

Rolle der Transkription und Aktivität von MIA („Melanoma Inhibitory Activity“) im malignen Melanom



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Winklmeier
aus Regensburg

Februar 2009

Promotionsgesuch eingereicht am 9. Februar 2009

Die Arbeit wurde angeleitet von Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff

Prüfungsausschuss:

- | | |
|-----------------|---------------------------------|
| Vorsitzender: | Prof. Dr. Ralph Witzgall |
| 1. Gutachter: | PD Dr. Werner Kremer |
| 2. Gutachterin: | Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff |
| 3. Prüfer: | Prof. Dr. Richard Warth |

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
1 Einleitung	6
1.1 Struktur und Aufbau der Haut	6
1.2 Das maligne Melanom	7
1.2.1 Melanomentwicklung	8
1.2.2 Grundlagen bei der Entstehung des Melanoms	9
1.2.3 Rolle der Transkriptionsfaktoren	10
1.3 Zell-Adhäsionsmoleküle	13
1.3.1 Cadherine	14
1.3.2 Rolle von Cadherinen im malignen Melanom	15
1.4 Rolle von MIA („<i>Melanoma Inhibitory Activity</i>“)	16
1.4.1 Struktur von MIA	18
1.4.2 Rolle von MIA in der Melanomprogression	18
1.5 Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel (Hypoxie)	19
1.5.1 Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF)	20
1.5.2 Struktur von HIF-1 α	21
1.5.3 Genregulation durch HIF-1 α	22
1.5.4 Rolle von Hypoxie in Tumorzellen	25
1.5.5 Rolle der Sauerstoffradikale bei der Regulation von HIF	26
1.6 Ziele der Arbeit	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Allgemeine Materialien	29
2.1.2 Geräte	31
2.1.3 Bakterien	33
2.1.4 Säugerzelllinien	33
2.1.5 Vektoren	33
2.1.6 Oligonukleotide	35
2.1.7 <i>Short Interference RNAs (siRNA)</i>	36

2.2 Medien, Antibiotika und Puffer	36
2.2.1 Medien zur Anzucht von <i>E.coli</i> und Säugerzellkulturen	36
2.2.2 Antibiotika	36
2.2.3 Puffer und Lösungen	37
2.3 Methoden	39
2.3.1. Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	39
2.3.1.1 Kultivierung von <i>E.coli</i>	39
2.3.1.2 Transformation von <i>E.coli</i>	39
2.3.1.3 Herstellung kompetenter Zellen	40
2.3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA	40
2.3.1.5 Isolierung von Plasmid DNA im größeren Maßstab	41
2.3.1.6 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen	41
2.3.2 Molekularbiologische Methoden	41
2.3.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	42
2.3.2.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	42
2.3.2.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	42
2.3.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide	42
2.3.2.6 RNA-Isolation aus Säugerzellen	43
2.3.2.7 Reverse Transkription	43
2.3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.3.2.9 Quantitative Real-time PCR	44
2.3.3 Proteinbiochemische Methoden	45
2.3.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten	45
2.3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	46
2.3.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	46
2.3.3.4 Western Blot	46
2.3.3.5 SELDI-TOF-Massenspektrometrie	47
2.3.3.6 Ko-Immunpräzipitation	47
2.3.3.7 Herstellung von rekombinanten biotinyliertem MIA	48
2.3.4 Zellkulturmethoden	49
2.3.4.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen	49
2.3.4.2 Transfektion von Zellkulturen	49
2.3.4.3 Luciferase-Reportergen-Assay	50

2.3.4.4 Migrations- und Matrigel Invasions-Assay (Boydenkammer)	51
2.3.4.5 Durchflußzytometrische Analyse von Zellen (FACS)	51
2.3.4.6 Proteinnachweis mittels Immunfluoreszenz	52
2.4 Statistische Auswertung	53
3 Ergebnisse	54
3.1 Bedeutung von Cadherin-7 im malignen Melanom	54
3.1.1 Charakterisierung von MIA-Bindungspartnern	54
3.1.2 Expression von Cadherin-7 in Melanomzelllinien	55
3.1.3 Einfluss von Cadherin-7 auf die Migration von Melanomzellen	58
3.1.4 Cadherin-7 reguliert die Expression von MIA	62
3.2 Rolle von CtBP1 im malignen Melanom	63
3.2.1 CtBP1-Zielgene im Melanom	68
3.3 Rolle von HIF-1α im Melanom	71
4 Diskussion	78
4.1 Rolle von Cadherin-7 bei der Melanomprogression	78
4.2 Bedeutung von CtBP1 im malignen Melanom	82
4.3 Regulation der Aktivität von HIF-1α im malignen Melanom	88
5 Literaturverzeichnis	93
6 Abkürzungsverzeichnis	110
7 Danksagung	113
Erklärung	114

