 2.2.1.5. beschriebenen Methode isoliert.

2.2.3.7. Verwendete Primer

Zur Durchführung des Differential Displays wurden ausschließlich Primer aus dem RNImage-Kit von GenHunter verwendet. Im Folgenden werden nur die Primer aufgeführt, die für nachfolgende Analysen relevant waren.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
H-T ₁₁ G	AAGCTTTTTTTTTTTTG
H-T ₁₁ A	AAGCTTTTTTTTTTTTA
H-T ₁₁ C	AAGCTTTTTTTTTTTTC
AP7	AAGCTTAACGAGG
AP12	AAGCTTGAGTGCT
AP16	AAGCTTTAGAGCG
AP20	AAGCTTGTTGTGC

2.2.4. Methoden zur Isolierung der vollen Länge der cDNA

Aus dem Differential Display Gel können immer nur Sequenzfragmente einer cDNA isoliert werden. Zeigen diese keine Homologien zu bekannten Genen, wird die volle Länge der cDNA mit den nachfolgenden Methoden generiert und isoliert.

2.2.4.1. RACE-PCR

Mit der Methode der RACE- (Rapid Amplification of cDNA Ends) PCR ist es möglich, die noch unbekanntes 5'-Enden (5'-RACE) oder 3'-Enden (3'-RACE) von cDNA-Fragmenten zu identifizieren. Die gesamte Länge der cDNA eines unbekanntes Gens wird so amplifiziert und kann isoliert und kloniert werden (Frohmann, 1994). Da die aus dem Differential Display Gel isolierten Fragmente das 3'-Ende der jeweiligen mRNA repräsentieren, musste zur Identifizierung der vollen Länge eine 5'-RACE durchgeführt werden.

Dazu wurde der 5'-RACE Kit (Version 2.0) von Gibco BRL, Life Technologies verwendet. Die Reaktionen wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Erststrang-Synthese der cDNA wurde aus Gesamt-RNA mit einem genspezifischen Primer GSP1 und der SuperScriptTM II, einem RNase H Derivat der Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) durchgeführt. Anschließend wurde die cDNA getailed um eine Bindestelle für den "Abridged Anchor Primer" zu generieren. Um störende Sequenzen und Nukleotide für das nachfolgende Tailen zu entfernen wurde nach der Erststrang- cDNA Synthese das Produkt von nicht-inkorporierten dNTPs und GSP1 gereinigt. An das 3'-Ende der aufgereinigten cDNA wurde mit Hilfe der TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) ein Homopolymer aus Cytosinen ansynthetisiert.

Die getailte cDNA wurde dann mit einem nested, genspezifischen Primer GSP2, der 3' von GSP1 bindet, und dem Deoxyinosin enthaltenden Anker-Primer AUAP (GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG) amplifiziert.

Das 5'-RACE PCR Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt, kloniert und sequenziert.

2.2.4.2. Isolierung rekombinanter Klone aus einer Phagen-Bibliothek

Das Durchmustern einer cDNA Phagen-Bank wurde nach dem "Lambda Library Protocol Handbook" (Clontech) durchgeführt. Es wurde dabei eine cDNA Bank aus dem Herz im Vektor λ gt10 verwendet.

Zur Isolierung von Phagen-Klonen aus einer Phagen-Bibliothek wurden die folgenden Versuchsschritte durchgeführt:

1. Titerbestimmung der Phagen-Bibliothek
2. Ausplattieren der Phagen-Bibliothek
3. Transfer und Behandlung der Phagen auf Nitrocellulose
4. Hybridisierung der Phagen-DNA mit einer radioaktiven DNA-Probe
5. Anreicherung und Isolierung der positiven, rekombinanten Phagen
6. Long-Distance-Insert-PCR

2.2.4.2.1. Titerbestimmung der Phagen-Bibliothek

Zunächst wurden 10 ml LB-Medium mit 10 ml 10 mM $MgSO_4$ und 0.2% Maltose mit kompetenten Bakterien *E.coli* C600 Hfl über Nacht bei 37°C in einem 50 ml Falconröhrchen inkubiert. Für das Durchmustern einer Phagenbibliothek muss eine genügend große Menge an Phagen ausplattiert werden. Um die entsprechende Menge an Phagenpartikeln einsetzen zu können, wurde der aktuelle Titer der Phagensuspension bestimmt. Mit Hilfe von Phagenpuffer wurde eine Verdünnungsreihe aus einem Aliquot der Phagen-Bibliothek (10^{-2} bis 10^{-6}) hergestellt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Lyse der Bakterien entstanden charakteristische Phagenplaques (pfu = plaque forming units), so dass anhand des Verdünnungsfaktors der Titer der Phagen-Bibliothek errechnet werden konnte.

2.2.4.2.2. Ausplattieren der Phagen-Bibliothek

Die 300 ml Bakterienlösung C600 Hfl wurde mit verdünnter Phagenkonzentration (10000 pfu/Platte) 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde 10 ml 45–50°C warmer LB soft top Agarose + $MgSO_4$ dazugegeben und diese Mischung auf eine Agarplatte (LB Agar + 10 mM $MgSO_4$) ausplattiert. Im Brutschrank wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4.2.3. Transfer und Behandlung der Phagen auf Nitrocellulosefilter

Die Platten wurden aus dem Brutschrank genommen und für 1 h in den Kühlraum gestellt.

Damit sollte verhindert werden, dass bei dem Transfer der Phagen auf die Filter LB soft top Agarose an den Filtern haften bleibt. Pro Platte wurden jeweils 2 Nitrocellulosefilter (Hanahan und Meselson, 1980) benötigt. Der 1. Filter wurde für 2 min bei RT auf die Platte gelegt. Die Position des Filters wurde mit einer Nadel markiert. Der 2. Filter wurde für 3 min aufgelegt und an gleicher Stelle markiert. Die beiden Filter wurden anschließend für ca. 3-5 min mit Denaturierungslösung, 10 min mit Neutralisierungslösung und 10 min mit 2x SSC behandelt (Benton und Davis, 1977). Danach wurden die Filter zum Trocknen auf Blottingpapier gelegt und anschließend im Transiluminator mit UV-Strahlung behandelt um die Phagen-DNA an die Nitrocellulose zu fixieren. Die Hybridisierung der Filter mit der radioaktiv markierten DNA-Probe wurde wie in 2.2.5.2. durchgeführt.

2.2.4.2.4. Anreicherung und Isolierung der positiven, rekombinanten Phagen

Positive Signale auf den Röntgenfilmen wurden dazu genutzt, die entsprechenden Phagenplaques auf den Agarplatten zu identifizieren. In dem Bereich von 0.3-0.5 cm² eines positiven Klons wurde der Agar mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 600 ml Phagenpuffer überführt. Um die restlichen Bakterien abzutöten, wurde 10 ml Chloroform hinzugegeben. Das Gemisch wurde 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert, damit die Phagen in den Phagenpuffer diffundieren konnten. Von dieser Suspension wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Das erste Rescreening sollte mit ca. 1000-2000 pfu/Platte durchgeführt werden. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie unter 2.2.4.2.2. beschrieben. Das Rescreening wurde solange durchgeführt, bis ein Einzelklon sicher isoliert werden konnte.

Der identifizierte positive Phagenklon wurde mit einer Pipettenspitze aus der Platte gepickt und in 200 ml Phagenpuffer aufgenommen. Diese Phagenlösung wurde für die Herstellung des Phagen-Lysats und die Präparation der Phagen-DNA verwendet.

2.2.4.2.5. Anlegen eines Phagenstocks

200 ml LB mit 10 mM MgSO₄ wurden mit 35 µl der Phagenlösung beimpft und bis zur Lyse geschüttelt. Das Lysat wurde wie unter 2.2.4.2.1. bis zur Zugabe von Puffer L1 und anschließender Inkubation gleich behandelt. Anschließend wurde das Phagenpräzipitat pelletiert (10000 x g, 15 min, 4°C) und in 2 ml Phagenpuffer resuspendiert. Der Stock wurde

in 100 μ l Chloroform bei 4°C gelagert. Abschließend wurde eine Titerbestimmung durchgeführt.

2.2.4.2.6. LD-Insert PCR

Bei positiven Klonen wurde die Charakterisierung des Inserts mit dem LD-Insert Screening Amplimer Set von Clontech mittels PCR durchgeführt.

Dazu wurde ein Plaque mit dem hinteren Ende einer Pasteur Pipette gepickt und in 25 μ l deionisiertes H₂O überführt. 5 μ l davon wurden als Template in der anschließenden PCR eingesetzt. Für die PCR wurde der Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

PCR Parameter:

- 94°C für 1 min
- 30 Zyklen: 94°C 30 sec
68°C 3 min
- 68°C für 3 min

Das PCR-Produkt wurde anschließend im Agarose-Gel überprüft.

2.2.4.3 RT-PCR

Um die volle Länge der cDNA des neuen Gens *THW* zu bestätigen, zu isolieren und anschließend zu klonieren, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Mit Hilfe der Sequenzinformation des aus dem Differential Display Gel isolierten 301 bp Fragments konnten überlappende EST-Sequenzen aus der EMBL Datenbank zu einer Consensus-Sequenz zusammengesetzt werden (s. 3.5.2.). Die Größe der Konsensus-Sequenz entsprach dabei der im Northern-Blot ermittelten Größe. Im Überlappungsbereich wurde jeweils eine 100%ige Homologie gefunden. Um nun experimentell zu bestätigen, dass es sich dabei um die reelle Sequenz der THW cDNA handelte, wurde mit der Sequenzinformation vom 5'-Bereich der Consensus-Sequenz und der Sequenzinformation des Differential Display Fragments eine RT-PCR durchgeführt.

Da der 5'-Bereich extrem GC-reich (>75%) ist, was zu Sekundärstrukturen der mRNA und somit zu einer Blockierung der vollständigen Synthese der cDNA führen kann, wurde die Reaktion mit dem C. therm. Polymerase One-Step RT-PCR System (Roche) durchgeführt. Dieses System beinhaltet einen Enzym-Mix, bestehend aus dem Klenow Fragment der DNA Polymerase von *Carboxythermus hydrogenoformans* und der thermostabilen Taq DNA

Polymerase. Dies erlaubt eine Reaktionstemperatur von 60°C bis 70°C, was zu einer sehr spezifischen Primerbindung führt. Die hohe Temperatur sowie der Zusatz von DMSO reduzieren die Stabilität von Sekundärstrukturen in der mRNA.

190 ng Poly-(A⁺)-RNA der Zelllinie 530 wurden mit dem Primer 312rev1 (5'AAATCCCCGAATTCTCCTGTGG3') revers transkribiert (mit einer Endkonzentration von 0.3 µM). Der Reaktion wurden 7% DMSO zugegeben. Die Synthese erfolgte bei 65°C für 30 min.

Die PCR wurde im selben Tube wie die RT-PCR durchgeführt.

Der erste Strang cDNA wurde als Matrize für die folgende PCR genommen. Die PCR wurde mit den Primern 312rev1(5'AAATCCCCGAATTCTCCTGTGG3') und 312f6 (5'ACCCGCTCCGCTCCGCTC3') mit einer Endkonzentration von je 0.3 µM durchgeführt.

PCR-Bedingungen: 35 Zyklen

94°C - 30sec,

69°C - 30sec,

72°C - 60sec.

Das PCR-Fragment wurde anschließend subkloniert und analysiert.

2.2.5. Expressionsanalysen

2.2.5.1. Reverse Northern-Blot Analyse

Mit Hilfe der Reverse Northern Blot-Analyse ist es relativ einfach möglich eine große Anzahl von cDNA Fragmenten auf deren differentielle Expression hin zu untersuchen (Zhang *et al.*, 1996).

Die aus dem Differential Display Gel isolierten cDNA Fragmente wurden dazu in doppeltem Ansatz auf ein Agarose-Gel aufgetragen und dann im Southern-Blot Verfahren auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Boehringer Mannheim) transferiert und durch UV-Bestrahlung mit einem UV Stratalinker 2400 (Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Membran wird anschließend genau in der Mitte auseinandergeschnitten, so dass sich auf jeder der beiden Membranen ein identischer Satz an cDNAs befindet.

Anschließend wurden die beiden Membranen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden, hergestellt durch reverse Transkription von Gesamt-RNA aus 530 und NMCL-1 (2.2.6.2.), getrennt hybridisiert. Markierung, Hybridisierung und Waschen erfolgte nach Protokoll, wie in 2.2.5.2. beschrieben.

Southern-Transfer:

Mit Hilfe des Southern-Transfers werden DNA-Fragmente aus Agarosegelen auf Nylonmembranen übertragen.

Die Proben wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Zur späteren Größenbestimmung der Fragmente wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und unter ultraviolettem Licht mit angelegtem Lineal fotografiert. Zum Transfer der DNA vom Gel auf die Nylonmembran wurde die VacuGene- Kammer (LKB) verwendet. Der Aufbau des Blots wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Depurinierung der DNA-Fragmente wurde das Gel für 10 min in 0,25 N HCl inkubiert. Anschließend wurde für 8 Minuten mit 1,5 M NaCl; 0,4 M NaOH Denaturierungslösung die DNA im Gel denaturiert. Nach 5 Minuten Behandlung mit Neutralisierungslösung (1 M Tris, 2 M NaCl) erfolgte der Vakuum-Transfer der DNA auf die Membran, mit 20x SSC als Transferpuffer. Die Transferzeit betrug ca. 2 h. Nach dem Transfer wurde die Membran zweimal für jeweils 5 min in 5x SSC gewaschen. Anschließend wurden die Proben auf dem Filter vernetzt (UV Stratalinker 2400, Stratagene) und entweder sofort für eine Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.2. Northern-Blot Analyse

Zur Quantifizierung einer bestimmten RNA-Spezies in einer RNA-Population werden die mRNA Proben unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarose-Gel elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Daraufhin erfolgt der Transfer der mRNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran durch Kapillarkräfte (Blotting). Durch die anschließende UV-Bestrahlung kommt es zu kovalenten Bindungen zwischen der mRNA und der Nylonmembran.

Je 1 µg Poly-(A⁺)-RNA der zu untersuchenden Proben wurden dabei in parallelen Spuren auf ein 1%iges denaturierendes Formaldehyd Gel aufgetragen. Die Proben wurden vorher in der Vakuum-Zentrifuge auf ca. 5 µl eingengt und mit 15 µl RNA Ladepuffer versetzt. 3-5 µl RNA-MW-Standard (Gibco BRL 0.24-9.5 Kb RNA Ladder) wird mit 15 µl RNA Ladepuffer und 0.5 µl EtBr versetzt. Zum Denaturieren wurden die Proben und der Standard vorher für 15 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

Zur Herstellung des 1%igen Formaldehyd-Agarosegels wurde 1 g MB-Agarose in 72 ml bidest. H₂O (DEPC-behandelt) aufgeschmolzen und danach auf 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 10 ml 10x MOPS und 18 ml Formaldehyd wurde das Gel in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Das Gel ließ man dann für ca. 1 h aushärten. Vor dem Gießen des Gels

und Durchführung der Elektrophorese muss die Gelkammer, der Schlitten und der Kamm für 15 Minuten mit 0,1 N NaOH behandelt und anschließend mit sterilem bidest. DEPC-H₂O abgespült werden.

Die Elektrophorese wurde bei 5 V/cm (gemessen zwischen den Elektroden) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS-Puffer verwendet. Für den Transfer der RNA von dem Gel auf die positiv geladene Nylonmembran (BrightStar-PlusTM, Ambion Inc., Austin, Texas) wurde ein sogenannter "capillary downward-blotting", von oben nach unten verwendet.

Als Transferpuffer wurde 20x SSC verwendet. Der Transfer wurde für 15 Minuten pro Millimeter Geldicke durchgeführt. Danach wurde die Membran nochmals kurz in 1x MOPS-Puffer gelegt und anschließend UV-fixiert (Stratagene UV Stratalinker 2400).

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte mit α -[³²P]dCTP markierten cDNA-Proben (s. 2.2.6) mit einer spezifischen Aktivität von 2×10^6 cpm/ml. Zur Vorhybridisierung und als Hybridisierungs-Puffer wurde die ExpressHybTM "Hybridization Solution" (Clontech) verwendet. Die Membran wurde für 30 Minuten bei 68° C vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Probe wurde bei 68° C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen in Lösung 1 (2x SSC, 0.05% SDS) bei Raumtemperatur für 30-40 Minuten, unter ständigem schütteln und mehrmaligem Wechseln der Waschlösung gewaschen. Ein Waschschrift mit Lösung 2 (0.1x SSC, 0.1% SDS) bei 50°C für 40 min folgte. Nach dem Waschen wurden die Membranen in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm (Cronex, Medical X-Ray Films Sterling Diagnostic Imaging Inc., USA) bei -80°C für 1 bis 72 Stunden exponiert.

2.2.5.3. Genexpressionsanalysen mittels kommerzieller Blots

Um zelllinien- und gewebespezifische Expressionsprofile der neu identifizierten Gene zu evaluieren wurden verschiedene, kommerziell erhältliche Systeme verwendet.

1. Multiple Tissue Expression Array (MTE) (Clontech): Mit dem MTE Blot ist es möglich die relative Expression eines Transkripts in einem großen Spektrum an fötalen und adulten Geweben sowie in Tumor-Zelllinien zu untersuchen. Der MTE Blot enthält 76 gewebespezifische Poly-(A⁺)-RNAs.

2. Multiple Tissue Northern-Blot, MTN Blot (Clontech): Mit diesen vorgefertigten Northern-Blots, mit Poly-(A⁺)-RNAs (2 µg) aus verschiedenen Normalgeweben und Zelllinien, ist es möglich die relative Expressionstärke sowie die Größe des zu untersuchenden Transkripts zu bestimmen.

3. Human Tumor Panel Blot (Invitrogen): Dieser Blot enthält ein Panel von Tumor-RNAs aus verschiedenen Geweben. RNA, isoliert aus Normalgewebe, wurde direkt neben der Tumor-RNA des selben Patienten aufgetragen. Jeweils 20 µg Gesamt RNA wurden aufgetragen. Die verschiedenen Blots wurden mit einer [³²P]-markierten cDNA Sonde hybridisiert. Die Hybridisierungsbedingungen wurden nach Herstellerangaben gewählt. Identische Mengen an aufgetragener RNA wurden durch Rehybridisierung der verschiedenen Blots mit einer [³²P]-markierter β-Aktin cDNA bestätigt.

2.2.6. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

2.2.6.1. Random Primed Methode

Die Markierung von DNA-Fragmenten für die Northern- und Southern- Analytik basiert auf der "Random-primed" Methode von Feinberg und Vogelstein (1983). Die Markierung wurde mit α-[³²P]dATP durchgeführt. Die Methode basiert auf einer Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden aller möglichen Basensequenzen an die zu markierende DNA. Der komplementäre Strang wird anschließend von den 3'-Enden dieser "random primer" mit Hilfe des Klenow-Enzyms synthetisiert. Dabei wird das als Substrat angebotene α-[³²P]dATP in den neu synthetisierten komplementären DNA-Strang eingebaut. In dem als Primer dienenden Hexanukleotid-Gemisch sind praktisch alle Sequenzkombinationen enthalten, so dass sie an die eingesetzte DNA in statistischer Verteilung binden und so zu einer Markierung der gesamten DNA führt.

Die Markierung wurde nach Herstellerprotokoll des verwendeten Strip-EZ DNA Kit (Ambion) durchgeführt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Quick Spin Columns (Boehringer Mannheim) abgetrennt. Die zu markierenden Proben wurden mit einer spezifischen Aktivität von 2×10^9 cpm/µg markiert.

2.2.6.2. Markierung durch reverse Transkription

Die Sonden für den "Reverse Northern" wurden mit dem Reverse Prime cDNA Labeling Kit von GenHunter durchgeführt. Dabei wird während der reversen Transkription der mRNAs, isoliert aus den Zelllinien 530 und NMCL-1, α-[³²P]dCTP in den ersten Strang cDNA eingebaut.

Folgender 40 μ l Reaktionsansatz wurde hergestellt:

dH ₂ O	X μ l
5 x RT Puffer	8 μ l
dNTP (-C)	6 μ l
T ₂₀ Primer	4 μ l
Gesamt RNA	Y μ l (20 μ g)
α -[³² P]dCTP	5 μ g
X + Y	13 μ l

Inkubation bei 65°C für 5 Minuten, bei 37°C für 60 Minuten und bei 75°C für 5 Minuten.

Nach 10 Minuten bei 37°C wurden 4 μ l MMLV Reverse Transkriptase zugegeben. Anschließend werden nicht-inkorporierte α -[³²P]dCTP Nukleotide mit Quick Spin Columns abgetrennt (Boehringer Mannheim).

2.2.7. DNA und Protein Sequenzanalyse

Homologievergleiche wurden in öffentlichen Datenbanken und in Datenbanken von INCYTE-Pharmaceuticals mit den Programmen Blast, Blast2 und FastA (Altschul SF., *et al.*, 1990) durchgeführt. Überlappende ESTs wurden mit dem Programm "Pharp" graphisch dargestellt. Eigenschaften der putativen Proteine wurden mit den Programmen PSORT II, TMHMM (v. 0.1, Computer program of the Center for Biological Sequence Analysis, Department of Biotechnology, The Technical University of Denmark) analysiert.

2.2.8. Mikrosatelliten Analyse

Mikrosatelliten bestehen aus kurzen tandemartigen repetitiven Sequenzen (50-300 bp). Die meisten Mikrosatelliten bestehen aus (CA)_n-Repeats, repetitive Sequenzen aus drei bis sechs Nukleotiden kommen ebenfalls vor. Mikrosatelliten sind über das gesamte Genom verstreut, machen mehr als 1% der DNA aus und sind oft stark polymorph (Fregeau CJ *et al.*, 1993; Smith, 1995). Mikrosatelliten lassen sich mittels PCR amplifizieren. Wenn sich die Zahl der Repeats in allen Loci unterscheidet, resultieren zwei Amplikons unterschiedlicher Größe, die sich elektrophoretisch unterscheiden lassen. Der Verlust der Heterozygotie äußert sich im Verlust eines Fragments. Mit Hilfe von DNA-Polymorphismen läßt sich ein Allelverlust auch dann nachweisen, wenn es in der herkömmlichen zytogenetischen Analyse keinen Hinweis auf Deletionen gibt.

2.2.8.1. Verwendete Marker

Um die Inzidenz von LOH auf 6q (German, 1973; Hansen *et al.*, 1987; Millikin *et al.*, 1991) zu bestimmen, wurden mit einem Panel von stark polymorphen Markern (> 0,7) verschiedene Zelllinien und Tumorbiopsien untersucht. Die Mikrosatelliten-Marker wurden in der öffentlichen Datenbank vom GDB (The Genome Database, an international collaboration in support of the human genome project) gefunden. Die Primer wurden anhand der die Mikrosatelliten flankierenden Sequenz konzipiert. Die forward Primer waren jeweils am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Locus	Bande	Whitehead CM	Marker	Hetero- zygotie	Sequenz forward Modifikation	Sequenz reverse	Produkt bp
D6S404	q16.3- q23.2	118.1	AFM 190yg5	0,74	tgacgccatgggacactct 5'-FAM	tactgacatttccactgtttgt	105
D6S472	6q16.3 6q23.2	132.7	AFM 128yd9	0,69	gatcagagcaaatgaaatacag 5'-FAM	gacataagagtgagggccat	90
D6S292	6q21- 6q23.3	138.2	AFM 203za9	0,83	tccttccacctccctct 5'-FAM	taagaactaaagttgcctgttc	106
D6S1684	6pter- 6qter	144.4	AFM 360 th 9	0,8	caactggattcaaatagatgtc 5'-HEX	atggcagcaggctatgt	247
D6S308	6q16.3 -6q27	145.5	AFM 262xe9	0,75	tggagagaattcacgtacata 5'-TET	aaacatttagaccataatgcata	117
D6S311	6q24- 6q25	148.2	AFM 276xf1	0,92	atgtcctcattggtgttg 5'-HEX	gattcagagcccaggaagat	259
D6S305	6q25.2 -6q27	166.6	AFM 242zg5	0,84	catcctttctactcctgag 5'-TET	gtaccagaactcagccacat	102

Die Mikrosatelliten für die LOH Untersuchungen wurden dabei so ausgewählt, dass sie ein Großteil des langen Armes von Chromosom 6 abdecken. Durch Verwendung dieses Panels an Markern ist es möglich, die Größe des deletierten Bereiches zu bestimmen. Die Lage der Mikrosatelliten Marker ist in dem Ideogramm des humanen Chromosoms 6 gezeigt (s. Abbildung 5).

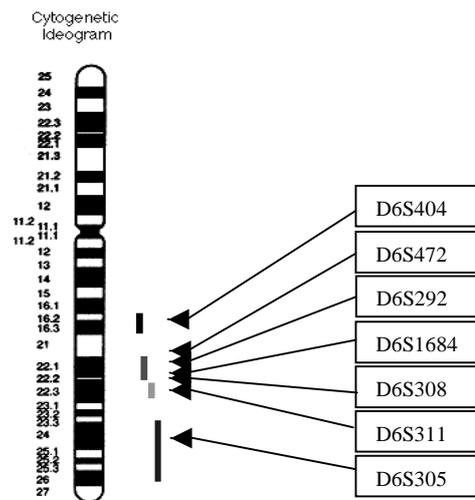


Abbildung 5: Zytogenetisches Ideogramm des humanen Chromosoms 6. Die Mikrosatelliten die für die LOH-Analyse verwendet wurden und deren Lokalisation sind angegeben.

2.2.8.2. PCR Analyse

Für die PCR wurde das High Fidelity PCR Master (Roche Diagnostics GmbH) System verwendet.

Master Mix 1:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
Forward primer	1 µl	300 nM
Reverse primer	1 µl	300 nM
Template DNA	X µl	50-100 ng
dH ₂ O	auf 25 µl auffüllen	

Master Mix 2:

25 µl High Fidelity PCR Master (Roche Diagnostics)

Beide Master Mixe wurden zusammenpipettiert, vorgetext und kurz abzentrifugiert.

PCR-Bedingungen:

2 min 94°C und 40 x 94°C - 30 sec, 55°C - 30 sec, 72°C - 30 sec und mit einer Extension von 7 min bei 72°C am Ende der Reaktion.

2.2.8.3. Analyse und Kalkulation von LOH

Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten PCR Produkte wurden im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer in einer Kapillare aufgetrennt (mit POP 4 Polymer, PE Applied Biosystems). Die Ergebnisse wurden anschließend mit der GeneScan Analysis Software (PE Applied Biosystems) analysiert.

LOH ist als Verlust von >50% der relativen Peakhöhe des Tumorallels verglichen mit dem normalen Allel definiert.

Folgende Formel wurde verwendet:

$$\text{LOH} = \frac{(\text{Peakhöhe des normalen Allels 2} / \text{Peakhöhe des normalen Allels 1})}{(\text{Peakhöhe des Tumor Allels 2} / \text{Peakhöhe des Tumor Allels 1})}$$

LOH wird bei einem Wert kleiner als 0,5 oder größer als 2,0 angenommen.

2.2.9. Klonierung in E.coli, Ligation und Transformation

Zur Klonierung von differentiellen cDNA Fragmenten aus der Differential Display Analyse, von RT-PCR Produkten, sowie von Produkten aus der 5'RACE-PCR wurde das TopoTA Cloning System (Invitrogen, San Diego, CA) verwendet.