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Rolle des sezernierten Proteins MIA („Melanoma Inhibitory Activity“) bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms näher aufgeklärt werden. Dabei wurde die Regulation der Transkription und Aktivität von MIA auf molekularbiologischer Ebene analysiert, um ein besseres Verständnis von der Entstehung des Melanoms zu erlangen.

Es ist bekannt, dass MIA mit Proteinen der extrazellulären Matrix sowie mit Integrinen interagieren kann und so zum Ablösen der Zellen von der Matrix führt. Auf der Suche nach weiteren Interaktionspartnern von MIA wurde mittels SELDI-TOF-Massenspektrometrie und Ko-Immunpräzipitation Cadherin-7 als neuer Bindungspartner identifiziert. Das klassische Zell/Zell-Adhäsionsmolekül Cadherin-7 wird von Melanomzellen gebildet, wobei eine verstärkte Expression im Primärtumor im Vergleich zu metastatischen Zellen festgestellt wurde. Eine Verminderung der Expression von Cadherin-7 in einer Zelllinie aus einem Primärtumor führte dabei zu einer verringerten Migration der Zellen. Die Migrationseffekte, die MIA im Melanom ausübt, konnten durch Überexpression von Cadherin-7 aufgehoben werden. Interessanterweise konnten wir durch Cadherin-7 auch eine Regulation der mRNA-Expression von MIA feststellen, wobei Cadherin-7 die Expression von MIA hemmt. Cadherin-7 kann sowohl die Aktivität als auch die Expression von MIA regulieren und somit die Migration von Melanomzellen beeinflussen. Die Daten deuten darauf hin, dass Cadherin-7 die frühe Entwicklung des Melanoms fördert und dagegen im Laufe der Tumorprogression die Funktion von MIA an Bedeutung gewinnt.

Um die transkriptionelle Regulation von MIA weiter zu untersuchen, wurde der Ko-Repressor CtBP1 analysiert. Von unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass CtBP1 in Melanozyten exprimiert wird und hier die Expression von MIA hemmt. In CtBP1-exprimierenden Zellklonen konnte die Expression von MIA und das Metastasierungspotential der Melanomzellen reduziert werden. In weiteren Analysen entdeckten wir im Melanom eine Spleißvariante des Transkriptionsfaktors CtBP1. Es zeigte sich hierbei, dass diese Spleißvariante nicht mehr an TCF4, das die Expression von MIA reguliert, und an Snail binden kann. Somit kann in Melanomzellen die Repressorfunktion von CtBP1 nicht mehr ausgeübt werden.

Um die Effekte von CtBP1 besser verstehen zu können, haben wir mögliche Zielgene untersucht, die im Melanom stark exprimiert werden. Basierend auf Microarray-Daten haben wir uns auf 14 Gene fokussiert, wobei von den meisten Genen bereits bekannt ist, dass sie an der Metastasierung von Tumoren beteiligt sind. Es ist sehr interessant, dass elf Gene Expressionsmuster besitzen, die mit der Invasivität von Melanomzellen in Einklang gebracht werden können. Dieser Teil der Arbeit zeigte, dass eine verminderte Expression von CtBP1 mit dem Potential zur Migration und Invasion von Melanomzellen korreliert, wobei die Spleißvariante von CtBP1 die Expression von MIA nicht inhibieren kann.