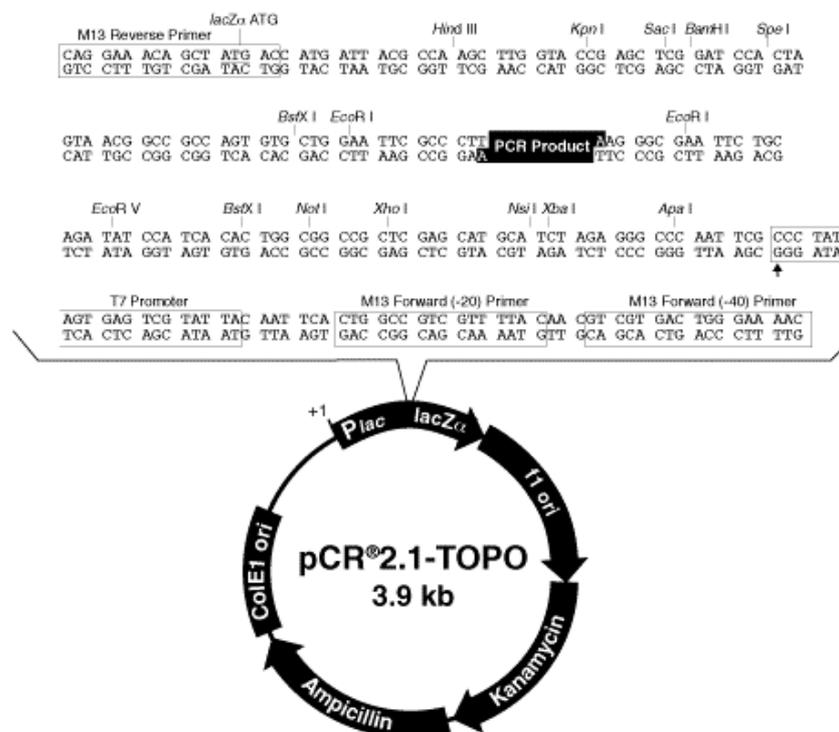


Abbildung 6: Plasmidkarte des pCR 2.1-TOPO Vektors (Invitrogen), mit der Sequenz der multiplen Klonierungsstelle.

2.2.10. Zellbiologische Methoden

2.2.10.1. Kultivierung der Zelllinien 530 und NMCL-1 .

Alle Zellen und Zelllinien wurden im angegebenen Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Hatten die Zellen etwa 80% konfluente Zellrasen gebildet, wurden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Ein Teil der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versorgt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (Medium + 10% FKS) resuspendiert und in Kryoröhrchen (in einem Styroporbehälter) bei -80°C über Nacht eingefroren. Danach wurden die Zellen zur Lagerung in einen Stickstofftank (-192°C) gegeben.

2.2.10.2. Kulturbedingungen für die Melanoma-Zelllinien 530 und NMCL-1

Die Zelllinie 530 wurde von einer operativ entfernten Melanoma-Metastase etabliert (Westphal JR *et al.*, 1997). Die stark metastasierende Zelllinie NMCL-1 stammt ebenfalls von einer Melanoma-Metastase ab. Beide Zelllinien wachsen als Monolayer in Kulturflaschen mit DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Biowhittaker) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum sowie 2% Penizillin/Streptomycin. Zur Bestimmung der Tumorgenität und des Metastasierungspotentials der beiden Zelllinien, wurden die Zellen in subkonfluentem Zustand nach zwei minütiger Behandlung mit 0,25% Trypsin und 0,02% EDTA, geerntet. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Serum enthaltendem Medium gewaschen und in PBS resuspendiert. 5×10^6 Zellen wurden dann subkutan in die laterale Wand des Thorax von BALB/c athymischen Mäusen injiziert. Die Mäuse wurden im Tierstall der „Central Laboratories“ der Universität Nijmegen (Holland), gehalten. Die Mäuse wurden zweimal pro Woche auf ihren Allgemeinzustand und lokales Tumorwachstum hin untersucht. Für jede Zelllinie wurden zwei Gruppen von je fünf Mäusen injiziert. Die Mäuse wurden getötet, sobald sie Zeichen von Krankheit oder Atemproblemen zeigten. Mäuse, die gesund blieben, wurden 3-4 Monate nach Inokulation getötet. Um Lungenmetastasen zu detektieren, wurden Paraffinschnitte von mindestens drei Ebenen der Lunge untersucht.

Die Zelllinie 530 zeigte Tumorbildung in 8 von 10 inokulierten Mäusen. In der Lunge konnten nach mikroskopischer Untersuchung keine Metastasen gefunden werden. Die Zelllinie NMCL-1 zeigte in allen 10 inokulierten Mäusen eine Tumorbildung. Im Gegensatz zur

Zelllinie 530 zeigte NMCL-1 zudem extensive Lungenmetastasen in allen inokulierten Mäusen.

Auftauen der Zelllinie:

Der Inhalt einer Ampulle wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut bis nur noch eine kleine Eiskugel (ca. 4 mm Durchmesser) übrig blieb. Die geschlossene Ampulle wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert, kurz abgeflammt und unter sterilen Bedingungen geöffnet. Der Inhalt wurde mit 9 ml Kulturmedium verdünnt und die Zellsuspension 10 Minuten bei RT und 600 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet ohne Schaumbildung in 5 ml Medium gut resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in einer T75 (T25) Zellkulturflasche mit 20 ml Medium 72 Stunden bei 37°C, 10% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre inkubiert.

Trypsinierung der Zellen:

Das gebrauchte Kulturmedium wurde abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 20 ml vorgewärmtem PBS gespült, danach wurden 4 ml vorgewärmte Trypsin/EDTA-Lösung zugefügt und die Flasche geschwenkt, bis alle Zellen damit beschichtet waren. Der Rest der Trypsin/EDTA-Lösung wurde abgesaugt und die Flasche für 2-5 Minuten im Brutschrank bis zur kompletten Ablösung der Zellen inkubiert (mikroskopisch kontrolliert). Die abgerundeten Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und zentrifugiert (10 Minuten bei RT und 600 rpm). Das Zellpellet wurde nochmals in 10 ml Medium resuspendiert und von dieser Zellsuspension wurden dann ca. 100 µl für eine Vitalzählung in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Die 100 µl Zellsuspension wurde mit 100 µl Trypanblau gemischt. Die Zahl der lebenden Zellen wurde gemäß Neubauer mit folgender Formel errechnet:

Zellen/ml = Zellzahl von 1 Quadrat x 2 x 10 000

Zellkonzentration: 5 x 10⁵ für T25

1.5 x 10⁶ für T75

3 x 10⁶ für T150

3. Ergebnisse

3.1. Die Differential Display Analyse

Zur Bestimmung von Unterschieden im Genexpressionsmuster zwischen der nicht-metastasierenden Melanoma-Zelllinie 530 und der stark metastasierenden Melanoma-Zelllinie NMCL-1 wurde eine Differential Display Analyse durchgeführt (s. Abbildung 7). Dazu wurden 3 verschiedene oligo dT-Primer in Kombination mit 34 Zufallsprimern (dies entspricht 102 Kombinationen) verwendet. Alle Ansätze (reverse Transkription, PCR, Gelelektrophorese) wurden jeweils zweimal, in voneinander unabhängigen Reaktionen, durchgeführt. Die reproduzierbar differentiell auftretenden Banden wurden isoliert und reamplifiziert. Es wurden 39 Fragmente, die differentiell exprimierten mRNAs entsprechen, aus den Gelen isoliert und weiter analysiert.

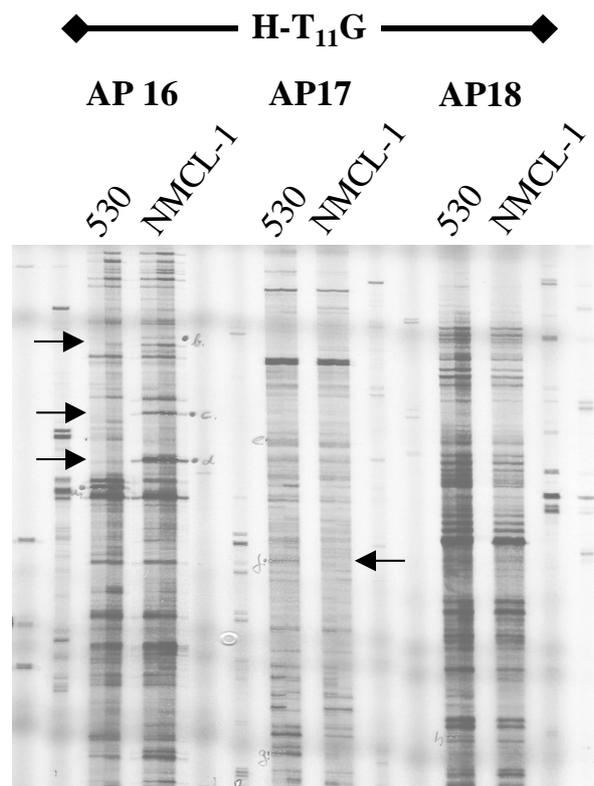


Abbildung 7: Autoradiographie eines Differential Display Gels. Genexpressionsmuster der humanen Melanoma-Zelllinien 530 und NMCL-1. Der oligo dT-Primer ($H-T_{11}G$) und die Zufallsprimer (AP16, AP17, AP18) sind dargestellt. Zur besseren Reproduzierbarkeit wurde für jede Zelllinie ein Doppelansatz aufgetragen. Jeweils neben den DD-PCR Ansätzen ist eine Kontrollreaktion ohne Zugabe von Reverser Transkriptase aufgetragen. So lassen sich genomische und sonstige DNA-Kontaminationen von revers transkribierter mRNA unterscheiden. Pfeile zeigen differentielle Banden, die aus dem Gel ausgeschnitten und weiter analysiert wurden.

Die isolierten cDNA-Fragmente hatten eine Größe zwischen 150 und 450 bp.

Zur Bestätigung der differentiellen Expression wurden die isolierten cDNAs zuerst in einem Reverse-Northern Experiment überprüft. Diejenigen Fragmente, die auch in dieser Analyse eine differentielle Expression zeigten, wurden dann nochmals in einer Northern-Blot Analyse bestätigt. Die Resultate dieser Northern-Blot Analysen zeigten, dass 5 der insgesamt 39 cDNA-Fragmente (ca. 13%) differentiell exprimierten mRNAs entsprachen. Somit waren 87% der isolierten Fragmente sogenannte "Falschpositive".

Die cDNA-Fragmente mit differentieller Expression wurden anschließend in den pCR 2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Um sicher zu gehen, ob die richtigen Fragmente kloniert wurden, wurden die Inserts isoliert und in einer weiteren Northern Analyse nochmals bestätigt.

3.2. Differentielle Expression von HLA-Genen

Im Differential Display konnten zwei unterschiedliche, differentiell exprimierte mRNAs, die für die beta Ketten von HLA-II Molekülen kodieren, identifiziert werden.

3.2.1. Differentielle Expression des HLA-DR-beta-1 Gens

In der Differential Display Analyse wurde mit Hilfe der Primerkombination H-T₁₁A und AP7 (s. 2.2.3.7.) ein 300 bp großes cDNA Fragment amplifiziert, anschließend aus dem Gel isoliert und weiter analysiert.

In einer Northern-Blot Analyse konnte die mRNA nur in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 nachgewiesen werden (s. Abbildung 8). Auch bei sehr langer Exposition konnte kein Signal in der nicht-metastasierenden Zelllinie NMCL-1 gefunden werden. Anhand des Northern-Blot Ergebnisses konnte die Größe des Transkripts (ca. 1,2 kb) bestimmt werden.

Das Differential Display Fragment wurde sequenziert und anschließend mit der Sequenz in Datenbanken nach Homologien zu bekannten Sequenzen gesucht. Die Datenbankrecherchen zeigten eine 99%ige Homologie zu der beta-Kette des humanen Haupt-Histokompatibilitäts-Antigens DR (HLA-DR).

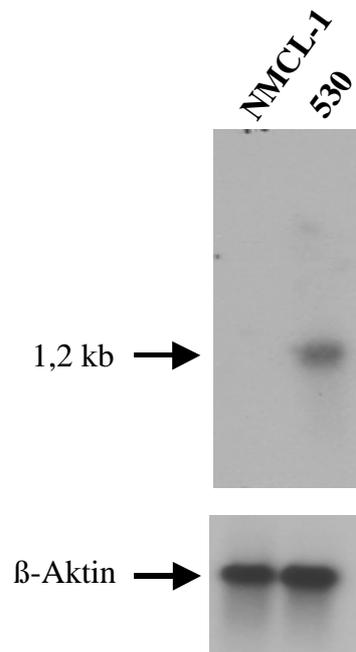


Abbildung 8 : Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von HLA-DR-beta-1 in den Zelllinien 530 und NMCL-1. Je 1 μg mRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α -[^{32}P]-markierten HLA-DR-beta-1 spezifischen Sonde (DD-Fragment) hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α -[^{32}P]-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

3.2.2. Differentielle Expression des HLA-SB-beta Gens

In der Differential Display Analyse wurde mit Hilfe der Primerkombination H-T₁₁A und AP7 (s. 2.2.3.7.) ein 290 bp großes cDNA Fragment amplifiziert, anschließend aus dem Gel isoliert und weiter analysiert. In einer Northern-Blot Analyse konnte die mRNA nur in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 nachgewiesen werden (s. Abbildung 9). In einem Northern-Blot Experiment (ohne Abbildung) mit einem Panel von Melanoma-Zelllinien (530, IF6, MV1, M14, MEL57, NMCL-1, IF6m, MV3, BLM) konnte nur in der Zelllinie 530 eine Expression gefunden werden. Anhand der Northern-Blot Ergebnisse konnte die Größe des Transkripts (ca. 1,0 kb) bestimmt werden. Das Differential Display Fragment wurde sequenziert und anschließend mit der Sequenz in Datenbanken nach Homologien zu bekannten Sequenzen gesucht. Die Datenbankrecherchen zeigten eine ca. 98%ige Homologie zu der beta-Kette des humanen Haupt-Histokompatibilitäts-Antigens SB (HLA-SB-beta).

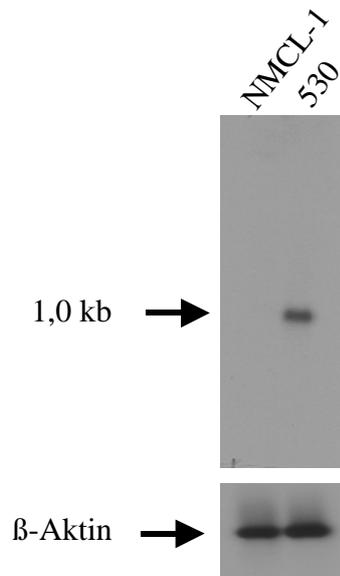


Abbildung 9 : Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von HLA-SB-beta in den Zelllinien 530 und NMCL-1. Je 1 μg mRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α - ^{32}P -markierten HLA-SB-beta (DD-Fragment) spezifischen Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α - ^{32}P -markierten β -Aktin -Sonde rehybridisiert.

3.3. Differentielle Expression der Stearoyl-CoA Desaturase (Scd)

In der Differential Display Analyse wurde mit Hilfe der Primerkombination H-T₁₁G und AP12 (s. 2.2.3.7.) ein 267 bp großes cDNA Fragment amplifiziert, anschließend aus dem Gel isoliert und weiter analysiert. Die differentielle Expression wurde in einem Northern-Blot Experiment bestätigt (s. Abbildung 12, II). In weiteren Northern-Blot Analysen, mit der Scd-spezifischen Sonde A (s. Abbildung 11) wurde ein 5,2 kb und ein 3,9 kb großes Transkript detektiert (s. Abbildung 10). Die beiden Transkripte sind in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 stark überexprimiert. In beiden Zelllinien war das 3,9 kb-Transkript gegenüber dem 5,2 kb-Transkript überrepräsentiert.

Zur Isolierung der kompletten cDNA Sequenz wurde ein Phagenbank-Screen durchgeführt. Dabei konnte ein Klon mit einer Länge von 1144 bp isoliert werden. Das Experiment wurde eingestellt, da zu diesem Zeitpunkt die komplette Sequenz der cDNA von Zhang *et al.* (1999) isoliert und veröffentlicht wurde. Die isolierte 1144 bp cDNA hatte eine 100%ige Homologie zur veröffentlichten Sequenz. Aufgrund der Sequenzhomologie zu dem bekannten murinen Gen gehen die Autoren davon aus, dass es sich hierbei um die humane Stearoyl-CoA Desaturase (Scd) handelt.

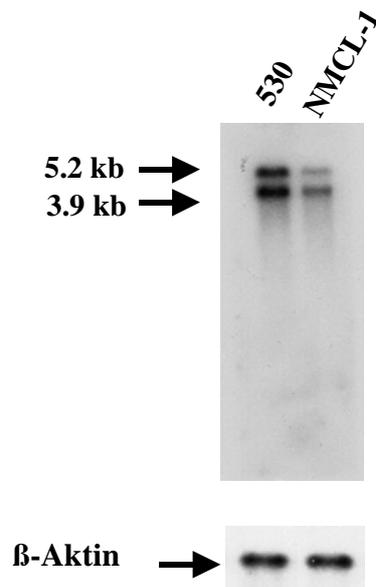


Abbildung 10: Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von *Scd* in den Zelllinien 530 und NMCL-1. Je 1 μg mRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α -[^{32}P]-markierten *Scd*-spezifischen Sonde (A) (s. Abbildung 11) hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α -[^{32}P]-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

Die volle Länge der cDNA beträgt 5221 bp und kodiert im ORF für ein Protein bestehend aus 359 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 41,5 kD. Die Sequenz besitzt eine 3'UTR von 235 bp und eine extrem lange 5'UTR von 3906 bp. In der cDNA-Sequenz der Desaturase wurden zwei Polyadenylierungssignale (AATAAA) gefunden. Das erste Signal liegt zwischen den Nukleotiden 3972 und 3977, das zweite Signal zwischen den Nukleotiden 5187 und 5192. Bei den beiden aus dem Differential Display und dem Phagenbank-Screen isolierten cDNA Klonen beginnt der Poly-(A)-Schwanz 16 bp weiter in Richtung 3' des ersten Polyadenylierungssignals (zwischen 3972 und 3977). Das heißt, mit Hilfe der Differential Display Analyse wurde ein Fragment der kleineren Variante (3,9 kb) isoliert. In der 3'UTR wurden auch drei "mRNA-Instabilitäts-Sequenzen" (ATTTA) gefunden. Ein Signal lag im 3,9 kb Transkript und zwei weitere im 5,2 kb Transkript.

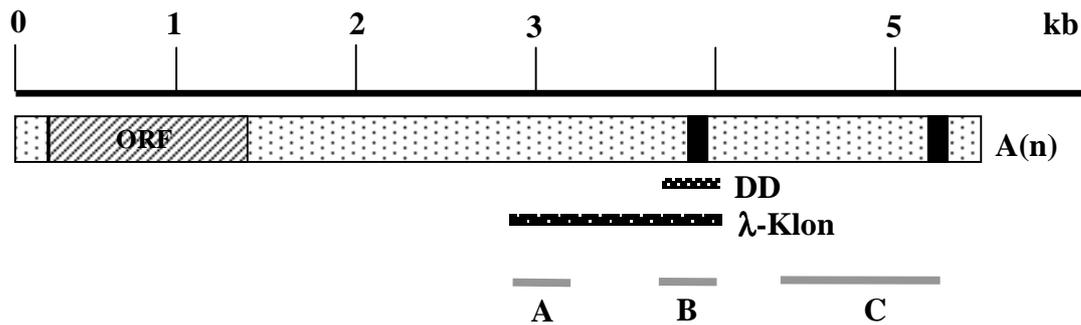


Abbildung 11: Schematische Darstellung der *Scd*-cDNA Sequenz (Balken). Oben ist die Länge in kb angegeben. Unter der Sequenz sind die Lokalisationen der verwendeten Sonden (A, B, C) für die Northern Analysen angegeben, wobei Sonde B dem DD-Fragment entspricht. Die Lokalisation des DD-PCR Fragments (DD; 267 bp) und des Klon isoliert aus der Phagenbank (λ -Klon; 1144 bp) sind durch schwarze Balken unter der Sequenz angegeben. Die zwei vertikalen Balken (schwarz) in der UTR repräsentieren die zwei Polyadenylierungssignale.

3.3.1. Identifizierung von verschiedenen *Scd*-Transkripten

Um festzustellen ob die Expression des *Scd*-Gens mit dem Metastasierungspotential von verschiedenen humanen Melanoma-Zelllinien korreliert, wurde das Expressionsmuster in einer Northern-Blot Analyse bestimmt. Es konnte keine Korrelation zwischen Expressionsstärke und Metastasierungspotential der untersuchten Zelllinien festgestellt werden (s. Abbildung 12). Ob die beiden 3,9 kb und 5,2 kb Transkripte durch die alternative Verwendung der zwei Polyadenylierungssignale zustande kommen, sollte mit verschiedenen Northern-Experimenten geklärt werden. Dazu wurden für die Hybridisierung markierte Sonden verwendet, die aus verschiedenen Bereichen der *Scd*-cDNA (s. Abbildung 11) stammten. Die Northern-Blot Ergebnisse zeigten, dass beide Polyadenylierungssignale alternativ verwendet werden. Bei Verwendung der Sonde C (s. Abbildung 11), die aus dem extremen 3'-Bereich der *Scd*-cDNA stammt, wurde im Northern-Blot (s. Abbildung 12; I) nur die 5,2 kb Bande detektiert. Dies zeigt, dass bei dem großen Transkript das Polyadenylierungssignal am 3'-Ende der *Scd*-cDNA verwendet wird. Die kleine 3,9 kb Variante kann so nicht detektiert werden. Nimmt man die Sonde A (s. Abbildung 11) zur Hybridisierung so können die beiden 3,9 kb und 5,2 kb großen Transkripte detektiert werden. Bei Verwendung der Sonde B (= DD-Fragment) wurden in den Zelllinien MV1, M14 und NMCL-1 zusätzlich zu den 3,9 kb und 5,2 kb Transkripte noch 2 weitere Transkripte (1,0 kb und 0,5 kb) nachgewiesen (s. Abbildung 12 II). Da die beiden kleinen Transkripte (1,0 kb und 0,5 kb) ausschließlich mit der Sonde B nachzuweisen sind, ist davon auszugehen, dass neben dem 3,9 kb Transkript auch diese durch

Verwendung des ersten Polyadenylierungssignales (zwischen den Nukleotiden 3972 und 3977) generiert werden.

Das 5,2 kb Transkript wird unter Verwendung des zweiten, weiter in Richtung 3' liegenden, Polyadenylierungssignals (zwischen den Nukleotiden 5187 und 5192) generiert. In den beiden kleinen 0,5 kb und 1,0 kb Varianten konnte kein relevanter Leserahmen gefunden werden, so dass diese beiden Transkripte vermutlich nicht translatiert werden.

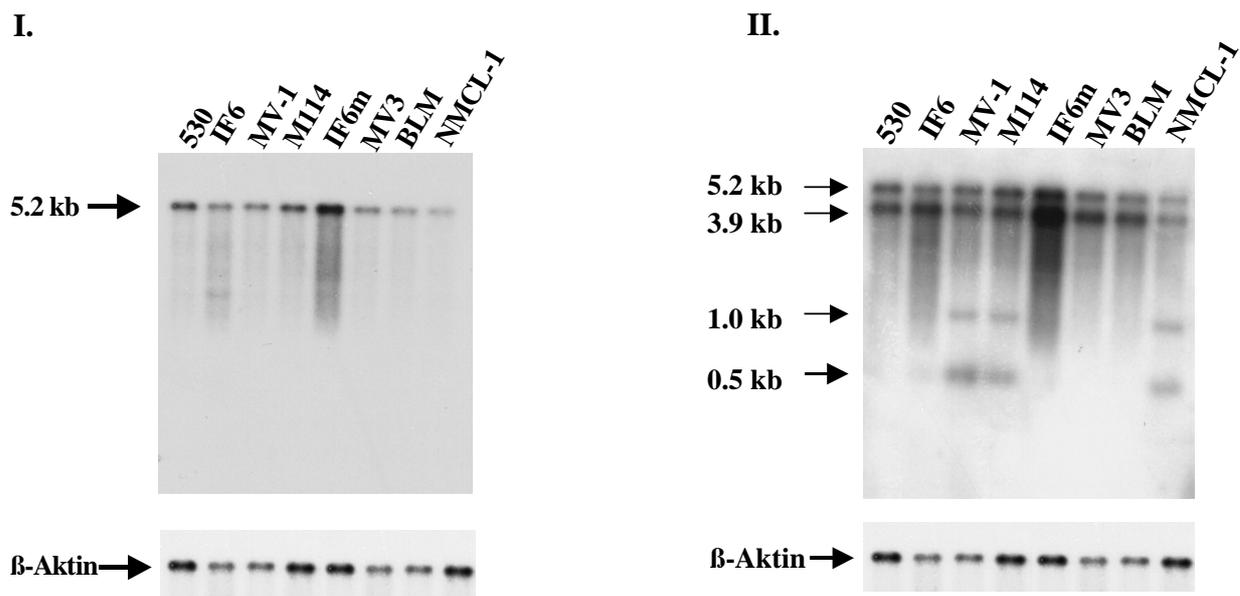


Abbildung 12: Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von Scd in verschiedenen Melanoma-Zelllinien mit unterschiedlich starkem Metastasierungspotential. Je 1 μg mRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α - ^{32}P -markierten Scd-spezifischen Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). **I:** Der Blot wurde mit der Scd-spezifischen Sonde C (s. Abbildung 11) hybridisiert. **II:** Der Blot wurde mit der Scd-spezifischen Sonde B (s. Abbildung 11) hybridisiert. Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α - ^{32}P -markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

Expressionsanalysen von *Scd* in Normalgeweben zeigten nur eine Expression im Herz, Gehirn, in der Lunge und der Leber. Keine Expression wurde dagegen in der Plazenta, dem Skelettmuskel, der Niere und dem Pankreas gefunden. Die relativen Mengen der 3,9 kb und 5,2 kb großen Transkripte variieren in den einzelnen Geweben. So ist das 3,9 kb Transkript im Herz überrepräsentiert, während im Gehirn und der Lunge das 5,2 kb Transkript stärker exprimiert wird.

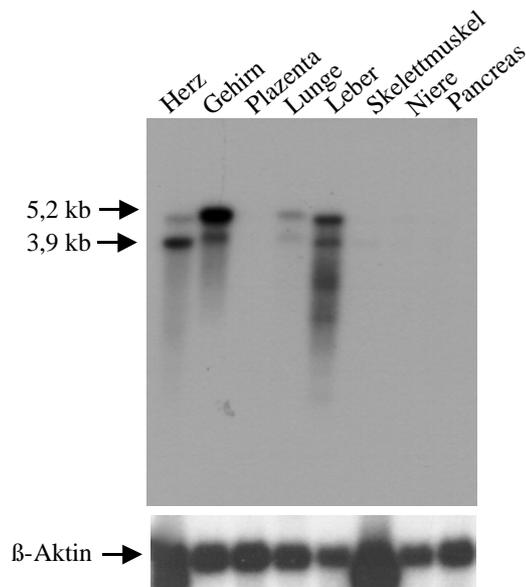


Abbildung 13: Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von *Scd* in verschiedenen humanen Geweben. Für diese Analyse wurde der MTN-Blot H von Clontech verwendet. Je 2 μ g mRNA wurden in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α - 32 P-markierten *Scd*-spezifischen Sonde (Sonde A; s. Abbildung 11) hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α - 32 P-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

3.4. Identifizierung des neuen Gens URIM (Up-Regulated in Metastasis)

In der Differential Display Analyse wurde mit Hilfe der Primerkombination H-T₁₁G und AP16 (s. 2.2.3.7.) ein 371 bp großes cDNA Fragment amplifiziert, anschließend aus dem Gel isoliert und weiter analysiert. In einer Northern-Blot Analyse konnte eine starke Überexpression in der metastasierenden Zelllinie NMCL-1, gegenüber der nicht-metastasierenden Zelllinie 530, nachgewiesen werden (s. Abbildung 14). Anhand des Northern-Blot Ergebnisses konnte die Größe des Transkripts (ca. 0,9 kb) bestimmt werden.

Das klonierte cDNA Fragment wurde anschließend sequenziert. Da bei den folgenden Datenbankrecherchen keine Homologien zu bisher bekannten Genen gefunden wurden, wurde die 371 bp cDNA Sequenz als Grundlage zum Design einer RACE-PCR genommen.

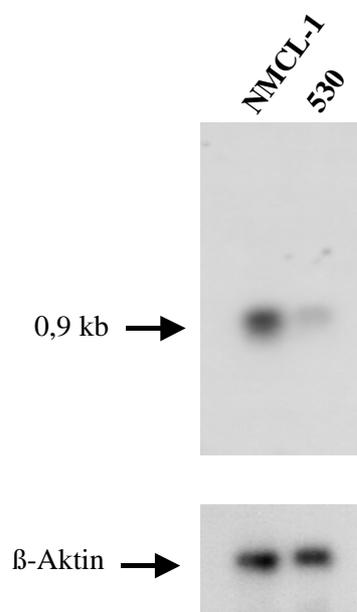


Abbildung 14: Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von URIM in den Zelllinien 530 und NMCL-1. Je 1 μg mRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α -[^{32}P]-markierten URIM-Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α -[^{32}P]-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

3.4.1. Isolierung der vollen Länge cDNA mittels RACE-PCR

Mit der Sequenzinformation, des aus dem Differential Display gewonnenen 371 bp Fragments, konnten Primer konzipiert werden, die dann für die Durchführung einer 5'-RACE-PCR verwendet wurden. Mit dieser Technik konnte das fehlende 5'-Ende identifiziert und so die volle Länge cDNA isoliert werden.

Es wurden folgende Ansätze mit jeweils 0,7 µg gesamt RNA aus der Zelllinie 530 durchgeführt:

	Primer für die reverse Transkription	Primer für die PCR	
		reverse 5' → 3'	forward 5' → 3'
1	GAACCCTGGTCATT	CTCTCAGGGGCATGTTA	GGCCACGCGTCGACTAGT ACGGGIIGGGIIGGGIIG
2	GGATCTTCCTTTTCA	TTCAAGCGCTCCTTTGCTTCT	GGCCACGCGTCGACTAGT ACGGGIIGGGIIGGGIIG

I = Deoxyinosine

Im Agarose-Gel war bei diesen Ansätzen noch kein Produkt sichtbar. Das gewünschte, spezifische Produkt wird bei der RACE-PCR mit 30 Zyklen oft nicht in ausreichender Menge amplifiziert. Daher wurde mit dem Produkt (0,1%) der ersten beiden PCR Ansätze noch eine "nested PCR" mit verschiedenen Primern durchgeführt.

Nr.	Template	Forward Primer 5' → 3'	Reverse Primer 5' → 3'
3	0,1% aus 2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	TTCAAGCGCTCCTTTGCTTCT
4	0,1% aus 1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	CAGCATGTTAGGATAGCAGC
5	0,1% aus 1	CUACUACUACUAGGCCACGCGT CGACTAGTAC	CAGCATGTTAGGATAGCAGC
6	0,1% aus 1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	CTCTCAGGGGCAGCATGTTA
7	0,1% aus 1	CUACUACUACUAGGCCACGCGT CGACTAGTAC	CTCTCAGGGGCAGCATGTTA
8	0,1% aus 2	CUACUACUACUAGGCCACGCGT CGACTAGTAC	TTCAAGCGCTCCTTTGCTTCT

Die PCR-Ansätze wurden anschließend zur Überprüfung der Produkte in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Jeweils 15 µl des PCR-Ansatzes wurde aufgetragen (s. Abbildung 15).

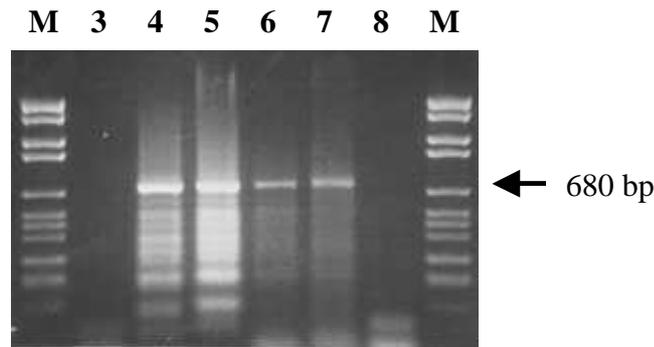


Abbildung 15: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel. Je 15 μ l des 5'-RACE-PCR-Ansatzes wurden aufgetragen. M = Marker VI (Boehringer Mannheim).

Das 680 bp RACE-PCR Fragment wurde aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und in den pCR 2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Das klonierte Fragment wurde anschließend sequenziert. Zusammen mit der bekannten Sequenz des DD-Fragments ergab sich als volle Länge der cDNA 750 bp (s. Abbildung 16). Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der Accession-Nummer AJ295637 hinterlegt. Eine Patentanmeldung erfolgte am 7.10.98 unter der Nummer EP No.98118919.4. In einem offenen Leserahmen von 618 bp wird für ein putatives Protein von 206 Aminosäuren kodiert. Von Nukleotid 722-727 wurde ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) gefunden. Für den Start der Translation ist die Sequenz beiderseits des Startcodons ATG von enormer Bedeutung (Kozak, 1996). Insbesondere die Positionen -3, die idealerweise ein Purin ist und die Position +4, das bevorzugt ein G sein sollte. Fehlen beide Charakteristika handelt es sich wahrscheinlich um einen falschen oder sehr schwachen Translationsstartpunkt. Bei URIM wurde in Position -3 ein Adenin (Purin) gefunden.

1	gagggtagccATGACGGCCTCCGTGCTGCGAAGTATCTCGCTAGCCCTGCGCCCGACTAG	60
1	M T A S V L R S I S L A L R P T S	17
61	CGGGCTTCTGGGAACTTGGCAGACGCAGCTTAGAGAGACTCACCAGCGAGCGTCATTGTT	120
18	G L L G T W Q T Q L R E T H Q R A S L L	37
121	GTCTTTCTGGGAACTCATTCCCATGAGATCAGAACCTCTTCGAAAAAAGAAGAAGGTAGA	180
38	S F W E L I P M R S E P L R K K K K V D	57
181	TCCTAAAAAGACCAAGAAGCAAAGGAGCGCTTGAAAAGGAAGATCCGAAAACTGGAAAA	240
58	P K K D Q E A K E R L K R K I R K L E K	77
241	GGCTACTCAAGAGCTAATTCCTATTGAAGATTTTATTACCCCTCTAAAGTTCTTGGATAA	300
78	A T Q E L I P I E D F I T P L K F L D K	97
301	AGCAAGAGAGCGGCCTCAGGTGGAGCTCACCTTTGAGGAGACTGAGAGGAGAGCTCTGCT	360
98	A R E R P Q V E L T F E E T E R R A L L	117
361	TCTGAAGAAGTGGTCCTTGTACAAGCAGCAAGAGCGTAAGATGGAGAGGGACACCATCAG	420
118	L K K W S L Y K Q Q E R K M E R D T I R	137
421	GGCTATGCTAGAAGCCCAGCAGGAAGCTCTGGAGGAACTGCAACTGGAATCCCCGAAGCT	480
138	A M L E A Q Q E A L E E L Q L E S P K L	157
481	CCATGCTGAGGCCATCAAGCGGGATCCTAACCTGTTCCCTTTGAGAAGGAAGGGCCACA	540
158	H A E A I K R D P N L F P F E K E G P H	177
541	TTACACACCACCGATCCCTAACTACCAACCCCCTGAAGGCAGGTACAATGACATCACCAA	600
178	Y T P P I P N Y Q P P E G R Y N D I T K	197
601	GGTGTACACACAAGTGGAGTTTAAGAGATAGacttgcaggctgctatccttaacatgctg	660
198	V Y T Q V E F K R *	217
661	cccctgagagtaggaatgaccaggggttcaagtctgccttccacagaatcaggcatgctgt	720
721	<u>taataaa</u> tctggtttaatcaaaaaaaaaa 750	

Abbildung 16 : Nukleotid und Aminosäuresequenz von URIM. Nicht-kodierende Bereiche sind in kleinen Buchstaben dargestellt, der kodierende Bereich in Großbuchstaben. Die entsprechende Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt. Das putative "nuclear localisation signal" ist dunkel unterlegt. Das putative Polyadenylierungssignal ist unterstrichen.

3.4.2. Expressionstudien

Die Expression von URIM in verschiedenen Geweben und Zelllinien wurde mit Hilfe von Northern-Blot Analysen untersucht. Dazu wurde das aus dem Differential Display isolierte cDNA-Fragment als Sonde verwendet.

3.4.2.1. Gewebespezifische Expression von URIM

Die gewebespezifische Expression von *URIM* wurde mit Hilfe von verschiedenen "Multiple-Tissue-Northern-Blots" (Clontech) untersucht (s. Abbildung 17).

Die mRNA von *URIM* konnte in allen untersuchten Geweben, wenngleich in unterschiedlichen Mengen, nachgewiesen werden. Schwache Expression von *URIM* wurde im Gehirn, der Plazenta, Lunge, Milz und im Dickdarm gefunden. Im Herz, Ovar und der Leber wurde eine starke Expression von Urim mRNA detektiert.

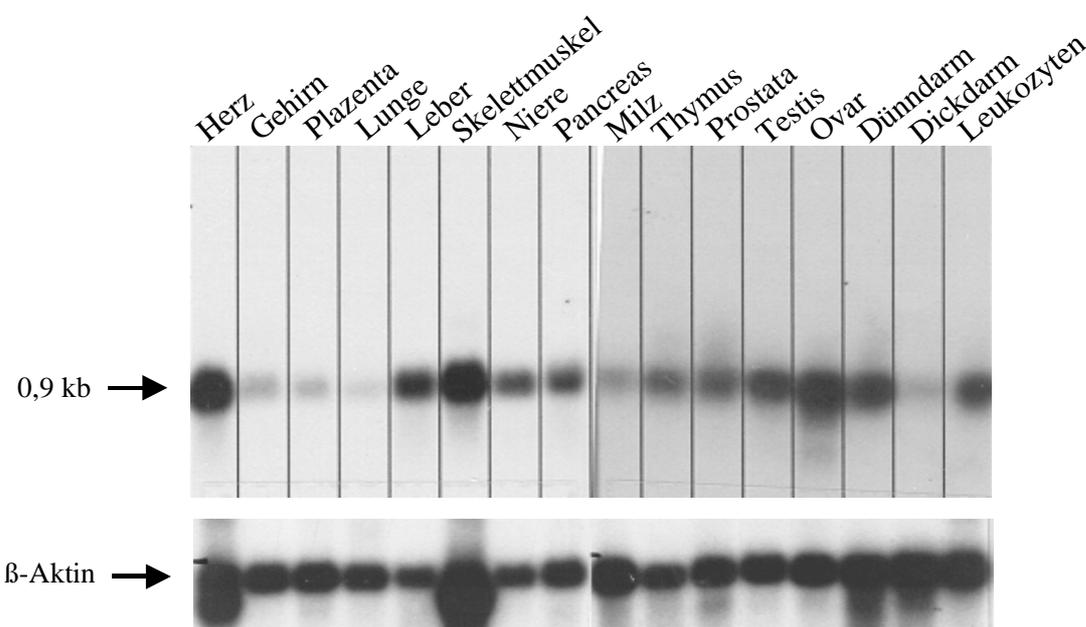


Abbildung 17 : Gewebespezifisches Expressionsmuster von *URIM*. Für diese Analyse wurden die MTN-Blots von Clontech verwendet. Je 2 µg mRNA wurden in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α -[32 P]-markierten *URIM*-spezifischen Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α -[32 P]-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

Die Expression von *URIM* in verschiedenen Tumor-Zelllinien wurde mit den "Human Cancer Cell Line Multiple Tissue Northern (MTN) Blot" untersucht (s. Abbildung 18).

In den verschiedenen Tumor-Zelllinien wurde eine ubiquitäre Expression von *URIM* gefunden. *URIM* ist in den permanenten Leukämie-Zelllinien HL-60, K-562, und Raji als auch in Zelllinien verschiedener solider Tumore (SW-480, A549, HeLa S3 und G361) stark exprimiert. Nur schwach wird *URIM* in der permanenten Leukämie-Zelllinie Molt-4 exprimiert.

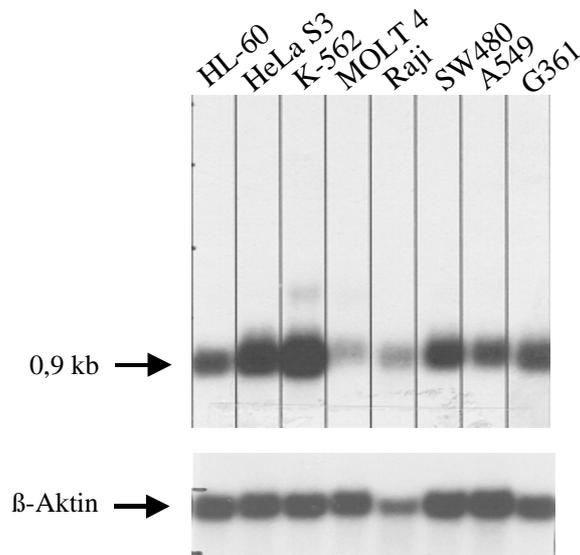


Abbildung 18: Expressionsmuster von *URIM* in verschiedenen Tumor-Zelllinien. Für diese Analyse wurde der MTN-Blot C von Clontech verwendet. Je 2 μg mRNA wurden in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α - $[^{32}\text{P}]$ -markierten *URIM*-spezifischen Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α - $[^{32}\text{P}]$ -markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

3.4.2.2. Expression in Mammakarzinom-Zelllinien

Um festzustellen ob die Expression von *URIM* mit dem Metastasierungspotential von Zelllinien anderer Tumortypen korreliert, wurden die Northern-Experimente auf verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien ausgeweitet (s. Abbildung 19).

Eine schwache Expression wurde in normalen humanen Epithelzellen der Milchdrüse (HMEC) und in zwei Primärtumor-Zelllinien (WA, AR), festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde in drei Zelllinien von Knochenmarkmikrometastasen (KM22, HG15, 1590) und einer metastasierenden Zelllinie aus Aszites (KS), eine bis zu 17-fache Überexpression von *URIM* gefunden. *URIM* Expression scheint auch mit dem Metastasierungsverhalten beim Mammakarzinom zu korrelieren.

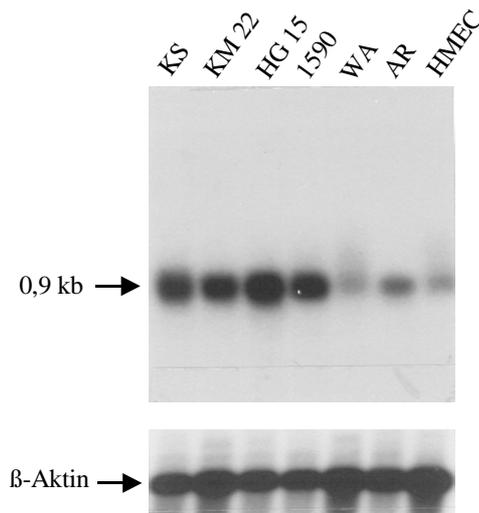


Abbildung 19: Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von URIM in einem Panel von Mammkarzinom-Zelllinien. Je 1 µg mRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α -[32 P]-markierten URIM-Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α -[32 P]-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

3.4.3. Charakteristika des putativen Proteins von URIM

Das putative Protein besteht aus 206 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 24,5 kD. Die Aminosäurezusammensetzung ist wie folgt:

Aminosäuren	Anzahl	%	% Gewicht
Alanin	12	5.8	3.5
Cystein	0	0.0	0.0
Asparaginsäure	7	3.4	3.3
Glutaminsäure	25	12.1	13.2
Phenylalanin	7	3.4	4.2
Glycin	4	1.9	0.9
Histidin	3	1.5	1.7
Isoleucin	10	4.9	4.6
Lysine	22	10.7	11.5
Leucin	26	12.6	12.0
Methionin	4	1.9	2.1
Asparagin	3	1.5	1.4
Prolin	16	7.8	6.3
Glutamin	13	6.3	6.8
Arginin	19	9.2	12.1
Serin	9	4.4	3.2
Threonin	13	6.3	5.4
Valin	5	2.4	2.0
Tryptophan	3	1.5	2.3
Tyrosin	5	2.4	3.3

3.4.3.1. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes, d.h. die Bestimmung des pH-Wertes, bei dem ein geladenes Molekül in Lösung keine elektrische Ladung besitzt, wurde das Programm Isoelectric (Oxford Molecular Group, Inc.) verwendet.

Der isoelektrische Punkt des putativen Proteins Urim beträgt 10,4 und liegt damit im stark basischen Bereich.

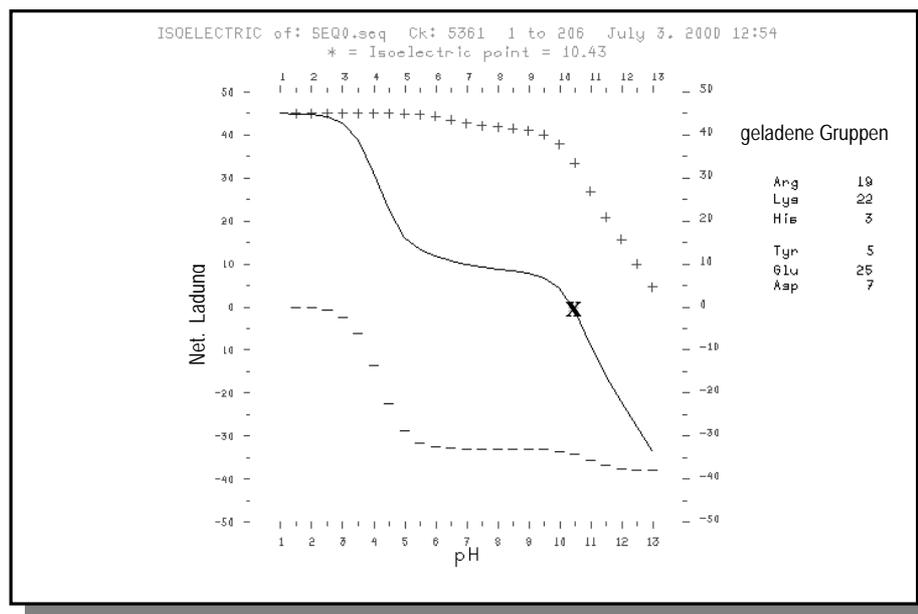


Abbildung 20: Bestimmung des isoelektrischen Punktes für das putative Protein URIM. Das X auf der Kurve symbolisiert den Punkt (pH-Wert) an dem die Nettoladung des Proteins null ist.

3.4.3.2. Identifizierung sonstiger Motive:

In der Aminosäuresequenz von Urim wurde mit dem Analyse-Programm pSort II ein putatives Nukleäres Lokalisations Signal (PLRKKKKVDPKDKQEAERLK) gefunden. Dabei handelt es sich um ein sogenanntes "bipartite nuclear localisation signal". Zuerst wurde dieses Signal in *Xenopus* Nucleoplasmin (Robbins *et al.*, 1991) beschrieben. Das Muster besteht aus 2 basischen Aminosäuren (AS), 10 dazwischenliegenden AS und einer weiteren basischen Region bestehend aus mindestens 3 basischen AS von 5 AS. Nach dem Vorhersageprogramm pSort II, liegt die Wahrscheinlichkeit einer nukleären Lokalisation bei 84%. In dem Protein konnten bislang keine weiteren Signale, Motive und Domänen identifiziert werden.

3.4.4. Homologien

Bei Datenbankrecherchen wurde ein homologes murines Protein (Accession Nr. AF034092) gefunden. Die Homologie über das gesamte Protein beträgt 75%, wobei die ersten 30 Aminosäuren zu 39% identisch sind, während der Rest des Proteins stark konserviert zu sein scheint (81%). Auch die Position und Sequenz des putativen "nuclear localisation signal" ist konserviert. Auf Aminosäureebene besteht eine ca. 77%ige Homologie.

```

1  MTASVLRSLISLALRPTSGLLGTWQTQLRETHQRASLLSFWELIPMRSEPL 50
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
1  MATGVMLCAARALRPRSUIPGTCQAHVRHTRHQRASLLAFWDLIPMRAEPL 50

51  RKKKKVDPKDKQEAKERLKRIRKLEKATQELIPIEDFITPLKFLDKKARE 100
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
51  RKKKKVDPKDKQAADRLKRIRKLEKASQELIPIEDFITPVRFLDKSRQ 100

101 RPQVELTFEETERRALLLKKWSLYKQQERKMERDTIRAMLEAQQEAL EEL 150
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
101 RPQEEHSPEESERRALLLKRWALFKQEQHEMERDAIRSMLEAQQEAL EEL 150

151 QLESPKLHAEAIKRDPNLFPFKEGPHYTPPIPNYQPPEGRYNDITKVYT 200
  . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
151 KLESAELYAEAIKRDTSLFPFEKEGPHYTPPISNYQAPEGRYNDITKVYK 200

201 QVEFKR 206
  | | | | |
201 QVEFKR 206

```

Abbildung 21: Vergleich der humanen (oben) und murinen- (unten) Aminosäuresequenz. Identische Aminosäuren sind durch vertikale Striche dargestellt. Aminosäureaustausche sind durch einen (nicht-konservativ) oder durch zwei (konservativ) Punkte dargestellt. Die konservierte Sequenz für das "nuclear localisation signal" ist dunkel unterlegt.

3.4.5. Charakterisierung der genomischen Sequenz von URIM

Anhand eines genomischen Klons (Human Chromosome 22q11 Cosmid Clone 102g9, Accession Nr. Ac 000068), konnte die genomische Sequenz und Lokalisation bestimmt werden. Die Exon-Intron Struktur des Gens konnte mit Hilfe dieses Klons ermittelt werden. In den Exon Bereichen wurde eine 100%ige Homologie zwischen der URIM cDNA und der Sequenz des genomischen Klons gefunden. Exon 1 entspricht den Nukleotiden 1-63, Exon 2 den Nukleotiden 64-148, Exon 3 den Nukleotiden 149-308 und Exon 4 den Nukleotiden 309-748 der URIM cDNA. Alle Exon/Intron Grenzen folgen der GT/AG Regel. Die Gesamtlänge des Gens beträgt 3531 bp.

3.4.6. Charakterisierung des chromosomalen Locus

Die chromosomale Lokalisation konnte anhand der zu URIM homologen EST Sequenzen (D60871 und W49836) und des genomischen Klons (Accession Nr. Ac 000068), mit dem Programm GeneMap'99 (NCBI) bestimmt werden. Das Gen liegt auf dem Chromosom 22q11, in der sogenannten "DiGeorge Critical Region". Das putative Startcodon von *URIM* liegt nur ca. 1100 bp vom Startcodon des Gens *HIRA* entfernt. Die dazwischenliegende Sequenz ist extrem GC-reich. Die beiden Gene liegen in unterschiedlicher Transkriptionsrichtung.

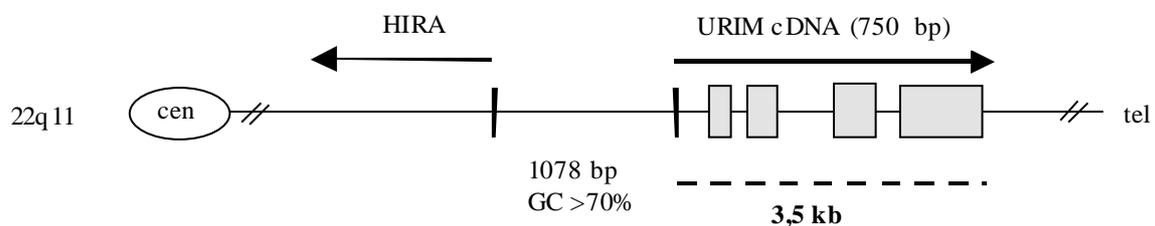


Abbildung 22: Schematische Darstellung der genomischen Lokalisation von *URIM* und *HIRA*. Die Exons von *URIM* sind als unterlegte Kästchen dargestellt. Von links nach rechts ist Exon 1 bis Exon 4 gezeigt. Die gestrichelte Linie zeigt die Größe des Gens. Richtung Centromer wird als *cen* und Richtung Telomer als *tel* bezeichnet.

3.5. Identifizierung eines neuen, putativen Tumorsuppressor Gens THW

3.5.1 Identifizierung mittels Differential Display

In der Differential Display Analyse wurde mit Hilfe der Primerkombination H-T₁₁A und AP20 (s. 2.2.3.7.) ein 301 bp großes cDNA Fragment amplifiziert, anschließend aus dem Gel isoliert und weiter analysiert. In einer Northern-Blot Analyse konnte eine Überexpression in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 gegenüber der metastasierenden Zelllinie NMCL-1, nachgewiesen werden (s. Abbildung 23). Anhand des Northern-Blot Ergebnisses konnte die Größe des Transkripts (ca. 2,0 kb) bestimmt werden.

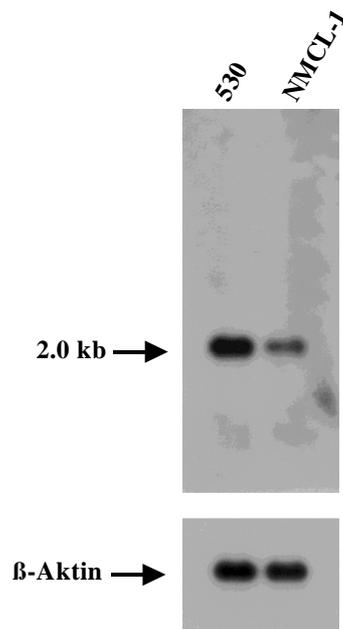


Abbildung 23: Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von THW in den Zelllinien 530 und NMCL-1. Je 1 μg mRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α - $[^{32}\text{P}]$ -markierten THW-Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α - $[^{32}\text{P}]$ -markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

3.5.2. Isolierung der vollen Länge cDNA

Ausgehend von der Sequenzinformation des aus dem Differential Display gewonnenen 301 bp Fragments, wurde versucht in öffentlichen- (EMBL) und nicht-öffentlichen- (INCYTE-Pharmaceutical) Datenbanken homologe Sequenzen zu ermitteln. Dabei ergaben sich Homologien zu verschiedenen ESTs („*expressed sequence tags*“).

Letztlich konnte mit Hilfe von 9 überlappenden EST-Sequenzen aus der EMBL-Datenbank eine 1890 bp lange Konsensus Sequenz generiert werden (s. Abbildung 21) Im Überlappungsbereich waren die EST-Sequenzen jeweils zu 100% homolog.