Weitere Untersuchungen im Rahmen dieses Projekts zeigten, dass die Aktivität von CtBP1 durch Hypoxie reguliert wird. Der Transkriptionsfaktor HIF ist der entscheidende Regulator für die Effekte bei Sauerstoffmangel, wobei HIF auch bei der Tumorprogression von Bedeutung ist. Interessanterweise stellte sich heraus, dass im Melanom im Vergleich zu anderen Tumoren bereits unter normalen Sauerstoffbedingungen eine hohe Aktivität eines HRE-Reporter-Konstrukts, das mehrere HIF-Bindestellen enthält, vorliegt. Durch Versuche mit siRNAs und Inhibitoren stellte sich heraus, dass HIF-1 α für eine Hypoxie-unabhängige Regulation von Genen im Melanom verantwortlich zu machen ist. Das Protein HIF-1 α weist dabei im Melanom neben vermehrter Aktivität auch eine hohe Stabilität auf.

Um die Analysen der Hypoxie-unabhängigen Regulation von HIF-1 α im Melanom zu vertiefen, schlossen wir eine Behandlung der Melanomzellen mit Radikalfängern an. Es zeigte dabei eine deutliche Verringerung der Aktivität von HIF-1 α , so dass eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an diesem Effekt aufgezeigt wurde. Über weitere Analysen wurde festgestellt, dass ROS den Transkriptionsfaktor NF κ B, der im Melanom stark exprimiert wird, induzieren und so für die hohe Aktivität von HIF-1 α von Melanomzellen unter Normoxie verantwortlich ist. Diese hohe Aktivität von HIF-1 α kann die Tumorprogression des malignen Melanoms fördern.

Zusammenfassend konnte diese Promotionsarbeit weitere Aspekte der Regulation der Transkription und Aktivität von MIA im malignen Melanom aufklären. Zusätzlich konnten weitere wichtige Regulationsmechanismen, die an der Entwicklung des Melanoms beteiligt sind, aufgeklärt werden.

1 Einleitung

1.1 Struktur und Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und dient als Abgrenzung gegen äußere Einflüsse. Sie schützt den Körper vor Beeinflussung durch die Umwelt wie Kälte, Hitze, chemischen Schädigungen und dem Eindringen von Mikroorganismen [Review 1]. Außerdem regelt die Haut den Flüssigkeitshaushalt des Körpers, indem sie ihn vor dem Verlust von Wasser und Wärme schützt. Ebenso kann sie über Rezeptoren Druck- und Temperaturreize wahrnehmen. Die Haut gliedert sich in drei Hauptschichten. Die epitheliale Epidermis (Oberhaut) ist die äußerste Schicht und gliedert sich in fünf weitere Bereiche auf. Sie besteht zu 90% aus Keratinozyten, den hornbildenden Zellen, die Keratin produzieren und der Haut Festigkeit verleihen. Die oberen drei Schichten bestehen aus verhornten, abgestorbenen Zellen [Review 2]. Zudem liegen in der Basalzellschicht die pigmentbildenden Zellen, die Melanozyten (Abb. 1-1). Die Keratinozyten kontrollieren das Wachstum der Melanozyten, indem sie mit ihnen ungefähr in einem Verhältnis von 5:1 in direktem Kontakt stehen [Review 3]. Die Melanozyten entstammen in der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste und wandern in die Haut ein [Review 4]. Sie synthetisieren das dunkle Pigment Melanin und geben es über Melanosomen an die umgebenden Keratinozyten ab. Melanin stellt einen wichtigen Schutz der Haut gegenüber UV-Licht dar [Review 3]. In der Epidermis kommen keine Nerven und Blutgefäße vor.

Die Basalmembran trennt die Epidermis von der Dermis (Corium, Lederhaut) und besteht vorwiegend aus Bindegewebsfasern. Sie ist der Ursprung der Talg- und Schweißdrüsen und versorgt die Epidermis über Blutgefäße. Des Weiteren enthält sie unter anderen glatte Muskulatur, Lymphozyten, Fibroblasten sowie Rezeptoren für Wärme und Tastsinn. Die Subcutis (Unterhaut) besteht aus lockerem Bindegewebe und bildet die Unterlage für die darüberliegenden Hautschichten. Sie enthält die größeren Blutgefäße und Nerven sowie mechanorezeptorische Sinneszellen [Reviews 2, 3].