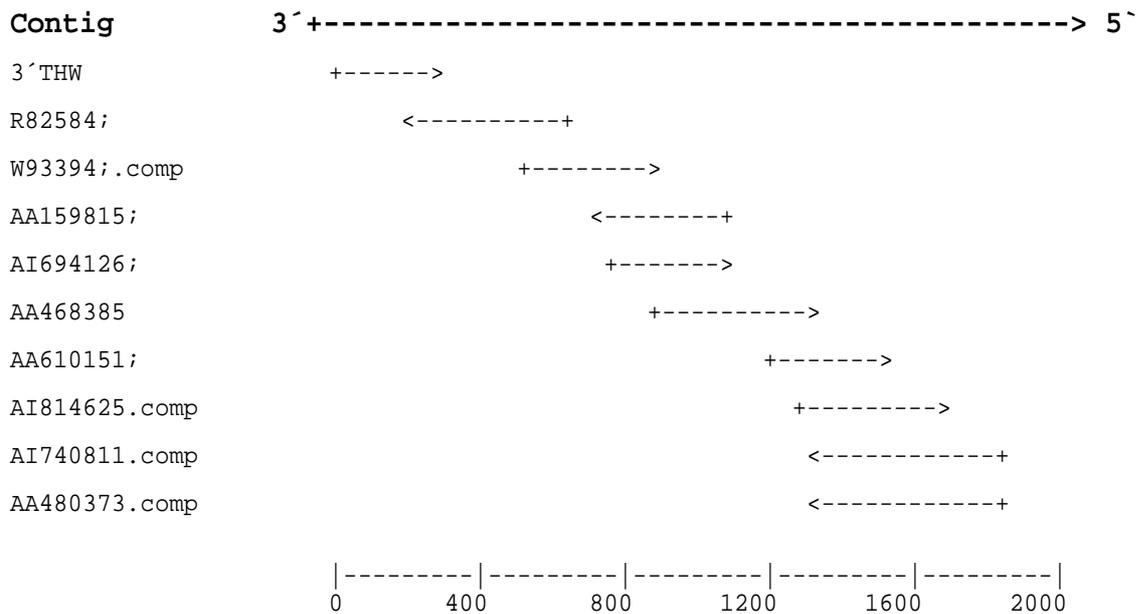


Abbildung. 21: Generierung der THW-Konsensus-Sequenz mit Hilfe von 9 überlappenden ESTs aus der EMBL Datenbank. Die jeweiligen Accession-Nummern der EST-Sequenzen stehen links am Rand. Die generierte Konsensus-Sequenz (Contig) ist in 3'→5'Richtung ganz oben dargestellt. Unten ist die Größe der Sequenz in bp angegeben.

Um diese Konsensus-Sequenz experimentell zu bestätigen, wurde die Sequenz als Grundlage zur Konzeption einer RT-PCR herangezogen. Der Primer 312rev1 (5'AAATCCCCGAA-TTCTCCTGTGG3') für die Erststrang cDNA Synthese, konnte anhand der Sequenzinformation des Differential Display Fragments konzipiert werden. Die anschließende PCR Reaktion wurde mit dem Primer 312rev1 und einem am 5'Ende der generierten Konsensus-Sequenz liegenden Primer 312f6 (5'ACCCGCTCCGC-TCCGCTC3') durchgeführt (s. 2.2.4.3.). Die synthetisierte cDNA wurde kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenzanalyse der vollständigen cDNA ergab 1890 Nukleotide mit einer 5'UTR von 37 bp. Die 5'UTR ist sehr GC-reich. Sie besteht zu 83,7% aus Guanin und Cytosin. Der kodierende Bereich umfasst 579 bp und kodiert für ein putatives Protein von 193 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 21,3 kDa. Die 3'UTR umfasst 1274 bp. Ein putatives Polyadenylierungssignal (AATAAA) (Simonsen und Levinson, 1983) wurde zwischen den Nukleotiden 1855-1861 identifiziert. Ferner wurden fünf (ATTTA)-Instabilitätsmotive in der 3'UTR gefunden. Die Sequenz wurde in der EMBL Datenbank mit der Accession-Nummer AJ251830 hinterlegt.

```

1      CCGCTCCGCTCCGCTCGGCCCGCGCCCGCCCGTCAACATGATCCGCTGCGGCCTGGCCTG
1      M I R C G L A C
61     CGAGCGCTGCCGCTGGATCCTGCCCTGCTCCTACTCAGCGCCATCGCCTTCGACATCAT
9      E R C R W I L P L L L L S A I A F D I I
121    CGCGCTGGCCGGCCGCGGCTGGTTGCAGTCTAGCGACCACGGCCAGACGTCTCTCGTGTG
29     A L A G R G W L Q S S D H G Q T S S L W
181    GTGGAAATGCTCCCAAGAGGGCGGCGGCAGCGGGTCTACGAGGAGGGCTGTCAGAGCCT
49     W K C S Q E G G G S G S Y E E G C Q S L
241    CATGGAGTACGCGTGGGGTAGAGCAGCGGCTGCCATGCTCTTCTGTGGCTTCATCATCCT
69     M E Y A W G R A A A A M L F C G F I I L
301    GGTGATCTGTTTTATCCTCTCCTTCTTCGCCCTCTGTGGACCCAGATGCTTGTCTTCTCT
89     V I C F I L S F F A L C G P Q M L V F L
361    GAGAGTGATTGGAGGTCTCCTTGCCTTGGCTGCTGTGTTCCAGATCATCTCCCTGGTAAT
109    R V I G G L L A L A A V F Q I I S L V I
421    TTACCCCGTGAAGTACACCCAGACCTTCACCCTTCATGCCAACSTGCTGTCACTTACAT
129    Y P V K Y T Q T F T L H A N X A V T Y I
481    CTATAACTGGGCCTACGGCTTTGGGTGGGCAGCCACGATTATCTGATYGGCTGTGCCTT
149    Y N W A Y G F G W A A T I I L X G C A F
541    CTTCTTCTGCTGCCTCCCCAACTACGAAGATGACCTTCTGGGCAATGCCAAGCCAGGTA
169    F F C C L P N Y E D D L L G N A K P R Y
601    CTTCTACACATCTGCCTAACTTGGGAATGAATGTGGGAGAAAATCGCTGCTGCTGAGATG
189    F Y T S A *
661    GACTCCAGAAGAAGAAACTGTTTCTCCAGGCGACTTTTGAACCCATTTTTTGGCAGTGTTC
721    ATATTATTAAGTACTGCTAAAAATGCTAAAAATAATTTGGGAGAAAATATTTTTAAGTAGT
781    GTTATAGTTTCATGTTTATCTTTTATTATGTTTTGTGAAGTTGTGTCTTTTCACTAATTA
841    CCTATACTATGCCAATATTTCTTATATCTATCCATAACATTTAATACTACATTTGTAAGA
901    GAATATGCACGTGAAACTTAACTTTATAAGGTAAAAATGAGGTTTCCAAGATTTAATA
961    ATCTGATCAAGTTCTTGTATTTCCAAATAGAATGGACTCGGTCTGTTAAGGGCTAAGGA
1021   GAAGAGGAAGATAAGTTAAAAGTTGTTAATGACCAAACATTTCTAAAAGAAATGCAAAAA
1081   AAAAGTTTTTTTTCAAGCCTTCGAACATTTAAGGAAAAGCAAAATCATTTCCTAAATGCA
1141   TATCATTTGTGAGAATTTCTCATTAATATCCTGAATCATTTCATTTTCAGCTAAGGCTTCAT
1201   GTTGACTCGATATGTCATCTAGGAAAGTACTATTTTCATGGTCCAAACCTGTTGCCATAGT
1261   TGGTAAGGCTTTCTTTAAGTGTGAAATATTTAGATGAAATTTTCTCTTTTAAAGTTCTT
1321   TATAGGTTAGGGTGTGGGAAAATGCTATATTAATAAATCTGTAGTGTFTTTGTGTTTATA
1381   TGTTCCAGAACCAGAGTAGACTGGATTGAAAGATGGACTGGGTCTAATTTATCATGACTGA
1441   TAGATCTGGTTAAGTTGTGTAGTAAAGCATTAGGAGGGTCATTCTTGTACAAAAAGTGCC
1501   ACTAAAACAGCCTCAGGAGAATAAATGACTTGCTTTTCTAAATCTCAGGTTTATCTGGGC
1561   TCTATCATATAGACAGGCTTCTGATAGTTTGAACCTGTAAGCAGAAACCTACATATAGTT
1621   AAAATCCTGGTCTTTCTTGGTAAACAGATTTTAAATGTCTGATATAAAACATGCCACAGG
1681   AGAATTCGGGATTTGAGTTTCTCTGAATAGCATATATATGATGCATCGGATAGGTCATT
1741   ATGATTTTTTACCATTTTCGACTTACATAATGAAAACCAATTCATTTTAAATACAGATTA
1801   TTATTTTGTAAAGTTGTGGAAAAAGCTAATTGTAGTTTTCATTATGAAGTTTTCCTCCAAATAA
1861   ACCAGGTATTCTAAAAAATAAAAAAAAAA

```

Abbildung 22 : Nukleotid und Aminosäuresequenz von THW. Die entsprechende Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt. Die putativen Transmembranbereiche sind dunkel unterlegt. Das putative Polyadenylierungssignal ist fett und unterstrichen. Instabilitätsmotive (ATTTA) sind unterstrichen.

3.5.3. Charakterisierung des putativen Proteins

Die Charakterisierungen und Vorhersagen zur Sekundärstruktur des putativen Proteins von THW führte zur Identifizierung folgender Merkmale:

3.5.3.1. Bestimmung der Protein-Zusammensetzung und des Molekulargewichts

Aminosäuren	Anzahl	%	% Gewicht
Alanin	22	11.5	7.3
Cystein	11	5.7	5.3
Asparaginsäure	4	2.1	2.2
Glutaminsäure	6	3.1	3.6
Phenylalanin	14	7.3	9.7
Glycin	18	9.4	4.8
Histidin	2	1.0	1.3
Isoleucin	17	8.9	9.0
Lysin	3	1.6	1.0
Leucin	25	13.0	13.3
Methionin	4	2.1	2.5
Asparagin	4	2.1	2.1
Prolin	5	2.6	2.3
Glutamin	7	3.6	4.2
Arginin	7	3.6	5.1
Serin	12	6.2	4.9
Threonin	7	3.6	3.3
Valin	7	3.6	3.3
Tryptophan	7	3.6	6.1
Tyrosin	10	5.2	7.7

Das Protein besitzt demnach ein Molekulargewicht von 21,3 kD und einen isoelektrischen-Punkt von 6,97.

3.5.3.2. Identifizierung der Sekundärstruktur:

Mit Hilfe des Programmes TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0/>) das zu Vorhersagen von Sekundärstrukturen dient, konnten vier Transmembranhelices identifiziert werden.

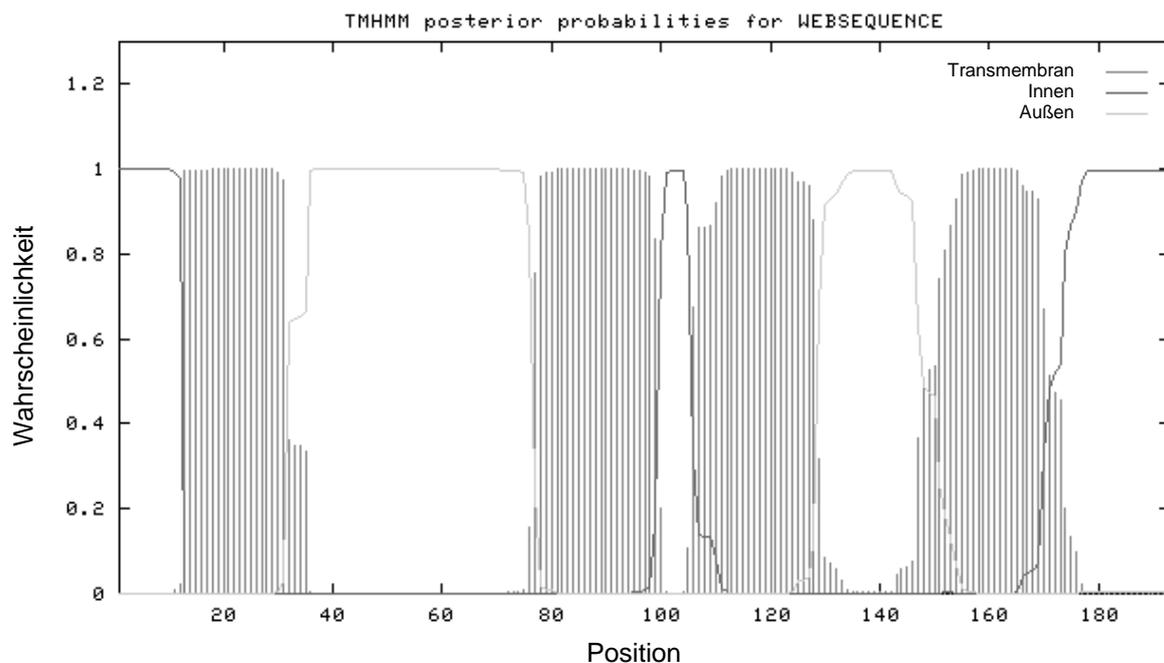


Abbildung 23: Ergebnis des Transmembran-Vorhersageprogramms TMHMM (s. Material und Methoden) Die Transmembranbereiche sind durch eine vertikale Schraffierung dargestellt. Auf der X-Achse sind die Aminosäurepositionen im Protein dargestellt, auf der Y-Achse die entsprechende Wahrscheinlichkeit.

Aufgrund dieser Vorhersage kann folgende, putative Sekundärstruktur des Proteins angenommen werden. Es wird eine Vier-Transmembran-Topologie vorgeschlagen (s. Abbildung 24), bestehend aus zwei extrazellulären Domänen (45 Aminosäuren und 18 Aminosäuren), vier hydrophoben Transmembrandomänen (19, 24, 23 und 23 Aminosäuren) und drei zytoplasmatischen Domänen (12, 6 und 24 Aminosäuren). Das Amino- und das Carboxyterminale-Ende ragt dabei in das Zytoplasma.

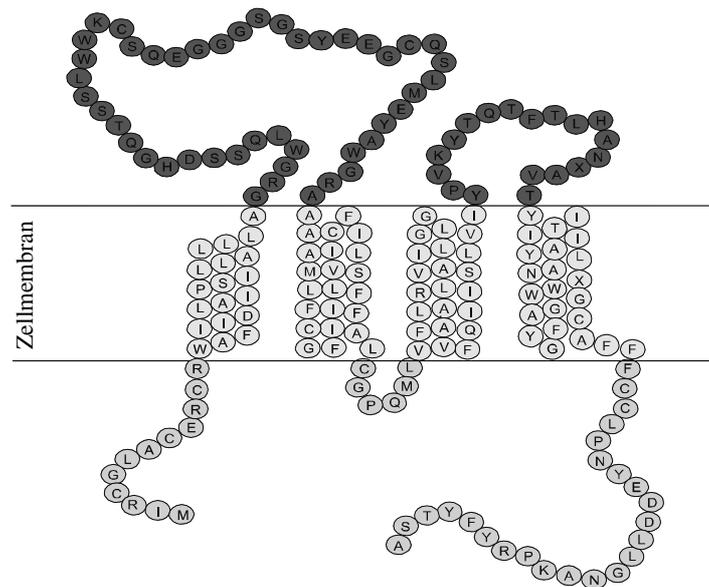


Abbildung 24: Putative Topologie des THW Proteins in einer Phospholipid-Doppelschicht. Das Protein hat vier Transmembranndomänen, zwei extrazelluläre Domänen, sowie drei intrazelluläre Domänen. Das Amino- und das Carboxyterminale-Ende ragt in das Zytoplasma.

3.5.4. Expressionsanalysen von THW

Die Expressionsanalysen wurden mit einer ca. 1600 bp großen DNA-Sonde von THW durchgeführt. Es wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Metastasierungspotential von humanen Melanoma-Zelllinien in der Nacktmaus und der Expressionsstärke von *THW* besteht (s. Abbildung 25). Die stärkste Expression wurde in der nicht metastasierenden Zelllinie 530 nachgewiesen, die schwächste Expression wurde in den stark metastasierenden Zelllinien BLM und MV3 gefunden. Eine mittelstarke Expression wurde in den Zelllinien (IF6m, NMCL-1, Mel57, M14, MV-1 und IF6) mit mittelstarkem Metastasierungspotential gefunden. Dieses Ergebnis zeigt eine klare Korrelation zwischen Herunterregulierung des Gens *THW* und dem Metastasierungspotential der untersuchten humanen Melanoma-Zelllinien in der Nacktmaus.

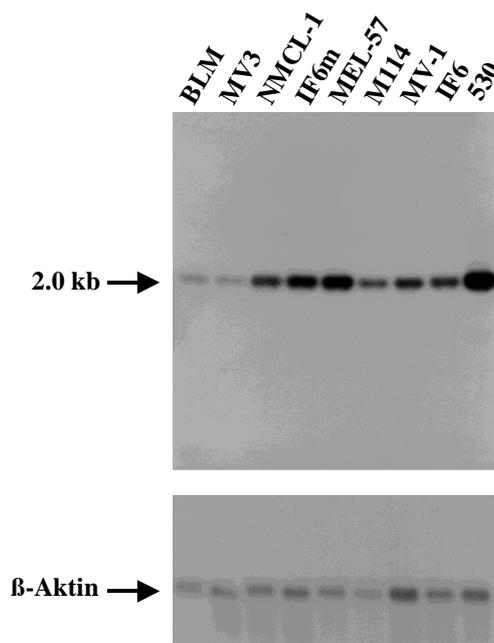


Abbildung 25: Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von *THW* in einem Panel von Melanoma-Zelllinien. Je 1 μ g mRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α - 32 P-markierten *THW*-Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α - 32 P-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

Diese Expressions-Analysen von *THW* wurden auf 6 verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien sowie auf nicht maligne Zellen ausgeweitet (s. Abbildung 26). Es handelte sich dabei um normale humane Epithelzellen aus der Milchdrüse (HMEC), zwei Zelllinien die von Primärtumoren abstammen (WA und AR), drei Zelllinien die von Knochenmarkmikrometastasen abstammen (KM22, HG15, 1590) und einer Zelllinie aus einem malignem Aszites (KS).

Mit Ausnahme der Zelllinie WA, zeigen alle anderen Mammakarzinom-Zelllinien eine signifikante Herunterregulierung der Expression von *THW*. Die Expression von Gen *THW* scheint auch in der Pathogenese des Mammakarzinoms eine Rolle zu spielen.

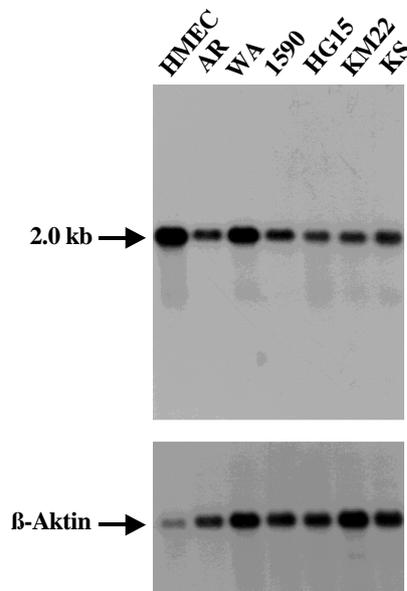


Abbildung 26: Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von *THW* in einem Panel von Mammakarzinom-Zelllinien. Je 1 μg mRNA wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α - $[^{32}\text{P}]$ -markierten *THW*-Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α - $[^{32}\text{P}]$ -markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

Die Expressionsstärke von *THW* in verschiedenen Tumoren (Brust-, Uterus-, Cervix- und Ovarialkarzinom) wurde mit der Expressionsstärke in den entsprechenden Normalgeweben des selben Patienten verglichen (s. Abbildung 27).

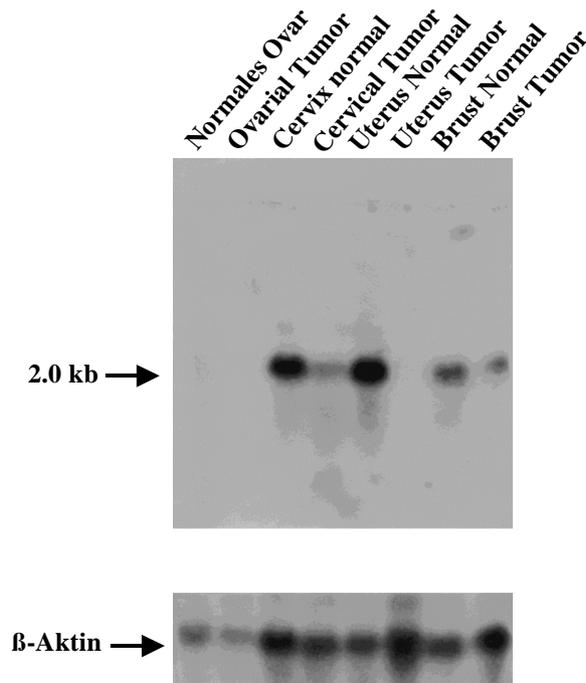


Abbildung 27: Northern-Blot Analyse: Differentielle Expression von *THW* in einem "human Tumor Panel Blot" (Invitrogen). Es wurde jeweils 20 µg Gesamt-RNA, isoliert aus Normalgewebe, neben RNA, isoliert aus dem Tumor, aufgetragen. Diese wurden in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer α -[32 P]-markierten *THW*-Sonde hybridisiert (s. Material und Methoden). Tumor und Normalgewebe stammten jeweils vom selben Patienten. Zur internen Kontrolle wurde der Blot mit einer α -[32 P]-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert.

Das gewebespezifische Expressionsmuster von *THW* wurde mit Hilfe eines "Multiple Tissue Expression (MTETM) Array" von Clontech (s. Abbildung 28) bestimmt.

Mit Ausnahme des Burkitt's Lymphoma Raji, Burkitt's Lymphoma Daudi und der leukämischen Zelllinie HL-60 konnte eine ubiquitäre Expression festgestellt werden.

Die Expression in einigen Geweben (verschiedene Hirnareale, Skelettmuskel, Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Colon descendens, Leukozyten, Lymphknoten, Knochenmark, Testis, Ovar, fötales Hirn und fötale Milz) und einer leukämischen Zelllinie (Leukemia MOLT-4) ist sehr schwach. Mittelstarke Expression wurde in den folgenden Geweben und Zelllinien nachgewiesen: Glandula Pituitara, den verschiedenen Herzkompartmenten, Wirbelsäule, gastrointestinalen Organen, Niere, Thymus, Lunge, Blase, Uterus, Leber, Pankreas, Nebennierenrinde, Schilddrüse, Speicheldrüse, Milchdrüse, HeLa S3, Leukemia K-562, Colorectales Adenokarzinom SW480, Lungenkarzinom A549, fötales Herz, fötale Niere, fötale Leber, fötaler Thymus und fötale Lunge. Eine sehr starke Expression wurde im Ösophagus und in der Trachea gefunden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gehirn	Cerebellum links	Substantia nigra	Herz	Ösophagus	Colon Transversum	Niere	Lunge	Leber	Leukemia HI-60	Fötales Gehirn	Hefe Ges. RNA
B	Cerebraler Cortex	Cerebellum rechts	Nucleus Accumbens	Aorta	Magen	Colon descendens	Skelettmuskel	Placenta	Pancreas	HeLa S3	Fötales Herz	Hefe tRNA
C	Lobus Frontalis	Corpus Callosum	Thalamus	Artrium links	Duodenum	Rectum	Milz	Blase	Nebennierenrinde	Leukemia K-562	Fötale Niere	E.coli rRNA
D	Lobus Parietalis	Amygdalae	Glandula Pituitaria	Artrium rechts	Jejunum		Thymus	Uterus	Schilddrüse	Leukemia MOLT4	Fötale Leber	E.coli DNA
E	Lobus Occipitalis	Nucleus Caudatus	Wirbelsäule	Ventrikel links	Ileum	Kontroll RNA 100ng	Leukozyten	Prostata	Speicheldrüse	Burkitt's Lymphoma Raji	Fötale Milz	Poly r(A)
F	Lobus Temporalis	Hippocampus		Ventrikel rechts	Ileozäkum		Lymphknoten	Testis	Milchdrüse	Burkitt's Lymphoma Daudi	Fötaler Thymus	Humane Cot-1 DNA
G	p.g.* des Cortex	Medulla Oblongata		Septum Interventriculare	Appendix		Knochenmark	Ovar		Adenocarcinom SW480	Fötale Lunge	Humane DNA 100ng
H	Pons	Putamen		Apex (Herz)	Colon Ascendens	Kontroll RNA 500ng	Trachea			Lungen carcinoma A549		Humane DNA 500ng

*Paracentral gyrus

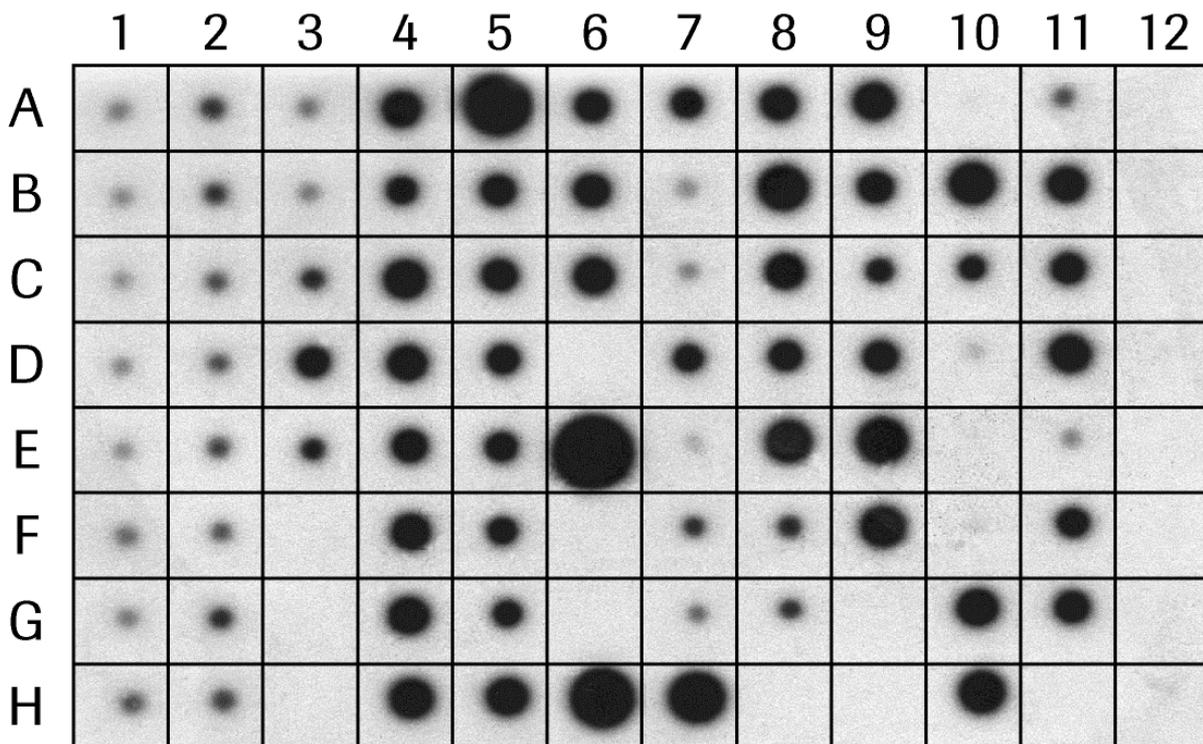


Abbildung 28: "Multiple Tissue Expression Array" (MTE; Clontech): Die Expressionsstärke von THW wurde in einem großen Spektrum an fötalen und adulten Geweben, sowie in Tumor-Zelllinien untersucht. Der MTE Blot enthält 76 gewebespezifische Poly-(A⁺)-RNAs.

3.5.5. Homologievergleiche

Es konnten weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäureebene Homologien zu humanen Genen oder Proteinen gefunden werden.

Das zu *THW* homologe Gen aus der Maus (*PERP*) wurde erst kürzlich veröffentlicht (Attardi *et al.*, 2000). Über die gesamte Länge der cDNAs haben *THW* und *PERP* eine Homologie von 72,5%. Die Homologie im kodierenden Bereich beträgt 86,5% während die Homologie in der 5'UTR nur 65,6% beträgt. Auf Aminosäureebene besteht eine 90,2%ige Homologie zwischen den beiden Proteinen (s. Abbildung 29). Dies deutet auf eine hohe Konservierung der Sequenz im kodierenden Bereich hin.

```

      .           .           .           .           .
THW   1  MIRCGLACERCRWILPLLLLLSAIAFDIIALAGRGWLQSSDHGQTSSLWVK
      |:|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||. | ||||| |:
PERP  1  MLRCGLACERCRWILPLLLLLSAIAFDIIALAGRGWLQSSNHIQTSSLWWR

      .           .           .           .           .
THW   51 CSQEGGGSGSYEEGCQSLMEYAWGRAAAAMLFCGFIILVICFILSFFALC
      | ||||| |: ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
PERP  51 CFDEGGGSGSYDDGCQSLMEYAWGRAAAATLFCGFIILCICFILSFFALC

      .           .           .           .           .
THW  101 GPQMLVFLRVIGLLALAAVFQIIISLVIYPVKYTQFTLHANKAVTYIYN
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
PERP  101 GPQMLVFLRVIGLLALAAIFQIIISLVIYPVKYTQFRLHDNPAVNYIYN

      .           .           .           .           .
THW  151 WAYGFGWAATIILIGCAFFFCCLPNYEDDLLGNAKPRYFYTSA
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
PERP  151 WAYGFGWAATIILIGCSFFFCCCLPNYEDDLLGAAKPRYFYPPA.

```

Abbildung 29: Vergleich der humanen Aminosäuresequenz *THW* und der murinen Sequenz *PERP*. Identische Aminosäuren sind durch vertikale Striche dargestellt. Aminosäureaustausche sind durch einen (nicht-konservativ) oder durch zwei (konservativ) Punkte dargestellt.

3.5.6. Genomische Lokalisation des Gens *THW*

Durch Datenbank (EMBL) Homologievergleiche konnten mehrere, zu *THW* homologe ESTs, (s. 3.5.2) sowie ein genomischer Klon identifiziert werden. Mit Hilfe des Programmes Gene Map'99 (NCBI) konnten diese homologen Sequenzen genomisch lokalisiert werden. Ein homologes EST (AA480373) sowie ein genomischer Klon (AL023582) stammten von dem langen Arm des Chromosoms 6 ab. Die Sequenzen liegen dabei im Intervall D6S472 bis D6S453.

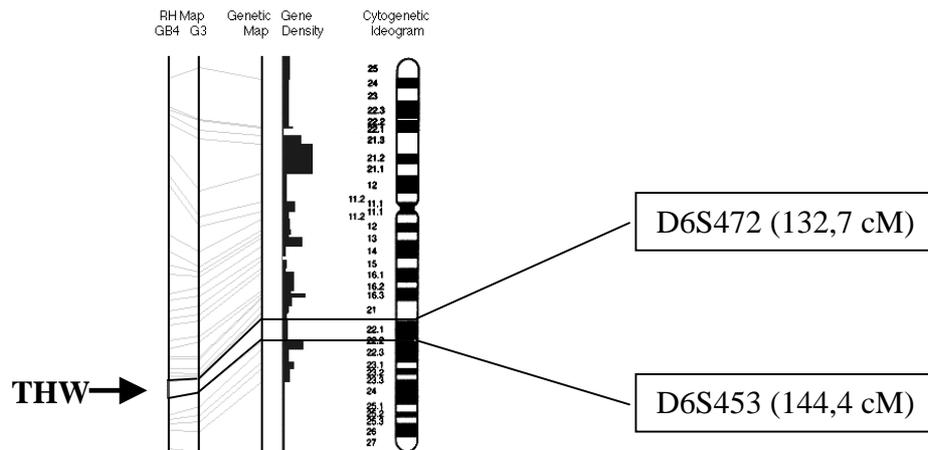


Abbildung 30: Genomische Lokalisation des Gens *THW*. Dargestellt ist ein Ideogramm des humanen Chromosom 6. *THW* liegt zwischen den Markern *D6S472* und *D6S453*.

3.5.7. LOH Untersuchungen am Chromosom 6q

Für eine Vielzahl von Tumoren wurden karyotypische Veränderungen am langen Arm von Chromosom 6 bereits beschrieben. So wurde LOH für diese Region schon für das maligne Melanom (Healey *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1996; Trent *et al.*, 1990; Ray *et al.*, 1996), Prostata- (Srikantan *et al.*, 1999), Pankreas- (Griffin *et al.*, 1995), Uterus- (Huettner *et al.*, 1998) und das Mammakarzinom (Bilanges *et al.*, 1999) beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Prävalenz von LOH in dem Bereich der genomischen Lokalisation von *THW* (zwischen *D6S292* und *D6S1684*) bestimmt werden. Die Untersuchungen wurden an Melanoma-Tumorbiopsien und an verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Um die Größe der deletierten Bereiche auf dem Chromosom 6q zu bestimmen, wurden 7 polymorphe Mikrosatelliten-Marker, die den langen Arm des Chromosoms abdecken, verwendet.

3.5.7.1. LOH Untersuchungen an Zelllinien

Mit Hilfe von 7 polymorphen Mikrosatelliten-Markern (s. 2.2.8.1.), die auf dem langen Arm von Chromosom 6 lokalisiert sind, wurde die Prävalenz (mit *D6S292* und *D6S1684*) und die Größe der Deletionen bei verschiedenen Zelllinien bestimmt. Es wurden 7 Pankreaskarzinom-, 10 Melanoma-, 16 Mammakarzinom-, 3 Ovarialkarzinom-, 3 Prostatakarzinom-, 2 Zervixkarzinom-, und 3 Kolonkarzinom-Zelllinien untersucht. LOH für den Marker *D6S292* wurde in 52,7%, und für den Marker *D6S1684* in 50,6% aller Tumor-Zelllinien gefunden. Im

einzelnen: In 7 von 7 Pankreas-Zelllinien wurde ein LOH bei D6S1684 gefunden (s. Tabelle 6). Außer der mittelstark-metastasierenden Zelllinie Mel 57, zeigten alle anderen metastasierenden Melanoma-Zelllinien ein LOH bei D6S292 und D6S1684. Normale Melanozyten und die nicht-metastasierende Zelllinie 530, zeigten in beiden Loci kein LOH (s. Tabelle 7). In allen drei Ovarialkarzinom-Zelllinien konnten beide Allele bei D6S292 und D6S1684 nachgewiesen werden (s. Tabelle 8). Eine Zelllinie einer benignen Prostata Hyperplasie zeigte beide Allele, während eine von zwei Prostatakarzinom-Zelllinien ein LOH aufwies (s. Tabelle 9). Es wurden 16 Mammakarzinom-Zelllinien und eine nicht-transformierte epitheliale Zelllinie (HMEC) auf Verlust der Heterozygotie untersucht (s. Tabelle 11). Dabei zeigten 10 der Zelllinien einen Verlust eines Allels. In einer von zwei Zervixkarzinom-Zelllinien (s. Tabelle 12), sowie in einer von drei Kolonkarzinom-Zelllinien (s. Tabelle 10) wurde ein Verlust der Heterozygotie festgestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass außer den Ovarialkarzinom-Zelllinien alle anderen Tumor-Zelllinien zu einem hohen Prozentsatz einen Verlust eines Allels im Bereich der genomischen Lokalisation von *THW* hatten. Die Größe des deletierten Bereiches reichte z.B. für die Zelllinie K16 von D6S472 bis D6S305 (s. Tabelle 6). Einen sehr kleinen deletierten Bereich hatte hingegen die Zelllinie LCC2. Hier waren nur die Loci D6S1684 und D6S308 (s. Tabelle 11) betroffen.

Tabelle 6: LOH Untersuchungen auf dem langen Arm von Chromosom 6. Untersucht wurden verschiedene Pankreas-Zelllinien (links) mit sieben verschiedenen Mikrosatelliten-Markern (oben). Der prozentuale Anteil an LOH für D6S292 und D6S1684 ist angegeben. o = kein LOH; • = loss of heterozygosity (LOH); leeres Kästchen = der entsprechende Locus wurde nicht untersucht.

	Zelllinie	S404	S472	S292	S1684	S308	S311	S305
Pankreas	K2	o		•	•	•	o	
	K7	o		•	•	•	•	
	K13	o	•	•	•	•	•	o
	K16	o	•	•	•	•	•	
	CAPAN-1	o		•	•	•	•	
	HUP-T3	o		o	•	•	•	
	PA-TU-8902	o		o	•	•	•	
LOH %				71,4	100			

Tabelle 7: LOH Untersuchungen auf dem langen Arm von Chromosom 6. Untersucht wurden verschiedene Melanoma-Zelllinien (links) mit sieben verschiedenen Mikrosatelliten-Markern (oben). Der prozentuale Anteil an LOH für D6S292 und D6S1684 ist angegeben o = kein LOH; • = loss of heterozygosity (LOH); ; x = nicht informativ; leeres Kästchen = der Locus wurde nicht untersucht.

Melanoma	Zellinie	S404	S472	S292	S1684	S308	S311	S305
	Melanozyten	o		o	o		o	
	530	o		o	o	o	o	
	IF6	o		•	•	o	•	
	MV1	o		•	•	•	•	
	M14	o	•	•	•	•	•	
	MEL57	o		o	x	o		
	IF6m	o		•	o	o	•	
	NMCL-1	o		•	•	•	•	
	MV3	o	•	•	•	•	•	
	BLM	o	•	•	•	•	•	o
LOH %			77,8	75,0				

Tabelle 8: LOH Untersuchungen auf dem langen Arm von Chromosom 6. Untersucht wurden verschiedene Ovarialkarzinoma-Zelllinien (links) mit sieben verschiedenen Mikrosatelliten-Markern (oben). Der prozentuale Anteil an LOH für D6S292 und D6S1684 ist angegeben o = kein LOH; • = loss of heterozygosity (LOH); x = nicht informativ; leeres Kästchen = der Locus wurde nicht untersucht.

Ovarialkarzinom	Zellinie	S404	S472	S292	S1684	S308	S311	S305
	EFO-21	o		o	o	x	o	
	EFO-27	o		o	o		o	
	COLO-704	o		o	o		o	
LOH %			0	0				

Tabelle 9: LOH Untersuchungen auf dem langen Arm von Chromosom 6. Untersucht wurden verschiedene Prostatakarzinoma-Zelllinien (links) mit sieben verschiedenen Mikrosatelliten-Markern (oben). Der prozentuale Anteil an LOH für D6S292 und D6S1684 ist angegeben o = kein LOH; • = loss of heterozygosity (LOH); leeres Kästchen = der entsprechende Locus wurde nicht untersucht.

Prostatakarzinom	Zellinie	S404	S472	S292	S1684	S308	S311	S305
	BM-1604	o		•	•		•	
	BPH-1	o		o	o	o	o	
	LNCAP	o		o	o		o	
LOH %			33,3	33,3				

Tabelle 10: LOH Untersuchungen auf dem langen Arm von Chromosom 6. Untersucht wurden verschiedene Kolonkarzinom-Zelllinien (links) mit sieben verschiedenen Mikrosatelliten-Markern (oben). Der prozentuale Anteil an LOH für D6S292 und D6S1684 ist angegeben o = kein LOH; • = loss of heterozygosity (LOH); leeres Kästchen = der entsprechende Locus wurde nicht untersucht.

Kolon- karzinom	Zelllinie	S404	S472	S292	S1684	S308	S311	S305
	COLO-206F	o		•	•	•	•	
	LOVO	o		o	o	o	o	
	SW948	o		o	o	o	o	
LOH %			33,3	33,3				

Tabelle 11: LOH Untersuchungen auf dem langen Arm von Chromosom 6. Untersucht wurden verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien (links) mit sieben verschiedenen Mikrosatelliten-Markern (oben). Der prozentuale Anteil an LOH für D6S292 und D6S1684 ist angegeben o = kein LOH; • = loss of heterozygosity (LOH);); x = nicht informativ; leeres Kästchen = der entsprechende Locus wurde nicht untersucht.

Mammakarzinom	Zelllinie	S404	S472	S292	S1684	S308	S311	S305
	HMEC	o		o	o	x	o	
	AR	o		x	o	o	x	
	1590	o		•	•	•	•	•
	KM22	o		o	o	o	o	
	KS	o		o	o	o	o	
	MCF7	o		o	•	•	o	
	MCF7 ADR	o		•	•	•	•	o
	LCC1	o		o	•	•	o	
	LCC2	o		o	•	•	o	o
	LCC3	o		•	•	•	•	o
	MDA-MB231	o		•	•	•	•	
	MDA-MB468	o		o	•	•	o	
	MDA-MB435	o		o	o	x	o	
	ZR-75	o		•	•	•	•	
	T47 D	o		•	•	•	•	
2C5	o		o	o	x	o		
4A4	o		o	o	x	o		
LOH %			53,0	62,5				

Tabelle 12: LOH Untersuchungen auf dem langen Arm von Chromosom 6. Untersucht wurden verschiedene Zervix-Zelllinien (links) mit sieben verschiedenen Mikrosatelliten-Markern (oben). Der prozentuale Anteil an LOH für D6S292 und D6S1684 ist angegeben o = kein LOH; • = loss of heterozygosity (LOH); ; x = nicht informativ; leeres Kästchen = der Locus wurde nicht untersucht.

Zervix	Zelllinie	S404	S472	S292	S1684	S308	S311	S305
	KB-V1	o	•	•	•	•	•	
SISO	o		•	o	o	o		
LOH %				100	50			

3.5.7.2. LOH Untersuchungen an Tumorbiopsien

25 Paare von Melanoma-Tumorbiopsien und normaler DNA des selben Patienten wurden auf LOH mit Hilfe von 7 Mikrosatelliten-Markern untersucht. Von diesen 25 autologen Tumorbiopsien stammten 17 Biopsien aus Primärtumoren und 8 Biopsien aus Metastasen. Bei den Primärtumoren wurden für den Locus D6S292 ein LOH aus 17 informativen Fällen und für den Locus D6S1684 zwei LOH Fälle aus 11 informativen Fällen nachgewiesen (s. Tabelle 13). Dies entspricht einer Prävalenz für den Locus D6S292 von 5,9% und für den Locus D6S1684 von 18%. Bei den Melanoma-Metastasen wurde ein starker Anstieg von LOH, für die beiden Loci, auf je 50% nachgewiesen (s. Tabelle 14). Das Ausmaß der betroffenen Bereiche reichte im Maximum von D6S404 bis D6S305 für Patient Nr. 63 während bei dem Patienten Nr. 65 nur ein relativ kleiner Bereich < ca. 45 cM betroffen zu sein scheint (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Die das Gen THW flankierenden Loci D6S292 und D6S1684 wurden für eine LOH Prävalenz-Analyse verwendet. Um das Ausmaß der Deletionen zu bestimmen wurden mehrere Marker, die den langen Arm von Chromosom 6 abdecken, untersucht. o = kein LOH; • = loss of heterozygosity (LOH); x = nicht informativ; leeres Kästchen = der entsprechende Locus wurde nicht untersucht.

Patienten	Primär-Tumore																	Metastasen							
	1	3	11	41	43	99	101	109	115	129	131	163	167	171	193	197	293	51	63	65	69	77	79	281	287
D6S404																			•	o		o	o	•	
D6S472																			•			o			
D6S292	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	•	o	o	•	•	o	o	•	•	o
THW																									
D6S1684	o	•	x	o	o	o	x	x	o	o	o	x	x	o	x	•	o	o	•	•	x	•	x	•	o
D6S308																		o	•	x			•		•
D6S311																								•	
D6S305																			•	o		o	•	o	

Tabelle 14 : Ergebnisse der Prävalenz-Analyse für die Loci D6S292 und D6S1684.

Intervall	Locus	Marker	Primär-Tumore		Metastasen	
			Anzahl an informativen Tumoren	Anzahl an Tumoren mit LOH (%)	Anzahl an informativen Tumoren	Anzahl an Tumoren mit LOH (%)
D6S472 - D6S453	D6S292	AFM203za9	17	1 (5,9)	8	4 (50)
	THW					
D6S472 - D6S453	D6S1684	AFM360th9	11	2 (18)	6	3 (50)

In den Abbildungen 31, 32 und 33 sind exemplarisch einige Beispiele der LOH-Untersuchungen dargestellt. Es wurden jeweils die Loci D6S292 und D6S1684 untersucht. Die Proben 63 und 281 sind Biopsien isoliert aus Metastasen, die Probe 99 wurde aus einem Primär-Tumor isoliert. Die Proben 63 und 281 zeigen ein LOH in beiden Loci (s. Abbildungen 31, 32) während die Probe 99 in D6S292 nicht informativ war und in D6S1684 noch beide Allele hatte (s. Abbildung 33).

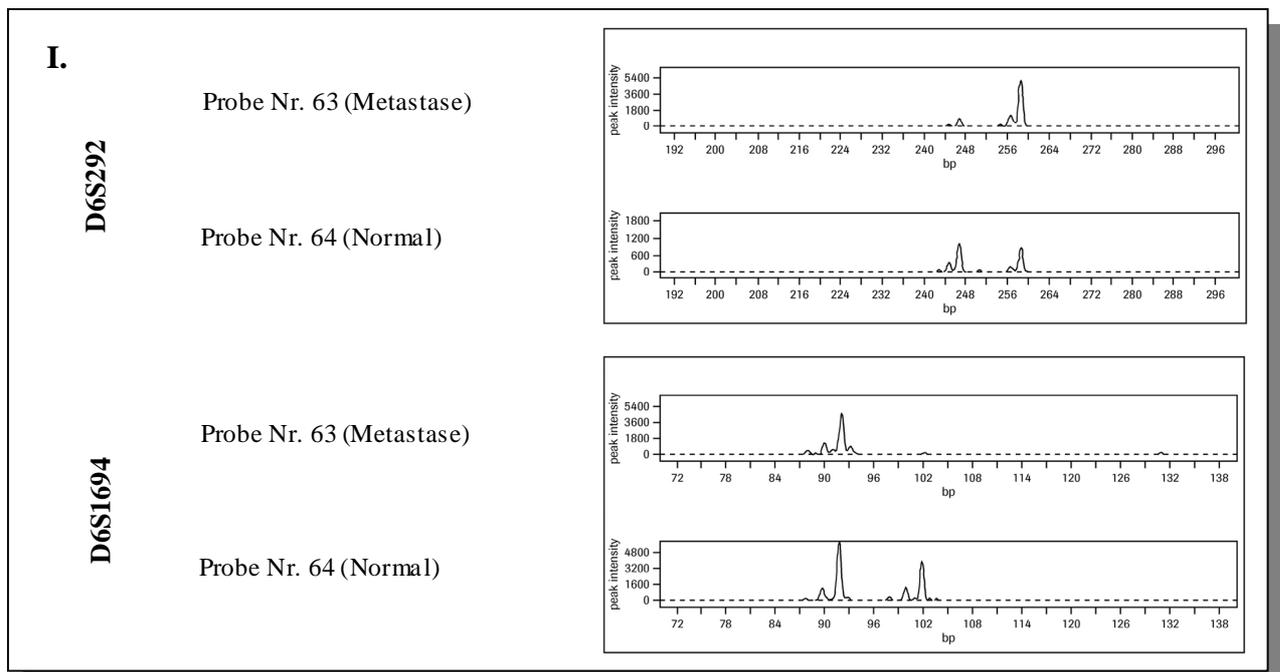


Abbildung 31: LOH Untersuchungen mit den, das Gen THW flankierenden Markern, D6S292 (oben) und D6S1684 (unten). DNA aus Normalgewebe (Nr.64) ist jeweils unter der DNA isoliert aus einer Metastase (Nr.63) dargestellt. Nr. 63 zeigt in beiden Loci den Verlust eines Allels.

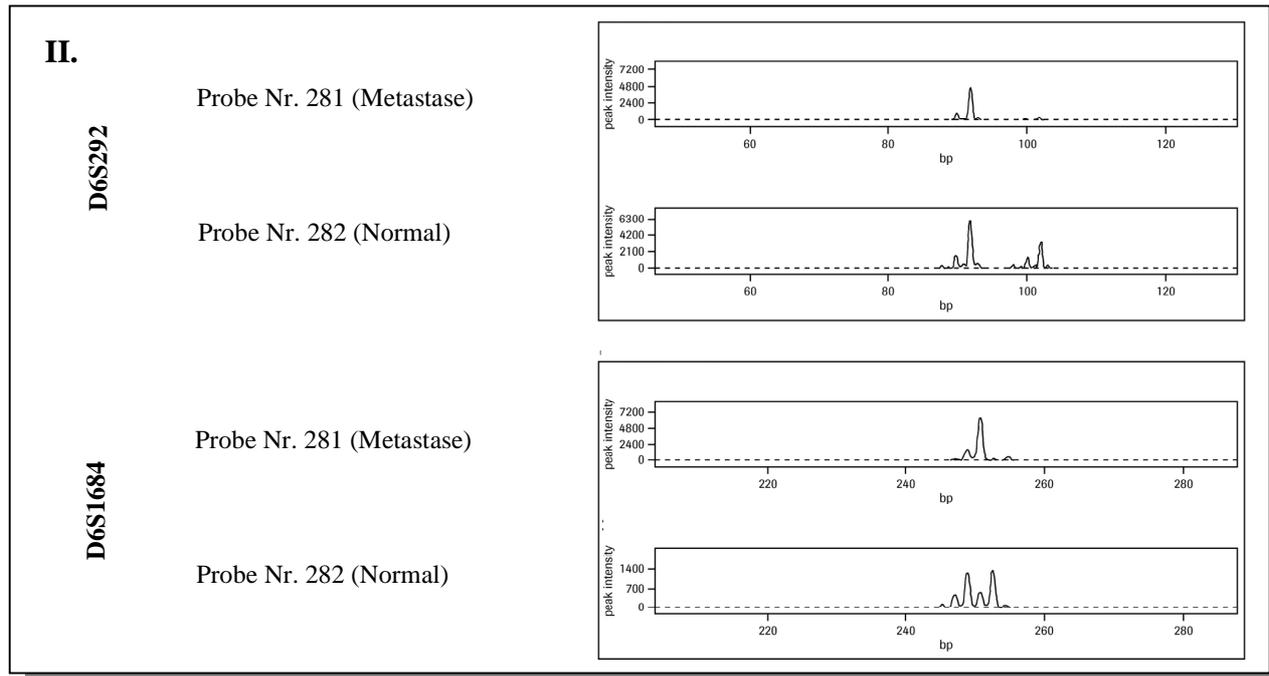


Abbildung 32: LOH Untersuchungen mit den, das Gen THW flankierenden Markern, D6S292 (oben) und D6S1684 (unten). DNA aus Normalgewebe (Nr.282) ist jeweils unter der DNA isoliert aus einer Metastase (Nr.281) dargestellt. Nr. 281 zeigt in beiden Loci den Verlust eines Allels.

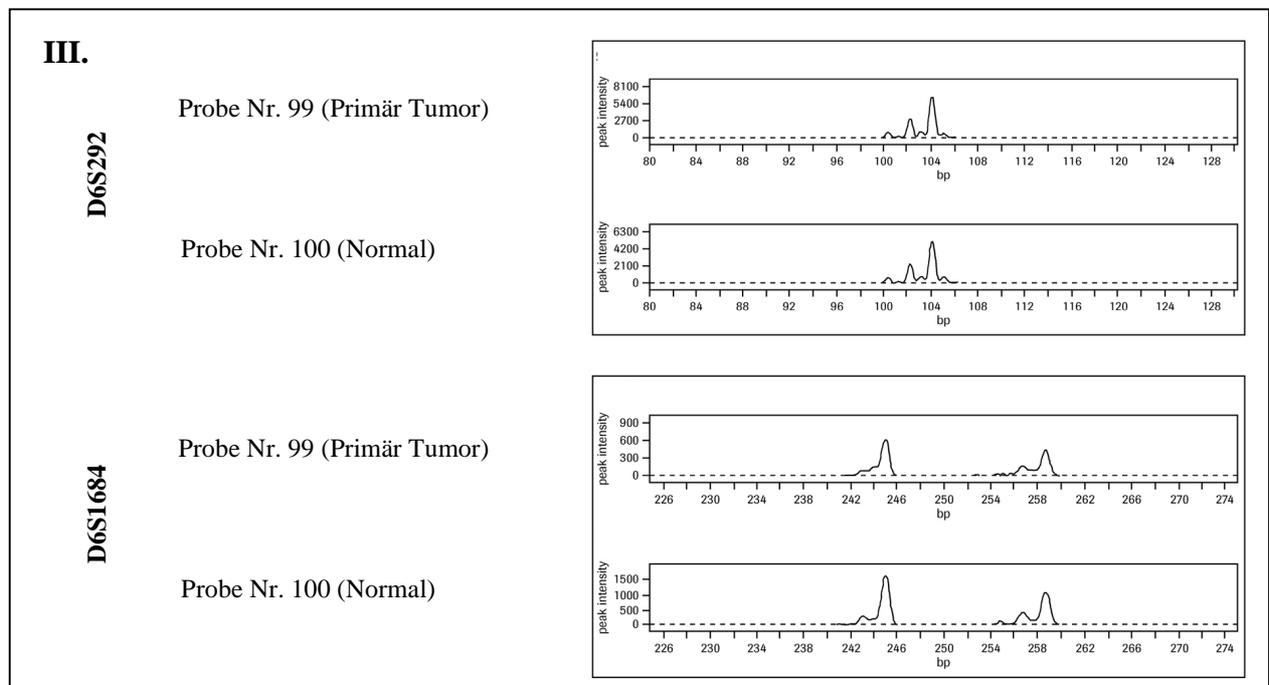


Abbildung 33: LOH Untersuchungen mit den, das Gen THW flankierenden Markern, D6S292 (oben) und D6S1684 (unten). DNA aus Normalgewebe (Nr.100) ist jeweils unter der DNA isoliert aus einem Primär-Tumor (Nr.99) dargestellt. Nr.99 ist in D6S292 nicht informativ und zeigt in D6S1684 beide Allele.

4. Diskussion

Die Progression des malignen Melanoms, vom Primär-Tumor bis zur metastasierenden Melanoma-Zelle, ist sehr komplex und beruht auf einer Reihe von verschiedenen molekularen Mechanismen. So muss eine Zelle, um an einem anderen Ort einen Sekundär-Tumor zu bilden, zuerst vom Primär-Tumor dissoziieren, muss dann in das umgebende Gewebe einwandern, muss in Blut und/oder Lymphgefäße eindringen, wieder auswandern und anschließend in einem fremden Gewebe wieder zu einem soliden Tumor auswachsen. Es ist allgemein akzeptiert, dass in diesen sehr komplexen Prozess eine Vielzahl von Faktoren involviert sind. Um die in dem Prozess der Metastasierung dysregulierten Gene zu identifizieren, und somit die dahinterstehenden molekularen Mechanismen besser zu verstehen, wurde die differentielle Genexpression einer nicht-metastasierenden Melanoma-Zelllinie und einer metastasierenden Melanoma-Zelllinie untersucht.

4.1. Das Modell-System

Zur Untersuchung und Identifizierung dysregulierter Gene wurde das Genexpressions-Muster der nicht-metastasierenden humanen Melanoma-Zelllinie 530 und der metastasierenden humanen Melanoma-Zelllinie NMCL-1 untersucht. Die beiden Zelllinien wurden bezüglich ihres Metastasierungspotentials in der Nacktmaus überprüft.