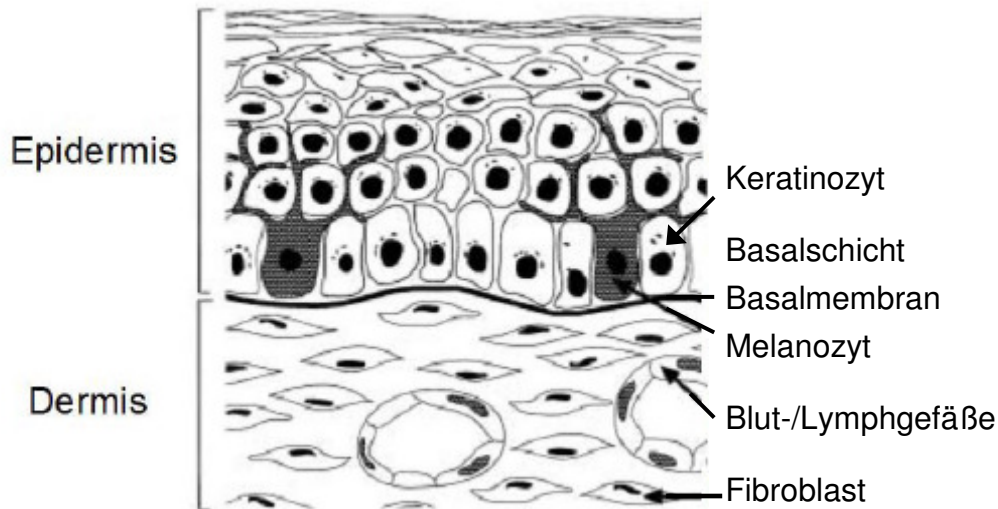


Abbildung 1-1: **Schematischer Aufbau der Haut** (modifiziert nach Hsu *et al.*, 2002) [3]

1.2 Das maligne Melanom

Beim malignen Melanom, das auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnet wird, handelt es sich um einen bösartigen Tumor, der durch Entartung der pigmentbildenden Melanozyten entsteht. Er tritt überwiegend in der Haut auf, kann sich aber auch im Auge, den Hirnhäuten und Schleimhäuten manifestieren. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei etwa 50 bis 55 Jahren, wobei immer häufiger auch jüngere Menschen an einem Melanom erkranken. Weltweit ist eine deutliche Zunahme der Inzidenz des malignen Melanoms zu beobachten [5, 6]. Es gehört zu den hochmalignen Tumoren und ist für etwa 80% aller Todesfälle durch Hautkrebs verantwortlich, obwohl es nur einen Anteil von 4% aller dermatologischen Krebsarten ausmacht [7]. Der Grund dafür ist die Fähigkeit schon bei sehr geringen Tumorumfängen Metastasen bilden zu können und der damit verbundenen schlechten Prognose sowie dem Fehlen von erfolgreichen Behandlungstherapien [5-7]. Da die meisten Melanome weiter Pigment bilden, sind sie an seiner schwarzen und unregelmäßigen Oberfläche auf der Haut erkennbar. Maligne Melanome lassen sich histopathologisch in vier Subtypen unterteilen [8]:

Das superfiziell spreitende Melanom (SSM, ca. 60%) ist die häufigste Form des malignen Melanoms und manifestiert sich als asymmetrische Hautveränderung mit unscharfer Begrenzung und unregelmäßiger Pigmentierung. Es wächst langsam horizontal in der Hautebene und kommt hauptsächlich am Rumpf vor. Wird das SSM frühzeitig erkannt, bestehen gute Heilungschancen.

Beim nodulären Melanom (NM, 20%) handelt es sich um die aggressivste Form des Melanoms mit der ungünstigsten Prognose. Es zeichnet sich durch schnelles vertikal-invasives Wachstum aus und tritt gehäuft ab dem 55. Lebensjahr auf.

Das lentigo maligna Melanom (LMM, 10%) ist meist an lichtexponierten Stellen wie im Gesicht lokalisiert und kommt vor allem bei älteren Menschen ab 65 Jahren vor. Da es recht langsam wächst und es erst spät zum vertikalen Wachstum kommt, hat es eine relativ günstige Prognose.

Das akrolentiginöse Melanom (ALM, 5%) ist an Händen und Füßen lokalisiert und tritt bevorzugt bei dunkelhäutigen Menschen auf. Neben diesen Hauptgruppen existieren weitere, selten Formen des Melanoms wie das amelanotische, das aufgrund fehlender Pigmentierung schlecht diagnostizierbar ist [5, 6, 9, 10].