Um nicht für die Fragestellung irrelevante Gene zu identifizieren, war es wichtig, dass die Zellen unter gleichen Bedingungen kultiviert werden konnten und dass sie vergleichbare Wachstumsverhalten aufwiesen. Somit war es möglich, von beiden Zelllinien Populationen zu isolieren, die sich in der gleichen Wachstumsphase befanden. Diese Kriterien wurden von den verwendeten Zellsystemen erfüllt. Die Zellen wurden jeweils in der subkonfluenten Phase „geerntet“.

Zellsysteme demonstrieren mehrere gravierende Vorteile gegenüber frischen Tumor-Biopsien. Es handelt sich hierbei um genau definierte Zellpopulationen, ohne „Verunreinigungen“ anderer infiltrierender Zelltypen (z.B. Keratinozyten, Makrophagen). Es steht auch immer genügend Material in konstanter Qualität zur Verfügung, so dass mit einer Charge von Zellen mehrere Analysen durchgeführt werden können. Die isolierte RNA ist von konstanter, guter Qualität, während man bei Tumor-Biopsien oft mit Degradationserscheinungen konfrontiert ist. Die Problematik eines solchen Systems liegt im Verlust von natürlichen, gewebespezifischen Einflüssen auf die Tumorzelle. Melanozyten

liegen in der Epidermis eingebettet zwischen Keratinozyten. Dabei liegt ein konstantes Verhältnis von Melanozyten zu Keratinozyten von 1:36 vor. Melanozyten sind zahlreichen Zell-Zell-Interaktionen ausgesetzt, die in Neoplasien gestört sein können. So wird die Expression des MUC-18 Adhäsionsrezeptors von Keratinozyten beeinflusst (Shih *et al.*, 1994). Außerdem produzieren Melanomazellen eine Vielzahl von Faktoren, die das Expressionsverhalten benachbarter Zellen beeinflussen und für die Pathogenese bedeutsam sein können (Herlyn und Shih, 1994). Zellen die aus ihrer natürlichen Umgebung genommen werden können sich anders verhalten als im Gewebe. Zieht man diese Faktoren mit in Betracht, so stellen die beiden Zelllinien ein geeignetes Modell zur Identifizierung progressionsassoziiierter Gene dar.

4.2. Die Differential Display Analyse

Zum Vergleich der Genexpressionsmuster der beiden Zelllinien wurde die Methode des Differential Displays (Liang und Pardee, 1992) angewendet.

Das Differential Display ist eine sehr sensitive Methode, bei der auch sehr kleine Expressionsunterschiede aufgezeigt werden können. Es können auch, im Gegensatz zur subtraktiven Hybridisierung, hochregulierte und herunterregulierte Gene in beiden Zelllinien gleichzeitig dargestellt werden. Die Reproduzierbarkeit des Bandenmusters konnte gezeigt werden. Allerdings waren ca. 87%, der als differentiell identifizierten und isolierten cDNAs, sogenannte "Falschpositive". Dieser hohe Anteil an "Falschpositiven" wurde in der Literatur bestätigt (Liang und Pardee, 1994; Francia *et al.*, 1996).

Zur Minimierung der "Falschpositiven" wurden verschiedene Verfahren angewendet. Ansätze, in denen differentielle Banden identifizieren werden konnten, wurden reproduziert. Alle Reaktionen wurden immer in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen ausgeführt und im Gel direkt nebeneinander, in parallelen Spuren aufgetragen.

Um genomische- oder sonstige DNA-Kontaminationen von revers transkribierter mRNA zu unterscheiden, wurde immer eine Negativkontrolle durchgeführt, wobei in den Ansatz der reversen Transkription kein Enzym (Reverse Transkriptase) zugegeben wurde. Werden in der anschließenden PCR-Amplifikation Produkte generiert, müssen diese von DNA Kontaminationen stammen. Diese Negativkontrolle wurde zusammen mit den „normalen“ Reaktionen in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mit dieser Methode ließen sich DNA-Kontaminationen von Produkten, die aufgrund revers transkribierter RNA zustande kamen, effektiv unterscheiden.

Die Generierung von "Falschpositiven" hat verschiedene intrinsische- und extrinsische Gründe. Zum Einen können Unterschiede in der Integrität und der Konzentration der RNAs aus den beiden Zelllinien ausschlaggebend sein. Da für beide Zelllinien immer der gleiche "Master-Mix" verwendet wurde, sollte die Qualität der Reagentien und Enzyme, sowie die Reinheit der Primer keine Rolle spielen. Zum Anderen sind die Kriterien zum Picken einer Bande sehr individuell und verantwortlich für einen Großteil von Falschpositiven (Liang und Pardee, 1994). Art der Reaktionsgefäße, Art des Thermocyclers und Ansatz der Reaktion sollte hier keine Rolle gespielt haben, da für beide Zelllinien alles parallel und mit den gleichen Arbeitsmitteln durchgeführt wurde.

Zur Bestätigung der differentiellen Expression der isolierten cDNAs wurden zwei Methoden angewendet. Die Reverse Northern- und die Northern-Blot Analyse. Mit Hilfe des Reverse Northern (Mou *et al.*, 1994) ist es relativ einfach eine große Anzahl von cDNA-Fragmenten auf deren differentielle Expression hin zu untersuchen. Für diese Analyse wird nur relativ wenig Gesamt-RNA zur Herstellung der radioaktiv markierten Hybridisierungssonde benötigt. Es können parallel mehrere Proben auf deren differentielle Expression hin untersucht werden. Anders als im Northern-Blot findet keine Größenauftrennung der RNA statt. Die Größe der isolierten cDNA kann somit nicht bestimmt werden. Da die aus dem Differential Display Gel isolierte Probe prinzipiell aus mehreren, gleich großen cDNA-Fragmenten bestehen kann, muss zur endgültigen Bestätigung noch eine Northern-Blot Analyse angeschlossen werden. Bei 5 cDNA-Proben konnte so eine differentielle Expression nachgewiesen werden.

4.3. Diskussion der differentiell exprimierten Gene

4.3.1. Differentielle Expression von HLA-Genen der Klasse II

HLA der Klasse I und Klasse II sind vermutlich in die zelluläre Immunantwort gegen Krebs involviert (Moore, 1985). Im Differential Display konnten zwei unterschiedliche, differentiell exprimierte Gene der HLA-II-beta Ketten identifiziert werden. Beide mRNAs waren ausschließlich in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 nachweisbar. Dies waren die Gene die für die beta-Ketten der HLA-Moleküle HLA-DR und HLA-SB kodieren. HLA-Moleküle der Klasse II sind antigenpräsentierende Moleküle die von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt werden. T-Helferzellen erkennen Peptide von Antigenen, die z.B. von Makrophagen vereinnahmt worden waren. Wenn CD4-Zellen die richtigen biologischen Signale erhalten, produzieren sie große Mengen von Lymphokinen. HLA-II-Moleküle bestehen aus einer

α - und einer β -Kette mit je zwei Ig-ähnlichen Domänen und einem Membrandurchgang. Beim Menschen liegt die sog. MHC-Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 6. HLA-I und HLA-II sind polygen und hoch polymorph. Die Gene zeigen den ausgeprägtesten Polymorphismus, den man bei Vertebraten kennt. Durch den starken Polymorphismus sind fast alle Menschen heterozygot, d.h. sie besitzen zwei unterschiedliche Haplotypen. Dies erhöht die Zahl der auf Zellen exprimierten unterschiedlichen MHC-Moleküle und erzeugt sehr individuen-spezifische Muster.

Da die beiden Zelllinien 530 und NMCL-1 von unterschiedlichen Patienten abstammen, ist es möglich, dass die Unterschiede im HLA-Genexpressionsmuster aufgrund des ausgeprägten Polymorphismus zustande kommen.

HLA-II kommt nur auf der Oberfläche von Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, aktivierten T-Zellen und Zellen des Thymusepithels vor, und präsentiert das Antigen den CD4-positiven Zellen. Beim malignen Melanom korreliert die HLA-II Expression mit der neoplastischen Transformation (Holzmann *et al.*, 1987). Normale Melanozyten exprimieren kein HLA Klasse II Antigen, während in 40 bis 70% aller Primärtumore und in ca. 80% aller Melanoma Metastasen immunhistochemisch eine HLA-II Expression nachgewiesen werden konnte (van Duinen *et al.*, 1988). Allerdings variieren die Daten beträchtlich zwischen verschiedenen Studien. Es wurde gezeigt, dass maligne Zellen in der Lage sind endogenes Antigen, in Assoziation mit HLA-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (Brady *et al.*, 1996; Armstrong *et al.*, 1998). Fossati *et al.* (1984) zeigten, dass Melanoma-Zellen die HLA-Klasse-II Antigen an ihrer Oberfläche tragen, in der Lage sind autologe T-Lymphozyten zu stimulieren. Jedoch ist bisher unklar, ob dieser Mechanismus eine signifikante Rolle bei der Kontrolle des Tumorwachstums spielt. Bei der Immunantwort gegen Tumoren scheinen CD4-Zellen, neben der Aktivierung von T- und B-Zellen, eine weitere wichtige Funktion zu haben. Sie sind in der Lage antigen-präsentierende Zellen direkt durch die Interaktion von CD40/CD40-Ligand oder indirekt durch Zytokine zu aktivieren. Die Aktivierung von Makrophagen stimuliert die Produktion von Superoxid und Stickoxid, welches dann an der Eliminierung von Tumor-Zellen beteiligt ist (Hung *et al.*, 1998).

Die proximalen Promotoren aller MHC-Klasse-II Gene enthalten ein 19bp-Element, die sogenannte X-Box, welche in ihrer Position, als auch in ihrer Sequenz sehr konserviert ist. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die X-Box für die Transkriptionsinitiation essentiell ist (Mischianti *et al.*, 2000). Mit Hilfe von Affymetrix-Untersuchungen (der Zelllinien 530 und NMCL-1) wiesen Brehm *et al.* (2000) eine sehr starke Expression des X-Box-Repressor-Gens

(*XBR*) in NMCL-1 nach. Das *XBR*-Gen kodiert für ein Zink-Finger Protein das spezifisch an die X-Box bindet und so die Transkription von MHC-II-Genen inhibiert (Scholl *et al.*, 1996). Die Hochregulierung des X-Box-Repressors führt zu einer Repression der Expression von HLA-Klasse-II-Genen. Dies könnte einen Mechanismus darstellen, durch fehlende Stimulation von T-Lymphozyten und Makrophagen, der Immunantwort des Wirtes zu entkommen. Für diese Hypothese spricht, dass bei den Affymetrix-Untersuchungen verschiedene HLA-Moleküle in der Zelllinie NMCL-1 herunterreguliert waren, keines jedoch in der Zelllinie 530.

4.3.2. Differentielle Expression der Stearoyl-CoA Desaturase

Bei der Differential Display Analyse wurde ein bis dahin unbekanntes cDNA-Fragment isoliert, das im Northern-Blot eine differentielle Expression zeigte. Es wurden zwei Transkripte (5,2 kb und 3,9 kb) detektiert, welche in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 gegenüber der metastasierenden Zelllinie NMCL-1 überexprimiert sind. Während eines Phagenbank-Screens zur Isolierung der vollen Länge der cDNA wurde die komplette Sequenz von Zhang *et al.* (1999) veröffentlicht. Es handelt sich dabei um eine Stearoyl-CoA Desaturase. Die Stearoyl-CoA Desaturase ist ein Eisen-enthaltendes Enzym, das bei der Oxidation von Palmitinsäure und Stearinsäure zu den einfach ungesättigten Fettsäuren Palmitoyleinsäure und Ölsäure beteiligt ist (Enoch *et al.*, 1976), wobei die Desaturase den limitierenden Faktor in dieser Reaktionskaskade darstellt (Strittmatter *et al.*, 1974). Die Regulierung ist sehr komplex und wird durch die Ernährung (Jeffcoat *et al.*, 1978), Hormone (Waters *et al.*, 1997), Temperatur (Tiku *et al.*, 1996), Metalle (Wahle *et al.*, 1995) und Entwicklungsprozesse (Casimir *et al.*, 1996) bestimmt. Das Verhältnis zwischen Stearinsäure und Ölsäure wurde schon öfter in Zusammenhang mit der Regulierung von Zellwachstum und Differenzierung gebracht, bedingt durch die Fluidität der Zellmembran (Kates *et al.*, 1994) und Signaltransduktion (Gyorfy *et al.*, 1997). Wird die Ratio von Stearinsäure und Ölsäure in Richtung der Stearinsäure verschoben, wird in ventriculären Myocyten Apoptose induziert (de Vries *et al.*, 1997). Scd-Aktivität und/oder mRNA Mengen korrelieren mit Seneszenz (Fukucchi-Mizutani *et al.*, 1995) und Neoplasie (Hrelia *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994).

Die cDNA besitzt eine Länge von ca. 5,2 kb und kodiert im ORF für ein putatives Protein von 359 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 41,5 kD. Die Sequenz hat eine 3'UTR von 235 bp und eine extrem lange 5'UTR mit 3906 bp. In der cDNA-Sequenz der Desaturase wurden zwei Polyadenylierungssignale (Simonsen und Levinson, 1983) gefunden. In dieser

Arbeit wurde gezeigt, dass die alternative Verwendung der beiden Polyadenylierungssignale zu den beiden 3,9 kb und 5,2 kb Transkripten führt. Dies bedeutet, dass die beiden Transkripte für das gleiche Protein kodieren. Die Funktion der beiden Polyadenylierungssignale ist unklar. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass *Scd* auf eine Vielzahl von Stimuli wie Ernährung, Hormone, Temperatur, Metalle und Entwicklungszustand reagiert. Diese dynamische Antwort erfordert zusätzliche transkriptionelle Kontrollen, wie z.B. die Verwendung zweier Polyadenylierungssignale. Die beiden daraus resultierenden Transkripte, die sich in der Länge der 5'UTR unterscheiden, differieren vermutlich in ihrer Stabilität und Translatierbarkeit. Dies lässt eine schnelle und effektive Antwort auf einen Wechsel in der zellulären Umgebung zu (Edwards-Gilbert *et al.*, 1997). In der 3'-UTR wurden auch drei "mRNA-Instabilitäts-Sequenzen" (ATTTA) gefunden. Diese Sequenzen sind in den mRNA-Abbau involviert (Wickens und Stephenson, 1984; Shaw und Kamen, 1986). Ein Signal lag im 3,9 kb und zwei im 5,2 kb Transkript. Bei Genen, wie z.B. einem Aminosäure Transporter (Aulak *et al.*, 1996) und eIF-2 α (Miyamoto *et al.*, 1996), bei denen eine schnelle Antwort auf Zellwachstum nötig ist, wurde die alternative Verwendung von Polyadenylierungssignalen und gewebespezifischen Verteilungen ebenfalls nachgewiesen. Die relative Menge der beiden Transkripte variiert in verschiedenen Geweben beträchtlich. Die alternative Verwendung der beiden Polyadenylierungssignale könnte einen Mechanismus darstellen um die *Scd*-Aktivität in den verschiedenen Geweben zu regulieren.

Um festzustellen, ob die Expression des *Scd*-Gens mit dem Metastasierungspotential von verschiedenen humanen Melanoma-Zelllinien korreliert, wurde das Expressionsmuster in einer Northern-Blot Analyse bestimmt. Es konnte keine Korrelation zwischen Expressionsstärke und Metastasierungspotential der untersuchten Zelllinien festgestellt werden. In den Zelllinien MV-1, M14 und NMCL-1 wurden allerdings noch, zusätzlich zu den 3,9 kb und 5,2 kb Varianten, ein 1,0 kb und ein 0,5 kb Transkript nachgewiesen. Da in diesen beiden Varianten kein statistisch relevanter Leserahmen gefunden werden konnte, werden sie also vermutlich nicht translatiert. Die Funktion dieser beiden kleinen Varianten ist unklar.

Die Bedeutung der differentiellen Expression von *Scd* im Prozess der Metastasierung ist sehr vielschichtig. Durch die Herunterregulierung der *Scd*-Expression verschiebt sich das Verhältnis von Stearinsäure zu Ölsäure in Richtung Stearinsäure, was sich in einer Umgehung des Apoptose-Mechanismus äußern könnte. Die Balance zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren beeinflusst die Membran Fluidität und somit ihre physikalischen Eigenschaften. Ein weiterer Faktor könnte die von Geeraert *et al.* (1997) beschriebene

Funktion der Stearoyl-CoA Desaturase darstellen. Ceramid ist ein potentes bioaktives Molekül, das in Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose involviert ist. Dihydroceramid, die inaktive Vorläufersubstanz, wird in Ceramid umgewandelt. Dieser Prozess wird durch die Stearoyl-CoA Desaturase katalysiert. Granulysin, ein zytotoxisches Molekül, das von stimulierten CTL- und NK-Zellen abgegeben wird, vermag Apoptose zu induzieren. Granulysine, ähnlich den Saposinen, interagieren mit der Lipid-Membran und aktivieren Lipid-degradierende Enzyme wie Glucosylceramidasen und Sphingomyelinasen (Kishimoto *et al.*, 1992; Vaccaro *et al.*, 1997). Granulysin induzierte Apoptose ist mit einem Anstieg der Ceramid- und Abfall der Sphingomyelin-Konzentration assoziiert (Wiegmann *et al.*, 1994). Ceramid ist ein Mediator von apoptotischen Prozessen (Kolesnick *et al.*, 1994; Testi *et al.*, 1996) und kann, wenn es exogen zugegeben wird, Apoptose induzieren (Obeid *et al.*, 1993; Gamen *et al.*, 1996). Durch Herunterregulierung der Desaturase könnte die Ceramid-Synthese nicht ausreichend sein um auf diesem Weg Apoptose zu induzieren.

4.3.3. Differentielle Expression des neuen Gens URIM

Mit Hilfe der Methode des differentiellen Displays wurde ein neues Gen identifiziert, das in der metastasierenden Zelllinie NMCL-1 gegenüber der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 stark überexprimiert ist. Aufgrund der Überexpression wurde das Gen als *URIM* (Up-Regulated in Metastasis) bezeichnet (Hildebrandt *et al.*, 1999). Aus der Differential Display Analyse konnte ein 370 bp cDNA-Fragment isoliert werden, das anschließend mit Hilfe der RACE-PCR zur kompletten Länge der cDNA verlängert werden konnte. Die Nukleotidsequenz besteht aus 750 bp und kodiert im ORF für ein Protein mit 206 Aminosäuren. Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der Accession-Nummer AJ295637 hinterlegt. Der isoelektrische Punkt des Proteins liegt im extrem basischen Bereich, bei 10,4. Als Motiv konnte in der Aminosäuresequenz ein putatives Kern-Lokalisierungs-Signal gefunden werden. Dabei handelt es sich um ein sogenanntes "bipartide" Kern-Lokalisierungs-Signal (PLRKKKKVDPKKDQEAKERLK). Zuerst wurde dieses Signal in *Xenopus* Nucleoplasmin (Robbins *et al.*, 1991) beschrieben. Das Muster besteht aus 2 basischen Aminosäuren (AS), 10 dazwischenliegenden AS und einer weiteren basischen Region, bestehend aus mindestens 3 basischen von 5 AS. Dieses putative Kern-Lokalisierungs-Signal besteht im N-terminalen-Teil aus einer basischen Region (RKKKK), die Teil eines klassischen Kern-Lokalisierungs-Signals sein könnte. Diese sind gewöhnlich relativ kurz und haben einen großen Anteil an basischen Aminosäuren (Dingwall und Laskey,

1991). In der Nukleotidsequenz wurde 13 bp stromaufwärts des Poly-A-Endes (von Nukleotid 722 bis 727) ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) gefunden. Die erwähnte Nukleotidfolge AATAAA dient einer Endonuclease als Erkennungsmerkmal. Dieses Enzym trennt den überschüssigen Teil des 3'-Endes vom früheren Transkriptionsprodukt ab und schafft damit die Stelle zur Anheftung des Poly-A-Schwanzes.

Aufgrund des konservierten Kern-Lokalisierungs-Signals und des extrem basischen isoelektrischen Punktes kann eine Lokalisation des Proteins im Kern angenommen werden.

Das putative Startcodon ist in einer Kozak-Konsensus-Sequenz (GCCatgA) enthalten. Für die Translations-Initiation wird diese Sequenz als relativ schwacher Konsensus angesehen, folgt jedoch der Beobachtung, dass fast alle Vertebraten mRNAs wenigstens an einer der zwei Schlüsselpositionen (Purin bei -3, G bei +4) der Kozak-Sequenz (Kozak, 1996) entsprechen.

Expressionsanalysen in verschiedenen Normalgeweben und Tumor-Zelllinien zeigten eine ubiquitäre Expression, wenngleich auch in unterschiedlicher Stärke. Expressionsanalysen für *URIM* wurden auch mit einem Panel von Mammakarzinom-Zelllinien und normalen epithelialen Zellen aus der Milchdrüse (HMEC) durchgeführt. Eine schwache Expression wurde in zwei Zelllinien, isoliert aus Primärtumoren (WA, AR), festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde in drei Zelllinien, isoliert aus Knochenmarkmikrometastasen (KM22, HG15, 1590) und einer metastasierenden Zelllinie, isoliert aus einem Aszites (KS), eine bis zu 17-fache Überexpression von *URIM* gefunden. *URIM* Expression scheint mit dem Metastasierungsverhalten beim Mammakarzinom zu korrelieren.

Bei Datenbankrecherchen wurde ein homologes Protein aus der Maus gefunden. Die Identität über das gesamte Protein beträgt 75%. Die ersten 30 Aminosäuren zeigen eine geringe Homologie (39%), während der Rest des Proteins stark konserviert zu sein scheint (81%). Dies deutet darauf hin, dass die N-terminale Region des Proteins (Aminosäuren 1-30) weniger kritisch für die Funktion zu sein scheint. Auch das putative Kern-Lokalisierungs-Signal ist konserviert. Über die Funktion des Maus homologen ist bisher nichts bekannt, so dass hieraus auf keine Funktion für *URIM* geschlossen werden kann.

Die genomische Lokalisation von *URIM* konnte auf dem Chromosom 22q11, in der sogenannten "DiGeorge Critical Region" lokalisiert werden. Das Gen hat eine Größe von ca. 3,5 kb und besteht aus vier Exons. Das putative Startcodon von *URIM* liegt nur ca. 1 kb vom Startcodon des Gens *HIRA* entfernt. Die dazwischenliegende Sequenz ist extrem GC-reich. Die beiden Gene liegen in unterschiedlicher Transkriptionsrichtung.

Das sogenannte DiGeorge-Syndrom (DGS) und das Velocardiofacial-Syndrom (VCFS) sind kongenitale Erkrankungen, deren phänotypische Spektren überlappen. So findet man bei beiden Syndromen schwere Herzfehler, T-Zell Immunsuffizienz, geistige Retardiertheit, faziale Dysmorphien sowie eine Reihe weiterer Störungen. Die Syndrome treten relativ häufig, mit einer Frequenz von 1/4000 lebend geborenen auf (Burns und Goodship, 1996). Das DGS und VCFS sind mit ähnlichen 22q11 Deletionen assoziiert, so haben 83% aller Patienten Deletionen in diesem Bereich (Scambler *et al.*, 1992). Die meisten der betroffenen Gewebe und Strukturen stammen während der Embryonalentwicklung von den Kiemenbögen ab. An Hühnerembryonen wurde gezeigt, dass die Entfernung von Zellen, die von der Neuralleiste in die Kiemenbögen wandern, zu Symptomen ähnlich denen des DGS und VCFS führen (Kirby und Waldo, 1990). Im Zusammenhang mit dem DGS und VCFS wurde, etwa zeitgleich mit dem Erscheinen der Veröffentlichung von URIM, von Funke *et al.* (1998) eine Sequenz (NLVCF) veröffentlicht, die auf Nukleinsäureebene eine 99,4%ige Homologie zu URIM hat. Aufgrund dieser Homologie kann davon ausgegangen werden, dass es sich um die gleiche cDNA handelt. Mit *in situ* Hybridisierungen untersuchte die Arbeitsgruppe das Expressionsmuster von URIM/NLVCF in 9,5- und 10,5-dpc Maus-Embryos. Vergleicht man die Expressionsmuster von HIRA (Wilming *et al.*, 1997) und URIM/NLVCF in 9,5- und 10,5-dpc Maus-Embryos, so erkennt man, dass beide Gene ein fast identisches Expressionsmuster aufweisen. Das identische Expressionsmuster und die Nähe der beiden Transkriptionsstartpunkte legen die Vermutung nahe, dass HIRA und URIM koordiniert reguliert werden. Geht man davon aus, dass URIM und HIRA noch gemeinsame cis-regulatorische Elemente besitzen, rücken die Startpunkte noch weiter zusammen. Es wurde gezeigt, dass Gene in enger Nachbarschaft mit bidirektionalen Promotoren, im selben biochemischen Pathway agieren (Gavalas und Zalkin, 1995; Heikkilä *et al.*, 1993; Hentschel und Birnstiel, 1981). HIRA ist im Kern lokalisiert, besitzt ein bipartides Kern-Lokalisierungs-Signal und 7 amino-terminale WD40 Domänen (Halford *et al.*, 1993; Lamour *et al.*, 1995). WD40 Domänen sind bei Protein-Protein Interaktionen beteiligt und sind typisch für Proteine der Polycomb-Gruppe (Denisenko *et al.*, 1998). Two-Hybrid Untersuchungen zeigten, dass HIRA einen großen Proteinkomplex, aufgebaut aus HIRP3, Pax3 und den Kern-Histonen H4 und H2B, eingeht. Diese Proteine binden jedoch außerhalb der WD40 Domänen (Lorain *et al.*, 1998). Die Pax Gen-Familie besteht aus neun Mitgliedern, die für nukleäre Transkriptionsfaktoren kodieren. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung (Chalepakakis *et al.*, 1992) und eine wichtige Rolle als Proto-Onkogen

wird als sehr wahrscheinlich angesehen (Schäfer, 1998). Von Magnaghi *et al.* (1998) wird nun folgendes Modell vorgeschlagen: HIRA agiert als ein Transkriptions-Co-Regulator, wobei es die Chromatinstruktur von Pax3 Target-Genen verändert und so die Transkription beeinflusst. Ob die Interaktion zwischen Pax3 und dem Proteinkomplex mit Hira ein positiver oder negativer Regulator für die Transkription darstellt, ist unklar (Galibert *et al.*, 1999). Target-Gene von Pax3 sind der Transkriptionsfaktor MTF sowie hMyoD, MYF5 und c-MET, wobei gezeigt wurde, dass MTF bei der Differenzierung von Melanozyten beteiligt ist (Tachibana, 1999).

URIM könnte also direkt oder indirekt an der Regulation von Homöoboxgenen, bzw. an den Target-Genen der Homöoboxgene beteiligt sein. Weitere Untersuchungen müssen nun klären ob URIM mit HIRA interagiert und so die Regulation von Pax3-Target-Genen beeinflussen kann. Die mit HIRA assoziierten Proteine binden außerhalb des WD40-Repeats. Bindungsexperimente müssen zeigen ob URIM eventuell in der WD40-Tasche von HIRA bindet. Yeast-Two-Hybrid Untersuchungen könnten weitere mögliche Bindungspartner von URIM identifizieren.

Mit Hilfe von Antikörpern soll die Prävalenz von URIM Protein in Mammakarzinomen festgestellt werden.

4.3.4. Identifizierung des putativen Transmembranproteins THW

Mit Hilfe der Methode des Differential Displays wurde ein neues Gen identifiziert, welches als ca. 2,0 kb Transkript in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530, gegenüber der stark metastasierenden Zelllinie NMCL-1, überexprimiert ist (Hildebrandt *et al.*, 2000).

Die Sequenz der vollständigen cDNA hat 1890 Nukleotide mit einer 37 bp langen, extrem GC-reichen 5'UTR (83,7% aus Guanin und Cytosin). Der kodierende Bereich umfasst 579 bp und kodiert für ein putatives Protein von 193 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 21,3 kD. Die 3'UTR umfasst 1274 bp. Ein putatives Polyadenylierungssignal (Simonsen und Levinson, 1983) wurde 11 bp stromaufwärts des Poly-(A)-Schwanzes gefunden (zwischen den Nukleotiden 1855-1861). Ferner wurden fünf (ATTTA)-Instabilitätsmotive in der 3'UTR gefunden. Unter bestimmten physiologischen Bedingungen sind solche Elemente an der Regulation der mRNA Degradation beteiligt (Wickens und Stephenson, 1984; Shaw und Kamen, 1986).

Durch computergestützte Analysen konnten in dem putativen Protein THW vier hydrophobe Transmembrandomänen identifiziert werden. Diese bilden einen kleinen und einen großen

extrazellulären Loop. Das Amino- und Carboxyterminale-Ende, sowie ein kleiner Loop liegt dabei im intrazellulären Bereich. Aufgrund dieser Membran-Topologie, die charakteristisch für die Tetraspanine ist, kann THW dieser Superfamilie zugerechnet werden. Die Übereinstimmungen innerhalb dieser Superfamilie beschränken sich allerdings in erster Linie auf die gleichen Strukturvorhersagen. Homologien in den Aminosäure-Sequenzen bestehen zum Teil nur in geringem Ausmaß. Der Tetraspanin Superfamilie, die auch TM4SF oder 4TM genannt wird, werden seit ihrer Entdeckung 1990, ca. 20 bekannte humane Gene zugerechnet. Zu dieser Proteinklasse zählen z.B. die Gruppe der Connexine, die CD81-, CD82-, CD9-, CD63-Familie der Tetraspanine (Maecker *et al.*, 1997), sowie Proteine der PMP22-Genfamilie (Suter *et al.*, 1995; Schiemann *et al.*, 1997; Naef *et al.*, 1998). Während des Metastasierungsprozesses sind membranständige Moleküle, die Funktionen an der Zelloberfläche wahrnehmen, von entscheidender Bedeutung. Sie spielen sowohl bei der Induktion der Angiogenese, als auch als Adhäsionsmoleküle bei der Anhaftung und Migration der Zellen und als signalübertragende Rezeptoren eine Rolle. Bei der Auflösung der ECM-Komponenten sind der uPA-Rezeptor und membranständige MMP für die gerichtete Degradation der Basalmembran verantwortlich. Andere Rezeptoren können Tumorzellen in bestimmte Zielorgane dirigieren („*homing*“) und Wachstumsfaktor-Rezeptoren stimulieren die Proliferation von Zellen. Außerdem ist ein Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und Normalgewebe (Stromazellen) bei der Invasion zu beobachten, so dass Rezeptoren auch bei der Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen eine Rolle spielen können. Das Expressionsmuster der Tetraspanine ist sehr uneinheitlich. So haben CD9, CD63, CD81 und CD82 eine ubiquitäre Expression, während z.B. CD53 nur in Lymphoidzellen und reifen B-Zellen exprimiert wird. Bei Untersuchungen des gewebespezifischen Expressionsmusters zeigte THW eine ubiquitäre Expression. Mit Ausnahme von peripheren Blut Leukozyten und hämatopoetischen Tumor-Zelllinien wie Burkitt's Lymphoma Raji, Burkitt's Lymphoma Daudi und der leukemischen Zelllinie HL-60, konnte eine Expression in allen untersuchten Geweben festgestellt werden, wenngleich mit sehr unterschiedlicher Stärke. Eine sehr starke Expression wurde im Ösophagus und in der Trachea gefunden.

Die Tetraspanine wurden in der Literatur schon öfter in Bezug zur Tumorprogression und Metastasierung gebracht. Der Verlust der Proteine Connexin 26 und 43 wurde in Mammakarzinomen beschrieben und korreliert mit einem erhöhten Metastasierungsverhalten von Mammakarzinom-Zelllinien (Nicolson *et al.*, 1988; Nicolson *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992).

Die Proteine CD9 und CD63 sind mit Integrinen assoziiert und sind an der Aktivierung, Adhäsion und Motilität von Zellen beteiligt (Maecker *et al.*, 1997). Interessant ist vor allem die ihnen zugesprochene Rolle als Metastasierung supprimierende Faktoren. So wurde, durch Transfektion induzierte CD9-Expression, die Motilität und Metastasierung in Tumor-Zellen unterdrückt (Ikeyama *et al.*, 1993). In Melanoma-Zellen war die Expressionsstärke von CD9 negativ mit dem Metastasierungspotential korreliert (Si *et al.*, 1993). Für CD9 wurde auch eine Korrelation mit der Metastasierung von Brustkrebs beschrieben. Die CD9-Expression war in Zellen aus Lymphknoten-Metastasen wesentlich niedriger als in Zellen des Primärtumors und scheint die Interaktion von Zellen mit Fibronectin zu beeinflussen (Miyake *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1999).

Auch scheint die CD63-Expression in späten Stadien von Melanomen unterdrückt zu sein (Atkinson *et al.*, 1985). Van Muijen *et al.* (1991) konnten zeigen, dass Transfektion von CD63 in humane Melanoma-Zellen deren Wachstum und Metastasierung in der Nacktmaus supprimiert. Für CD82 (KAI1) wurde eine Metastasierung-supprimierende Funktion beim Prostatakarzinom postuliert (Atkinson *et al.*, 1984; Dong *et al.*, 1995).

Im Gegensatz dazu wurde das ebenfalls zur CD81-Familie gehörende Protein CO-029 in verschiedenen metastasierenden Pankreas- und Kolonkarzinom-Zelllinien nachgewiesen, nicht aber in den entsprechenden nicht-metastasierenden Zelllinien. Die Transfektion von CO-029 in eine schwach metastasierende Kolonkarzinom-Zelllinie resultierte in einem erhöhten Metastasierungspotential der Zellen (Claas *et al.*, 1998). Ebenfalls als ein positives Metastasierungs-gen wurde PETA-3 (CD151) aus einer stark metastasierenden Hautkrebs-Zelllinie isoliert (Testa *et al.*, 1999).

Proteine die, wie vermutlich auch THW, zur Superfamilie der Tetraspanine gehören, können die Tumorprogression und die Metastasierungsfähigkeit von Zellen positiv, wie auch negativ beeinflussen. Mit Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Expression von *THW* mit dem Metastasierungspotential von Melanoma-Zelllinien invers korreliert, d.h die stärkste Expression wurde in der nicht-metastasierenden Zelllinie 530 und die schwächste Expression in den sehr stark metastasierenden Zelllinien BLM und MV3 gefunden. Auch in einem Panel von Mammakarzinom-Zelllinien war *THW*, im Vergleich zu humanen epithelialen Zellen aus der Brustdrüse, herunterreguliert. Beim Vergleich der Expressionsstärke von *THW* in Tumorgewebe versus autologem Normalgewebe, konnte eine Herunterregulation im Tumorgewebe beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine mögliche Tumorsuppressor-Funktion für THW.

Auch die chromosomale Lokalisation von *THW*, auf dem langen Arm von Chromosom 6, deutet auf eine Funktion als Tumorsuppressor hin. So konnte Trent *et al.* (1990) zeigen, dass durch Einbringen des normalen Chromosom 6 in Melanoma-Zellen, diese ihre Tumorgenität verloren hatten. Um den Bereich auf dem Chromosom 6, der die Tumorgenität und die Metastasierung supprimiert, näher einzugrenzen, wurden Deletionsmutanten von Chromosom 6 in Melanoma-Zellen eingebracht. Miele *et al.* (2000) konnten so zeigen, dass Chromosomen denen die Region 6q16.3-q23 fehlte, die Metastasierung nicht unterdrücken konnten, während das intakte Chromosom 6 dazu in der Lage war. Sie schlossen daraus, dass in diesem ca. 40 cM großen Bereich, ein oder mehrere Tumorsuppressorgene liegen müssen.

Karyotypische Veränderungen am langen Arm von Chromosom 6 wurden in der Literatur bereits vielfach beschrieben. Ein Verlust der Heterozygotie in diesem Bereich wurde für das maligne Melanom (Healey *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1996; Trent *et al.*, 1990; Ray *et al.*, 1996), Prostata- (Srikantan *et al.*, 1999), Pankreas- (Griffin *et al.*, 1995), Uterus- (Huettner *et al.*, 1998) und das Mammakarzinom (Bilanges *et al.*, 1999) beschrieben. Bei den hier untersuchten Biopsien konnte im Bereich der genomischen Lokalisation von *THW*, eine LOH Prävalenz von 10-20% für Melanoma-Primärtumore und 50% für Melanoma-Metastasen gefunden werden. Auch in verschiedenen Tumor-Zelllinien wurden zum Teil sehr hohe Prävalenzen (70-100% bei Pankreaskarzinom-Zelllinien, 75-78% für Melanoma-Zelllinien, 53-63% für Mammakarzinom-Zelllinien) für diesen Bereich gefunden.

Um die Größe des deletierten Bereiches zu bestimmen und auf eine minimale Region einzugrenzen, wurde ein Panel von 7 polymorphen Mikrosatelliten Markern verwendet, die den langen Arm des Chromosoms abdecken. Die minimale Größe des deletierten Bereiches wurde mit Hilfe dieser Untersuchungen auf < ca.45 cM (D6S404 bis D6S3059) eingegrenzt. Zieht man die Untersuchungen von Miele *et al.* (2000) mit in Betracht, so beträgt die minimale deletierte Region ca. 20 cM. In dieser Region liegt *THW*.

PERP (p53 apoptosis effector related to *PMP-22*), das zu *THW* homologe Gen aus der Maus, wurde erst kürzlich von Attardi *et al.* (2000) veröffentlicht. Die Homologie im kodierenden Bereich beträgt 86,5%, während die Homologie in der 5'UTR nur 65,6% beträgt. Auf Aminosäureebene besteht eine 90,2%ige Identität. Dies deutet auf eine hohe Konservierung der Sequenz im kodierenden Bereich hin.

In verschiedenen Spezies z.B. Schistosomen und Nematoden, wurden die zu den humanen Tetraspaninen homologen Proteine identifiziert. Daher wird den Tetraspaninen eine

konservierte Funktion über einen großen evolutiven Zeitraum zugesprochen (Tomlinson und Wright, 1996; Wilson *et al.*, 1994).

Attardi *et al.* (2000) zeigten, dass das Expressionsprofil von *PERP*, ähnlich wie die Expressionsprofile von p53 Target Genen ist, wenn diese durch Zugabe von DNA-schädigenden Agentien induziert werden. Ferner wurde gezeigt, dass der Promotor von *PERP* zwei putative p53 Bindungstellen besitzt und funktionell von p53 abhängig ist. *PERP* ist in apoptotischen Mausfibroblasten wesentlich stärker exprimiert als in G₁ arretierten Zellen. Aus dieser Beobachtung schließen die Autoren, dass es noch weitere cis-regulatorische Faktoren geben muss, die die Expression von *PERP* steuern. Folgende Modelle werden vorgeschlagen:

1. *PERP* könnte, analog zu den p53 Targets KILLER und Fas (El-Deiry, 1998), autokrine oder parakrine Signale empfangen und dadurch Caspasen aktivieren, um so die Apoptose in Gang zu setzen.

2. Durch eine Homologie zu der γ -Untereinheit des Kalziumkanals, könnte *PERP* eine Kanal- oder Porenaktivität besitzen und somit, die für die Apoptose wichtigen Proteine durchlassen.

In wieweit sich die von Attardi *et al.* (2000) gefundenen Ergebnisse und Hypothesen auf die Funktion von *THW* übertragen lassen, müssen funktionelle Studien zeigen. Eine Funktion als Tumorsuppressor für *THW* gilt aufgrund folgender Beobachtungen als sehr wahrscheinlich:

1. Die Expression von *THW* ist invers korreliert mit dem Metastasierungspotential von verschiedenen Melanoma- und Mammakarzinom-Zelllinien.
2. Die chromosomale Lokalisation auf 6q mit einer hohen Frequenz an LOH.
3. Der deletierte Bereich ließ sich auf ca. 20 cM, in dem auch *THW* lokalisiert ist, eingrenzen.
4. Die vier Transmembran-Topologie und somit die eventuelle Zugehörigkeit zur Tetraspanin Superfamilie.
5. Die Beobachtung, dass *PERP* ein Apoptose spezifisches Target Gen von p53 ist.

5. Literaturverzeichnis

Ahern TE, Bird RC, Bird AE, Wolfe LG, (1993). Overexpression of c-erb-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.

Akiyama S, Fojo A, Hanover JA, Pastan I, Gottesman MM, (1985). Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs. *Somat.Cell Mol.Genet.* Mar,VOL: 11 (2), P: 117-26.

Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA, (1990). Intergrin distribution in malignant melanoma: association of the beta-3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 50: 6757.

Albert LS, Rhodes AR, Sober AJ, (1990). Dysplastic melanocytic nevi and cutaneous melanoma: markers of increased melanoma risk for affected persons and blood relatives. *J Am Acad Dermatol* 22: 69-75.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD, (1989). *Molecular Biology of the cell.* Garland Publ New York.

Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon Cardo C, McNutt NS, Bressler J, Andreef M, (1989). Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with different phenotype. *Oncogene* 4: 1363-1374.

Altschul SF., Gish W, Miller W, Myers E, Lipman DJ, (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 403-410.

Andersen LB, Fountain JW, Gutmann DH, (1993). Mutations in the neurofibromatosis gene in sporadic malignant melanoma cells. *Nat Genet* 3: 118.121.

Armstrong TD, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S (1998). MHC class II-transfected tumor cells directly present antigen to tumor-specific CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* Jan 15;160(2):661-6.

Atkinson B, Ernst CS, Ghrist BF, Herlyn M, Blaszczyk M, Ross AH, Herlyn D, Steplewski Z, Koprowski H, (1984). Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. *Cancer Res* Jun;44(6):2577-81.

Attardi LD, Reczek EE, Cosmas C, Demicco EG, McCurrach ME, Lowe SW, Jacks T, (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev* Mar 15;14(6):704-18.

Aulak KS, Liu J, Wu J, Hyatt SL, Puppi M, Henning SJ, Hatzoglou M, (1996). Molecular sites of regulation of expression of the rat cationic amino acid transporter gene. *J Biol Chem* Nov 22;271(47):29799-806.

- Bachaud JM**, Shubinski R, Boussin G, Chevreau C, David JM, Viraben R, Bonafe JL, Daly NJ, (1992). Stage I cutaneous malignant melanoma: risk factors of loco-regional recurrence after wide local excision and clinical perspectives. *European J Surg Oncol* 18: 442-448.
- Balch CM**, Soong S, Shaw HM, Milton GW (1992). An analysis of prognostic factors in 8500 patients with cutaneous melanoma. In Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sober AJ, Soong S (eds) *Cutaneous melanoma*. JB Lippincott, Philadelphia, , S. 321-352.
- Balch CM** (1992). Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin-Surg-Oncol*. Nov-Dec; 8(6): 400-14.
- Barnhill RL**, Mihm Jr MC, Fitzpatrick TB, Sober AJ (1993). Neoplasms: Malignant melanoma. In Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM; Austen KF (eds) *Dermatology in General Medicine*, McGraw-Hill, New York, S. 1078-1115.
- Bartolazzi AR.**, Peach R, Aruffo A, Stamenkovic I, (1994). Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J. Exp Med* 180: 53
- Bastida E** (1988). The metastatic cascade:potential approaches for the inhibition of metastasis. *Semin Thromb Hemost*14: 66-72.
- Battayani Z**, Grob JJ., Xerri L, (1995). Polymerase chain reaction detection of circulating melanocytes as a prognostic marker in patients with melanoma. *Arch Dermatol* 131: 443-447
- Battistutta D**, Palmer J, Walters M, Walker G, Nancarrow D, Hayward N, (1994). Incidence of familial melanoma and MLM₂ gene. *Lancet* 344: 1607-1608.
- Benton WD**; Davis RW, (1977). Screening lambda_{gt} recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science*. 1977 Apr 8; 196(4286): 180-2.
- Biancone L**, Araki M, Araki K, Vassalli P, Stamenkovic I, (1996). Redirection of tumor metastasis by expression of E-Selectin in vivo. *J. Exp Med* 183: 581.
- Bilanges B**, Varrault A, Basyuk E, Rodriguez C, Mazumdar A, Pantaloni C, Bockaert J, Theillet C, Spengler D and Journot L, (1999). Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors. *Oncogene* 18: 3979-3988.
- Brady MS**, Eckels DD, Ree SY, Schultheiss KE, Lee JS (1996). MHC class II-mediated antigen presentation by melanoma cells. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* Nov;19(6):387-97.
- Brehm R**, Hildebrandt T, Jarsch M, van Muijen GNP and Weidle UH, (2000). Identification of metastasis-associated genes by transcriptional profiling of a metastasizing versus a non-metastasizing human melanoma cell line. *Anticancer Research*, submitted.
- Brooks PC**, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA, (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85: 683-693.

Burns J; Goodship J, (1996). Developmental genetics of the heart. *Curr-Opin-Genet-Dev.* 1996 Jun; 6(3): 322-5.

Burton RC, Coates MS, Hersey P, (1993). An analysis of melanoma epidemic *Int. J. Cancer* 55: 765-770.

Caligo MA, Grammatico P, Cipollini G, Varesco L, Del Proto G, Bevilacqua G (1994). A low NM₂₃ gene expression identifying high malignancy human melanomas. *Melanoma Res* 4: 179-184.

Casimir DA; Ntambi JM, (1996). cAMP activates the expression of stearyl-CoA desaturase gene 1 during early preadipocyte differentiation. *J-Biol-Chem.* 1996 Nov 22; 271(47): 29847-53.

Chalepakis G, Tremblay P, Gruss P, (1992). Pax genes, mutants and molecular function. *J. Cell Sci.* 16: 61-67.

Chappell SA, Walsh T, Walker RA and Shaw JA, (1997). Loss of heterozygosity at chromosome 6q in preinvasive and early invasive breast carcinomas. *British J Cancer* 75: 1324-1329.

Chen YT, Boyer AD, Viars CS., Tsang S old LJ, Arden KC, (1997). Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet. Cell Genet.* 79: 237-240.

Chen YT; Scanlan MJ; Sahin U; Tureci O; Gure AO; Tsang S; Williamson B; Stockert E; Pfreundschuh M; Old LJ, (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1997 Mar 4; 94(5): 1914-8.

Claas C, Seiter S, Claas A, Savelyeva L, Schwab M, Zoller M. (1998). Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *J Cell Biol.* 141: 267-80.

Cochran AJ, Wen DR, Morton DL, (1992). Management of the regional lymph nodes in patients with cutaneous malignant melanoma. *World J Surg* 16: 214-221.

Collins KA, White WL, (1995). Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and bcl-2 are differentially expressed in early evolving malignant melanoma. *Am J. Dermatopathol.* 17:429-438.

Cook GA, Wilkinson DA, Crossno JT Jr, Raghov R, Jennings LK, (1999). The tetraspanin CD9 influences the adhesion, spreading, and pericellular fibronectin matrix assembly of Chinese hamster ovary cells on human plasma fibronectin. *Exp Cell Res.* 251: 356-71.

Coussens LM, Werb Z. (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol.;* 3: 895-904.

Curran T. (1992). Fos and Jun: oncogenic transcription factors. *Tohoku J. Exp. Med.* 168: 169-174.

Devilec P, van Vliet M, van Sloun P, Kuipers Dijkshoorn N, Hermans J, Pearson PL and Cornelisse CJ, (1991). Allelotype of human breast carcinoma: a second major site for loss of heterozygosity is on chromosome 6q. *Oncogene* 6: 1705-1711.

de Vries TJ, Quax PH, Denjin KN, Verrijp JH, Verheijen JH, Verspaget HW, Weidle UH, Ruiten DJ, van Muijen GN, (1994). Plasminogen activator, their inhibitors, and urokinase receptor, emerge in late stages of melanocytic tumor progression. *J Pathol* 144: 70.

de Vries JE, Vork MM, Roemen TH, de Jong YF, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, van Bilsen M (1997). Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes *J Lipid Res* Jul;38(7):1384-94.

Diatschenko L, Lau YC, Campell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD, (1996). Suppression subtractive hybridisation: A method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025- 6030.

Dingwall C und Laskey, (1991). Nuclear targeting sequences - A consensus? *Trends Biochem. Sci* 16:478-481.

Dingwall C, Robbins J, Dilworth SM, Roberts B and Richardson WD, (1988). The nucleoplasmic nuclear location signal is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J. Cell Biol:* 107 841-849.

Denisenko O, Shnyreva M, Suzuki H, Bomsztyk, (1998). Point mutations in WD40 domain of Eed block its interaction with Ezh2. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5634-5642.

Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. (1995). KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science.* 1995; 268: 884-6.

Drewinko B, Yand LY, (1976). Restriction of CEA synthesis to the stationary phase of growth of cultured human colon carcinoma cells. *Exp. Cell Res. Sep.:* 101 (2).

Edward M, MacKie RM, (1993). Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions during melanoma cell invasion and metastasis. *Melanoma Res* 3: 227-234.

Edwards-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C, (1997). Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* Jul 1;25(13):2547-61.

El-Deiry WS, (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol;*8(5):345-57.

Elder DE, Clark WA, Elenitsas R, Guerry D, Halpern AC, (1989). 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.

Elsasser HP, Lehr U, Agricola B, Kern HF, (1993). Structural analysis of a new highly metastatic cell line PaTu 8902 from a primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows. Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*: 64 (4), P:201-7.

Enoch HG, Catala A, Strittmatter P, (1976). Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem* Aug 25;251(16):5095-103.

Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brocker EB, Ruiter DJ, de Waal RM, (1997). Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res* 7 Suppl 2: 19-26.

Fairchild CR, Ivy SP, Kao-Shan CS, Whang-Peng J, Rosen N, Israel MA, Melera PW, Cowan KH, Goldsmith ME, (1987). Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res* Oct 1; 47 (19), P: 5141-8.

Fidler IJ, (1986). Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 5: 29-49.

Fidler IJ, (1989). Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry* 10:673-680.

Fogh J, Wright WC, Loveless JD, (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl.Cancer Inst.* Feb.: 58 (2), P: 209-14.

Fossati G, Taramelli D, Balsari A, Bogdanovich G, Andreola S, Parmiani G, (1984). Primary but not metastatic human melanomas expressing DR antigens stimulate autologous lymphocytes. *Int J Cancer* May 15;33(5):591-7.

Francia G, Mitchell SD, Moss SE, Hanby AM, Marshall JF, Hart IR (1996). Identification by differential display of annexin-VI, a gene differentially expressed during melanoma progression. *Cancer Res* Sep 1;56(17):3855-8.

Fregeau CJ and Fourney, RM, (1993). DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: A sensitive and accurate approach to human identification. *BioTechniques* 15: 100-119.

Frohmann MA, (1994). On beyond classic RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). *PCR Meth. Appl* 4: 40-48.

Fuccuchi-Mizutani M, Savin K, Cornish E, Tanaka Y, Ashikari T, Kusumi T, Murata N (1995). Senescence-induced expression of a homologue of delta 9 desaturase in rose petals. *Plant Mol Biol* Nov;29(4):627-35.

Fuji H, Zhou W and Gabrielson E,(1996). Detection of frequent allelic loss of 6q23-q25.2 in microdissected human breast cancer tissues. *Genes Chromosomes and Cancer* 16: 35-39.

- Funke B**; Puech A; Saint Jore B; Pandita R; Skoultschi A; Morrow B, (1998). Isolation and characterization of a human gene containing a nuclear localization signal from the critical region for velo-cardio-facial syndrome on 22q11. *Genomics*. Oct 15; 53(2): 146-54.
- Galibert MD**, Yavuzer U, dexter TJ, Godings CR, (1999). Pax3 and regulation of the Melanocyte-specific Tyrosinase-related Protein-1 promotor. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 26894-26900.
- Gamen S**, Marzo I, Anel A, Pineiro A, Naval J, (1996). CPP32 inhibition prevents Fas-induced ceramide generation and apoptosis in human cells. *FEBS Lett* Jul 22;390(2):232-7.
- Gaugler B**, van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen 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.* 179:921-939.
- Garbe C**, Orfanos CE, (1992). Epidemiology of malignant melanoma in central Europe: risk factors and prognostic predictors. Results of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Pigment Cells Res. [Suppl.]* 2: 285-294.
- Garbe C**, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, (1994). Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J-Invest-Dermatol.* 1994 May; 102(5): 695-9.
- Garbe C**; Buttner P; Bertz J; Burg G; d'Hoedt B; Drepper H; Guggenmoos-Holzmann I; Lechner W; Lippold A; Orfanos CE, (1995). Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer*. May 15; 75(10): 2492-8.
- Gavalas A**, Zalkin (1995). Analysis of the chicken GPAT/AIRC bidirectional promoter for de novo purine nucleotide synthesis. *Biol Chem* Feb 3;270(5):2403-10.
- Ge L**, Parimoo S, Stenn K, Prouty SM, (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res Sep*;40(9):1549-58.
- Geeraert L**, Mannaerts GP, van Veldhoven PP, (1997). Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochem J* Oct 1;327 (Pt 1):125-32.
- German J**, (1973). Genetic disorders associated with chromosomal instability and cancer. *J Invest Dermatol* 60:427-34.
- Giavazzi R**, Campell DE, Jessup JM, Cleary K and Fidler IJ, (1986). Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinoma implanted in different sites in nude mice. *Cancer Res* 46: 1928-1933.
- Greene MH**; Clark WH Jr; Tucker MA; Kraemer KH; Elder DE; Fraser MC, (1985). High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann-Intern-Med.* 1985 Apr; 102(4): 458-65.

Griffin CA, Hruban RH, Morsberger LA, Ellingham T, Long PP, Jaffee EM, Hauda KM, Bohlander SK and Yeo CJ, (1995). Consistent chromosome abnormalities in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Research* 55: 2394-2399.

Grin-Jorgensen CM Casso EM; Grant-Kels JM, (1992). Spitz nevi. *J-Am-Acad-Dermatol.* Dec; 27(6 Pt 1): 901-13.

Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, (1995): Genetic evidence in melanoma and bladder cancer that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression. *Am J Pathol* 146:1199-1206.

Gruis NA, van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE. Weaver Feldhaus J, Kamb A, Bergman W, Frants RR, (1995). Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat. Genet.* 10: 351-353.

Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M.(1993). High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res.*; 53: 2513-21.

Gutaman M, Inbar M, Klausner JM, Chaitchik S, (1993). Malignant melanoma in different ethnic groups in Israel. Incidence and biologic behavior. *Cancer* 71: 2746-2750.

Guo HB; Stoffel Wagner B; Bierwirth T; Mezger J; Klingmuller D, (1995). Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. *Eur-J-Cancer.* Oct; 31A(11): 1898-902.

Gyorffy Z, Benko S, Kusz E, Maresca B, Vigh L, Duda E, (1997). Highly increased TNF sensitivity of tumor cells expressing the yeast delta 9-desaturase gene. *Biochem Biophys Res Commun* Dec 18;241(2):465-70.

Halaban R, Kwon B, Ghosh S, Delli Bovis P, Baird A, (1988). bFGF as an autocrine growth factor for human melanocytes. *Oncogene Res* 3: 177-186.

Halford S; Wadey R; Roberts C; Daw SC; Whiting JA; O'Donnell H; Dunham I; Bentley D; Lindsay E; Baldini A, (1993). Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. *Hum-Mol-Genet.* 1993 Dec; 2(12): 2099-107.

Hanahan D; Meselson M, (1980). Plasmid screening at high colony density. *Gene.* 1980 Jun; 10(1): 63-7.

Hansen, MF, Cavenee, WK (1987). Genetics of Cancer predisposition. *Cancer Res.*, 47: 5518-5527,

Harris AL (1997). Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet*, 349:SII3-5

- Hayward SW.**, Dahiya R, Cunha GR, Bartek J, Deshpande N, Narayan P, (1995): Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In-Vitro Cell Dev. Biol. Anim. Jan*, VOL: 31 (1), P: 14-24.
- Healey E**, Belgaid C, Takata M, Harrison D, Zhu NW, Burd DA, Rigby HS, Mathews JN and Rees JL, (1998). Prognostic significance of allelic losses in primary melanoma. *Oncogene 16*: 2213-2218.
- Heikkila P**, Soininen R, Tryggvason K, (1993). Directional regulatory activity of cis-acting elements in the bidirectional alpha 1(IV) and alpha 2(IV)collagen gene promoter. *J Biol Chem Nov 25*;268(33):24677-82.
- Hentschel CC**, Birnstiel ML, Wright (1981). The organization and expression of histone gene families. *Cell Aug*;25(2):301-13.
- Herbst RA**, Herbst RA, Nobori T, Cavenee WK, Carson DA, Arden KC, (1994). Dinucleotid repeat polymorphism adjacent to CDKN2. *Human Molecular Genetics 3*, 2265.
- Herlyn M**, Shih IM (1994). Interactions of melanocytes and melanoma cells with the microenvironment. *Pigment Cell Res Apr*;7(2):81-8.
- Hildebrandt T**, Preiherr J, Klostermann S, Kaul S, Zendman AJW, van Muijen GNP, Weidle UH (1999). Identification of URIM, a novel gene up-regulated in metastasis. *Anticancer Research 19*: 525-530.
- Hildebrandt T**, Preiherr J, Tarbé N, Klostermann S, van Muijen GNP and Weidle UH (2000). Identification of THW, a putative new tumor suppressor gene. *Anticancer Research 20*: 2801-2801.
- Hildebrandt T**, van Muijen GNP, van Dijk MCRF and Weidle UH. Loss of heterozygosity of gene THW is frequently found in melanoma metastases. *Anticancer Research*, submitted.
- Holly EA**; Kelly JW; Shpall SN; Chiu SH (1987). Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J-Am-Acad-Dermatol. Sep*; 17(3): 459-68.
- Horiskoshi T**, Ito S, Wakamatsu K, Onodera H, Eguchi H, (1994). Evaluation of melanin-related metabolites as markers of melanoma progression. *Cancer 73*: 629-636.
- Holzmann B**, Brocker EB, Lehmann JM, Ruiter DJ, Sorg C, Riethmuller G, Johnson JP, (1987). Tumor progression in human malignant melanoma: five stages defined by their antigenic phenotypes. *Int J Cancer Apr 15*;39(4):466-71.
- Horoszewicz JS**, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP, (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma.: *Cancer Res. Apr*: 43 (4), P: 1809-18.
- Hrelia S**, Bordoni A, Biagi PL, Galeotti T, Palombini G, Masotti L (1994). The role of delta-6- and delta-9-desaturase in the fatty acid metabolism of hepatomas with different growth rate *Biochem Mol Biol Int Oct*;34(3):449-55.

Hsu MY; Wheelock MJ; Johnson KR; Herlyn M, (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J-Investig-Dermatol-Symp-Proc.* Apr; 1(2): 188-94.

Huettner PC, Gerhard DS, Li L, Gersell DJ, Dunnigan K, Kamarasova T and Rader JS (1998). Loss of heterozygosity in Clinical Stage IB cervical carcinoma: relationship with clinical and histopathologic features. *Human Pathol* 29: 364-370.

Humphries MJ, Olden K, Yamada KM, (1986). A sythetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murin melanoma cells. *Science* 233:467-470.

Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H (1998). The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* Dec 21;188(12):2357-68.

Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, Sasada R, Miyake M, (1993). Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J. Exp. Med.* 177:1231-1237.

Jeffcoat R, James AT (1978). The control of stearyl-CoA desaturase by dietary linoleic acid. *FEBS Lett* Jan 1;85(1):114-8.

Johnson JP, Lehmann JM, Stade BG, Rothbacher U, Sers C, Riethmüller G, (1989). Functional aspects of three molecules associated with metastasis development in human malignant melanoma. *Invasion Metastasis* 9: 338.350.

Johnson JP, (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene familie and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 10:11.

Johnson DG, Cress WD, Jakoi L, Nevis JR, (1994). Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12823-128.

Kaku-T; Sonoda-K; Kamura-T; Hirakawa-T; Sakai-K; Amada-S; Ogawa-S; Kobayashi-H; Nakashima-M; Watanabe-T; Nakano-H, (1999). The prognostic significance of tumor-associated antigen 22-1-1 expression in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Clin-Cancer-Res.* 1999 Jun; 5(6): 1449-53.

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis in of many tumor types. *Science* 264, 436-440.

Kates M, Tupper S; Wong PT; Tanphaichitr N, (1994). Interaction of divalent cations with germ cell specific sulfogalactosylglycerolipid and the effects on lipid chain dynamics. *Biochemistry.* 1994 Nov 15; 33(45): 13250-8.

Kirby ML, Waldo KL, (1990). Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation* Aug; 82(2):332-40.

Kishimoto Y, Hiraiwa M, O'Brien JS (1992). Saposins structure, function, distribution, and molecular genetics. *Lipid Res Sep*;33(9):1255-67.

Koh HK (1991) Cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 325: 171-182.

Kolesnick RN, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, (1994). The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation *Biochem Cell Biol* Nov-Dec;72(11-12):471-4.

Kozak M, (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm-Genome*. Aug; 7(8): 563-74.

Kress S, Sutter C, Strickland PT, Mukhtar H, Schweizer J, Schwarz M (1992). Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res*. 52, 6400-6403.

Kristensen CA., Kristjansen PE, Brunner N, Quistorff B, Spang-Thomsen M, (1995). Growth inhibition in response to estrogen withdrawal and tamoxifen therapy of human breast cancer xenografts evaluated by in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy, creatine kinase activity, and apoptotic index. *Cancer-Res*. Sep 15, VOL: 55 (18), P: 4146-50.

Kunzmann R, Holzel F, (1987). Karyotype alterations in human ovarian carcinoma cells during long term cultivation and nude mouse passage. *Cancer Genet. Cytogenet*. Oct, VOL: 28 (2), P: 201-12.

Lee SW, Tomasetto C, Paul D, Keyomarsi K, Sager R, (1992). Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J Cell Biol*. 118: 1213-21.

Leibovitz A., Stinson JC, McCombs WB-3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND, (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer-Res*. Dec: 36 (12), P: 4562.

Leonessa F, Boulay V, Wright A, Thompson EW, Brunner N, Clarke R, (1992). The biology of breast tumor progression. Acquisition of hormone independence and resistance to cytotoxic drugs. *Acta Oncol* 31(2):115-23.

Li J, Ding SF, Habib NA, Fermor BF, Wood CB, Gilmour RS, (1994). Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer* May 1;57(3):348-52.

Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M, (1993). Cloning of differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-951.

Liang P, Pardee AB, (1992). Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-970.

Liang P, Pardee AB, (1994). Method of Differential Display. *Methods in Mol. Genetics* 5: 3-16

- Liang P**, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R and Pardee AB, (1992). Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res* 52: 6966-6968.
- Liang P**, Averboukh L, Keyomarsi K and Pardee AB, (1994). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 21: 3269-3275.
- Liotta LA.**, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V Garbis S, (1981). Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res.* 41: 4629-4636.
- Lu J**, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ, (1997). Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Mol Carcinog* Oct;20(2):204-15
- Luca M**, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar Eli M, (1997). Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis *Am J Pathol* 151: 1105-1113.
- Lorain S**, Quivy JP, Monier-Gavelle F, Scamps C, Lécluse Y, Almouzin G, Lipinski M, (1998). Core histones and HIRP3, a novel histone-binding protein, directly interact with WD repeat protein hIRA. *Molecular and Cellular Biology* 18:5546-5556
- Maecker HT**, Todd SC, Levy S, (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 11: 428-42.
- Magnaghi P**, Roberts C, Lorain S, Lipinski M, Scambler PJ, (1998). HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3. *Nature Genetics* 20: 74-77.
- Miele M**, Jewett MD, Goldberg SF, Hyatt DL, Morelli C, Gualandi F, Rimesi P, Hicks DJ, Weissman B, Barbanti-Brodano G and Welch DR, (2000). A human melanoma metastasis-suppressor locus maps to 6q16.3 - q23. *Int J Cancer* 86: 524-528.
- Mignatti P**, Rifkin DB, (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73: 161-195.
- Millikin D**, Meese E, Vogelstein B, Witkowski C and Trent J, (1991). Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Research* 51: 5449-5453.
- Mischiati C**, Feriotto G, Borgatti M, Giacomini P, Gambari R (2000). Characterization of a major histocompatibility complex class II X-box-binding protein enhancing tat-induced transcription directed by the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* Oct;74(19):8989-9001.
- Miyake M**, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Itoi S, Koh T, Taki T.(1995). Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res.* 55: 4127-31.

- Miyamoto S**, Chiorini JA, Urcelay E, Safer B (1996). Regulation of gene expression for translation initiation factor eIF-2 alpha: importance of the 3' untranslated region. *Biochem J* May 1;315 (Pt 3):791-8.
- Moore M**, (1985). Natural immunity to tumours--theoretical predictions and biological observations. *Br J Cancer* Aug;52(2):147-51.
- Mou L**, Miller H, Li J, Wang E and Chalifour L, (1994). Improvements of the differential display method for gene analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:564-569.
- Naef R**, Suter U, (1998). Many facets of the peripheral myelin protein PMP22 in myelination and disease. *Microsc Res Tech.*; 41: 359-71.
- Natali PG.**, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicrota MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M, Ferrone S (1997). Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* 57:1554.
- Nesbit M**, Herlyn M, (1994). Adhesion receptors in human melanoma progression. *Invasion Metastasis* 14: 131-146.
- Nicolson GL**, Dulski KM, Trosko JE, (1988). Loss of intercellular junctional communication correlates with metastatic potential in mammary adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 473-6.
- Nicolson GL**, Gallick GE, Dulski KM, Spohn WH, Lembo TM, Tainsky MA, (1990) Lack of correlation between intercellular junctional communication, p21rasEJ expression, and spontaneous metastatic properties of rat mammary cells after transfection with c-H-rasEJ or neo genes. *Oncogene.* 5: 747-53.
- Nishimura N**, Saito S, Kubota Y, Moto ON, Taguchi K, Yamazaki K, Watanabe A, Sasaki H (1993). Newly established human pancreatic carcinoma cell lines and their lectin binding properties. *Int-J-Pancreatol* Feb: 13 (1), P: 31-41,
- Noviello C**, Courjal F and Theillet C, (1996). Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6 in breast cancer: possibly four regions of deletion. *Clin Cancer Research* 2: 1601-1606.
- Obeid LM**, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA, (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* Mar 19;259 (5102):1769-71.
- Orfanos CE**; Jung EG; Rassner G; Wolff HH; Garbe C, (1994). Position and recommendations of the Malignant Melanoma Committee of the German Society of Dermatology on diagnosis, treatment and after-care of malignant melanoma of the skin. *Status* 1993/94. *Hautarzt.* 1994 May; 45(5): 285-91.
- Padgett RA**, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA, (1986). Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* 55:1119-50.

- Pardee AB**, (1994). Growth dysregulation in cancer cells. *Advances in Cancer Res* 65: 213-227.
- Piepkorn MW**, (1994). Genetic basis of susceptibility to melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31, 1022-1039.
- Pöllänen J**, Stephens RW, Vaheri A (1991). Directed plasminogen activation at the surface of normal malignant cells. *Adv Cancer Res* 50:273-328.
- Ray ME**, Su YA, Meltzer PS and Trent JM (1996). Isolation and characterization of genes associated with chromosome-6 mediated tumor suppression in human malignant melanoma. *Oncogene* 12: 2527-2533.
- Renade K**, Hussussian CJ., Sihorski RS (1995). Mutations associated with familial melanoma impair p16^{ink4} funktion. *Nat Genet* 10:114-116.
- Reuning U**, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M.(1998). Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol.* 13: 893-906.
- Robbins J**, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* Feb 8;64(3):615-23.
- Robertson GP**, Coleman AB and Lugo TG, (1996). Mechanisms of human melanoma growth and tumor suppression by chromosome 6. *Cancer Res* 56: 1635-1641.
- Rodeck U**, Becker D, Herlyn M. (1991). Basic fibroblast growth factor in human melanomas. *Cancer Cells* 3: 308-311.
- Saiki RK**; Gelfand DH; Stoffel S; Scharf SJ; Higuchi R; Horn GT; Mullis KB; Erlich HA, (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* Jan 29; 239(4839): 487-91.
- Sauter ER**, Herlyn M (1998). Molecular biology of human melanoma development and progression. *Mol Carcinog* Nov;23(3):132-43
- Scambler PJ**, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Sphrintzen R, Wilson DI, Goodship JA, CrossIE, Burn J (1992). Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet* 339:1138-39.
- Schadendorf D**, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM, (1993). Interleukin 8 (IL-8) produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 151: 2667-26-75.
- Schafer BW**, (1998). Emerging Roles for PAX Transcription Factors in Cancer Biology. *Gen. Physiol. Biophys* 17:211-224.

- Schiemann S**, Ruckels M, Engelholm LH, Schwirzke M, Brunner N, Weidle UH.: Differential gene expression in human mammary carcinoma cells: identification of a new member of a receptor family. *Anticancer Res.* 1997 (a); 17: 13-20.
- Schmid P**, Itin P, Ruffli T, (1995). In situ analysis transforming growth factor-beta s) TGF-beta-1, TGF-beta-2, TGF-beta-3), and TGF-beta type 2 receptor expression in malignant melanoma. *Carcinogenesis* 16:1499-1503.
- Scholl T**, Stevens MB, Mahanta S, Strominger JL, (1996). A zinc finger protein that represses transcription of the human MHC class II gene, DPA. *Immunol Feb* 15;156(4):1448-57.
- Scotto J**, Fears TR, (1987). The association of solar ultraviolet and skin melanoma incidence among caucasians in the United States *Cancer Invest* 5: 275-283.
- Semple TU**, Quinn LA, Woods LK, Moore GE (1978). Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res* May;38(5):1345-55.
- Shaw G**, Kamen R (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* Aug 29;46(5):659-67.
- Shih IM**, Elder DE, Hsu MY, Herlyn M, (1994). Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes. *Am J Pathol* Oct;145(4):837-45.
- Si Z**, Hersey P, (1993). Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversevely related to metastatic potential of melanoma. *Int. J. Cancer* 54:37-43.
- Simonsen CC**, Levinson AD, (1983): Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen gene by using simian virus 40-hepatitis B virus chimeric plasmids. *Mol Cell Biol* Dec;3(12):2250-8.
- Smith RN**, (1995) Accurate size comparison of short tandem repeat alleles amplified by PCR. *BioTechniques* 18: 122-128.
- Sober AJ**, Albert LS; (1990). Metastasis of an untreated thin melanoma in a very elderly patient. *Int-J-Dermatol.* 1990 Nov; 29(9): 669.
- Srivastava A**, Laidler P, Hughes LE., Woodcock J, Shedden EJ, (1986). Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quatitative morphological and Doppler ultrasound study *Eur J Clin Oncol* 22: 1205-1209.
- Strittmatter P**, Spatz L, Corcoran D, Rogers MJ, Setlow B, Redline R (1974). Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci U S A* Nov;71(11):4565-9.
- Suter U**, Snipes GJ. (1995): Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. *J Neurosci Res.* 40: 145-51.

- Srikantan V**, Sesterhenn IA, Davis L, Hankin GR, Avallone FA, Livezey JR, Connely R, Mostofi FK, McLeod DG, Moul JW, Chandrasekharappa SC and Srivastava S, (1999). Allelic loss on chromosome 6q in primary prostate cancer. *Int J Cancer* 84: 331-335.
- Soule HD**, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J-Natl-Cancer-Inst Nov*: 51 (5), P: 1409-16.
- Strech JR**, Gatter KC, Ralfkiaer E, Lane DP, Harris AL, (1991). Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res* 51: 5976-5979.
- Tachibana M**, (1999). A cascade of genes related to Waardenburg Syndrome. *The Society for Investigative Dermatology Symposium Proc.* 4:126-129.
- Testa JE**, Brooks PC, Lin JM, Quigley JP, (1999). Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res.* 59: 3812-20.
- Testi R**, (1996). Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Trends Biochem Sci.* 21:468.
- Thompson EW**, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, Trent JM, Stanbridge EJ., Mc Bride HL., Meese EU., Casey G, Araujo DE., Witkowski CM and Nagle RB, (1990). Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science* 247: 568-71.
- Thompson EW**, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, Shima TB, Torri J, Donahue S, (1992). Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *Journal of cellular physiology* Mar: 150 (3), P: 534-44.
- Tilgen W**, Petzoldt D (Hrsg.) *Fortschritte der operativen und onkologischen Dermatologie, Bd. 10: Operative und konservative Dermato-Onkologie. Neue Ansätze und Strategien.* Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer, S. 271-278.
- Tiku PE**, Gracey AY, Macartney AI, Beynon RJ, Cossins AR (1996). Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* Feb 9;271(5250):815-8.
- Trent JM**, Stanbridge EJ, McBride H, Meese EU, Casey G, Araujo DE, Witkowski CM and Nagle RB, (1998). Tumorigenicity of human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science* 247 568-571.
- Tomlinson MG** und **Wright MD**. (1996). A new transmembrane 4 superfamily molecule in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Evol.* 43: 312-314.
- Tureci O**, Chen YT, Sahin U, Gure AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Sitz G, Old LJ, Pfreundschuh M, (1998). Expression of SSX genes in human tumors. *Int. J. Cancer* 77:19-23.

- Shih IM**, Elder DE, Hsu MY., Herlyn M, (1994). Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression of on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes. *Am J. Pathol.* 145: 837-845.
- Vaccaro AM**, Tatti M, Ciaffoni F, Salvioli R, Barca A, Scerch C, (1997). Effect of saposins A and C on the enzymatic hydrolysis of liposomal glucosylceramide. *J Biol Chem Jul 4;272(27):16862-7.*
- van den Eynde B**, Peeters O, De Backer 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 Duinen SG**, Ruiter DJ, Broecker EB, van der Velde EA, Sorg C, Welvaart K, Ferrone S, (1988). Level of HLA antigens in locoregional metastases and clinical course of the disease in patients with melanoma. *Cancer Res Feb 15;48(4):1019-25.*
- Van Groningen JM**, Bloemers HPJ. and Swart GWM, (1995). Identification of Melanoma Inhibitory Activity and other differentially expressed messenger RNAs in human melanoma cell lines with different metastatic capacity by messenger RNA differential display. *Cancer Res.* 55: 6237-6243.
- van-Helden PD.**, Wiid IJ, Hoal-van-Helden EG, Bey E, Cohen R, (1994). Detection by DNA fingerprinting of somatic changes during the establishment of a new prostate cell line. *Br-J-Cancer Aug; 70 (2).*
- van Muijen GNP**, Cornelissen LM, Jansen CF, Figdor CG, Johnson JP, Brocker EB and Ruiter DJ, (1991). Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice. *Clin. Exp. Metastasis* 9: 259-272.
- van Muijen GNP**, Jansen CPJ, Cornelissen LMAH., Smeets DFCM., Beck JLM and Ruiter DJ, (1991). Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int. J. Cancer* 48: 85-91.
- Van Pel A**, van der Bruggen P, Coulie PG, Brichard VG, Lethe B, van den Eynde B, Uyttenhove C, Renault JC, Boon T, (1995). Genes coding for tumor antigens recognized cytolytic T lymphocytes. *Immunol. Rev* 145:229-250.
- Versteeg R**, Noodermeer IA, Krüse-Wolters M, Ruiter DJ and Schrier PI, (1988). c-myc down-regulates class I HLA expression in human melanomas. *EMBO Journal* 7: 1023-1029.
- Verma RS**, Manikal M, Conte RA and Godec CJ, (1999). Chromosomal basis of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Investigation* 17: 441-447.
- Vogelstein B** und Kinzler KW (1993). The multistep nature of cancer. *TIG* 9:138-141.
- Wagener, C.:** *Molekulare Onkologie* (1999). Thieme Verlag, Stuttgart.

Wahle EW, Davies NT, (1975). Effect of dietary copper deficiency. in the rat on fatty acid composition of adipose tissue and desaturase activity of liver microsomes. *Br J Nutr* Jul;34(1):105-12.

Waters KM, Miller CW, Ntambi JM, (1997). Localization of a polyunsaturated fatty acid response region in stearoyl-CoA desaturase gene. *Biochim Biophys Acta*;1349(1):33-42.

Wang YL, Uhara H, Yamazaki Y, Nikaido T, Saida T, (1996). Immunohistochemical detection of CDK4 and p16ink proteins in in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 134: 269-275.

Wang MH, Flad HD, Bohle A, Chen YQ, Ulmer AJ, (1991). Cellular cytotoxicity of human natural killer cells and lymphokine- activated killer cells against bladder carcinoma cell lines. *Immunology letters* Mar, VOL: 27 (3), P: 191-7.

Wakeling AE, Lippman ME, Clarke R, Brunner N, Frandsen TL, Holst-Hansen C, Bei M, Thompson EW, (1993). MCF7/LCC2: a 4-hydroxytamoxifen resistant human breast cancer variant that retains sensitivity to the steroidal antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Res* Jul 15;53(14):3229-32.

Weiss J, Cavenee WK, Herbst RA, Jung EG, Arden KC, (1994). Point mutations and allelic loss in the TP53 locus of cutaneous malignant melanomas. *Arch. Dermatol. Res.* 286, 417-419.

Weiss J Heine M, Arden KC, Korner B, Pilch H, Herbst RA., Jung EG, (1995). Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas. *Recent Results Cancer Res.*139:137-154

Weidle UH, Wollisch E, Ronne E, Ploug M, Behrendt N, de Vries TJ, Quax PH, Verheijen JH, van Muijen GN, Ruiten DJ: Studies on functional and structural role of urokinase receptor and other components of the plasminogen activation system in malignancy. *Ann Biol Clin (Paris).* 1994; 52: 775-82.

Weidle UH and König B, (1998). Urokinase receptor antagonists: novel agents for the treatment of cancer. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7: 391-403.

Weterman MAJ, Stoop GM, van Muijen GN, Kuznicki J, Ruiten DJ and Bloemers HP., (1992). Expression of calyculin in human melanoma cells correlates with metastatic behavior in nude mice. *Cancer Res* 52: 1291-1296.

Weterman MAJ, van Muijen GNP., Kuznicki J, Ruiten DJ. and Bloemers HPJ, (1993). Thymosin β 10 expression in melanoma cell lines and melanocytic lesions: a new progression marker for human cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* 53: 278-284.

Weterman MAJ, Afubi N, van Dinter IMR., Degen WGJ, van Muijen GNP, Ruiten DJ and Bloemers HPJ, (1995). nmb, a novel gene, is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts. *Int. J. Cancer* 60: 73-81.

Westphal JR, van-t-Hullenaar RG, van-der-Laak JA, Cornelissen IM, Schalkwijk LJ, van-Muijen GN, Wesseling P, de-Wilde PC, Ruiter DJ, de-Waal RM, (1997): Vascular density in melanoma xenografts correlates with vascular permeability factor expression but not with metastatic potential. *Br-J-Cancer*: 76 (5), P: 561-70.

Wickens M, Stephenson P, (1984). Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation. *Science* Nov 30;226(4678):1045-51.

Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M, (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor. *Cell* Sep 23;78(6):1005-15.

Wilming LG; Snoeren CA; van-Rijswijk A; Grosveld F; Meijers C, (1997). The murine homologue of HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human CATCH22 patients. *Hum-Mol-Genet*. 1997 Feb; 6(2): 247-58.

Wilson R, Ainscough R, Anderson K, Baynes K, Berks M, Bonfiels J, Burton J, Connel M, Copey T, Cooper J, (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III_n of *C. elegans*. *Nature* 368: 32-38.

Xie S, Luca M, Huang S, Gutman M, Reich R, Johnson JP, Bar Eli M, (1997). Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. 57: 2295-2303.

Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN (1999). CTp11, a novel member of the family of human cancer/testis antigens *Cancer Res* Dec 15;59(24): 6223-9.

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

Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty SM, (1999). Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem poly adenylation sites *Biochem. J*. 340:255-264.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. N. Blin danke ich sehr für die Erstellung des Erstgutachtens, für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine konstruktive Kritik.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. H. Weidle für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. Peter Gött bedanke ich mich für seine konstruktive Kritik und Übernahme der Prüfung.

Vielen Dank auch an Regina Wartbichler und Dr. Gregor Sagner. Durch die dauernde Hilfsbereitschaft waren die LOH-Untersuchungen überhaupt erst möglich.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Kollegen und Mitdoktoranden Christian Klein, Dirk Demuth, Josef Preiherr, Nesrine Tarbé, Robert deLange, Stefanie Lösch, Tanja Ligensa, Tanja Schneider, Dr. Thorsten Gutjahr, Dr. Andrea Gnirke, Vesna Evtimova und Marina Schwirzke bedanken. Es war eine schöne Zeit mit Euch!

Vielen Dank auch an die nette Arbeitsgruppe in Tübingen.

Besonders möchte ich mich nochmals bei Dr. Tina Schröder, Dr. Andrea Gnirke und Herrn Dipl. Chem. Josef Preiherr bedanken. Ihr habt mir sehr geholfen.

Danke auch an alle meine Freunde. Das ihr nicht vergessen habt und die vielen schönen (und harten!) Stunden auf dem Rad, im Eis, Fels oder Schnee oder einfach so - das hat mir Kraft gegeben.

Bei Mone bedanke ich ganz herzlich für die vielen, vielen Kilometer, die Unterstützung und den Rückhalt den sie mir gegeben haben.

Lieben Dank an meine Eltern und meine Schwester- für alles, was ihr für mich getan habt.

Lebenslauf

Name: Tobias Hildebrandt

Anschrift: Ammerstr. 20
72768 Reutlingen

Geburtstag, -ort 29.07.1965 in Reutlingen

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1972-1976 Grundschule in Reutlingen-Altenburg
1976-1985 Isolde-Kurz-Gymnasium Reutlingen mit dem
Abschluß Abitur

Zivildienst: 1985-1987 im Körperbehindertenverein Reutlingen

Sprachaufenthalt: 1987-1988 in Argentinien und Brasilien

Studium: 1988-1990 Grundstudium der Biologie an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1990 Vordiplom in den Fächern Zoologie, Botanik,
Chemie und Physik
1991 Auslandstudium an der Universidad Nacional de
Cordoba-Argentinien
1994 Diplomprüfung
Hauptfach: Zoologie/Parasitologie
Nebenfächer: Molekulare Genetik
Humanphysiologie

Diplomarbeit: 1994-1995 im Rahmen eines WHO- bzw. EG-Projektes des
Tropenmedizinischen Institutes Tübingen in
Kamerun

Auslandsaufenthalt: 1995-1996 Forschungsaufenthalt an einem
Drittmittelprojekt der Universitäten
Hohenheim und Liverpool (GB) in Kamerun

Dissertation Seit 2. 9. 1996
An der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät
für Anthropologie und molekulare Genetik unter
Anleitung von Prof. Dr. N. Blin
Durchführung der praktischen Arbeiten bei Roche
Diagnostics GmbH, Pharma Research, Penzberg unter
Anleitung von Prof. Dr. U.H. Weidle
Titel: Identifizierung von Tumor-Progressions-Genen
in einem Melanoma Modell System

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Tobias Hildebrandt
Ammerstr. 20
72768 Reutlingen