Den wichtigsten Auslöser für die Entstehung des Melanoms stellen die durch UV-Strahlung ausgelösten Sonnenbrände dar. Weitere Risikofaktoren sind helle Hauttypen, die Anzahl der Nävuszellnävi (Muttermale) und die genetische Veranlagung der jeweiligen Person [Review 11].

1.2.1 Melanomentwicklung

Die Entwicklung des metastasierenden Melanoms aus entarteten Melanozyten lässt sich aufgrund von histopathologischen Merkmalen nach dem Modell von Clark *et al.* in fünf Stufen gliedern (Abb. 1-2), mit denen morphologische und genetische Veränderungen einhergehen [Review 12, 13, Review 14]. Als erste Stufe werden normale, angeborene (kongenitale) melanozytäre Nävi angesehen, die nur selten entarten. Beim normalen Nävus handelt es sich um eine gutartige Fehlbildung der Haut, die durch Proliferation der Melanozyten entstehen. Dysplastische (atypische) Nävi weisen bereits strukturelle Veränderungen auf und werden als Vorläufer des Melanoms angesehen. Es kommt zu einer Ansammlung von atypischen Zellen, die bereits ihre dendritischen Ausläufer verloren haben. In der radialen Wachstumsphase des Melanoms breiten sich Zellen in der Epidermis aus, können aber noch nicht metastasieren. Erst in der vertikalen Wachstumsphase durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran, wandern in die Dermis ein und haben die Fähigkeit, zu metastasieren. Das metastasierende Melanom kann sich in der letzten Entwicklungsphase sowohl über die Blutbahn als auch über Lymphgefäße im Körper ausbreiten. Bei der Melanomentstehung können auch einzelne Stufen übersprungen werden. Auch

die direkte Entwicklung eines Melanoms durch maligne Transformation von normalen Melanozyten wurde inzwischen beschrieben [5, 13] [Reviews 3, 7, 15].

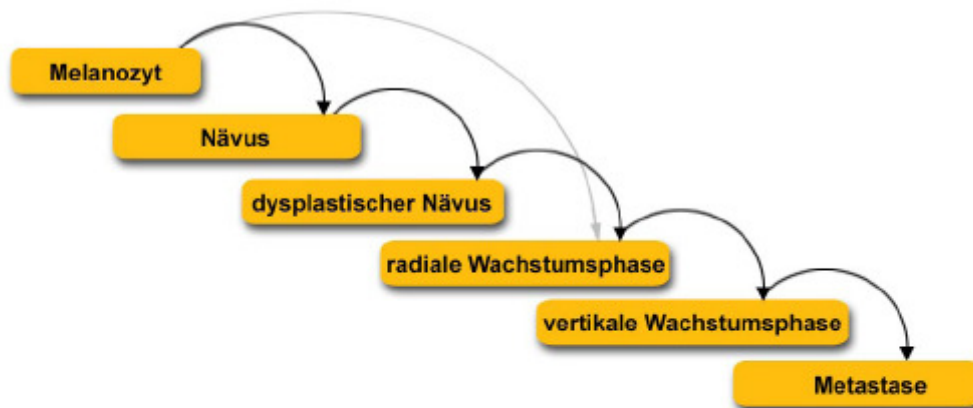


Abbildung 1-2: **Modell der Melanomentwicklung**

Die Entstehung des Melanoms findet gewöhnlich ausgehend vom differenzierten Melanozyten in fünf Stufen statt (verändert nach Clark *et al.*, 1984, Meier *et al.*, 1998) [13, 14].

Solange sich noch keine Metastasen gebildet haben, richtet sich die Prognose des Patienten sich vor allem nach der Tumordicke. Bei einer Tumordicke < 0.75 mm beträgt die 10-Jahresüberlebenschance noch etwa 97%. Schon bei Melanomen ab 4 mm Dicke sinkt die Überlebensrate auf unter 50% [16]. Bislang ist die frühzeitige chirurgische Entfernung des Tumors die einzige effektive Therapie. Sobald sich Metastasen in den Organen ausgebreitet haben, ist Überlebenschance des Patienten nur noch sehr gering. Da der fortgeschrittene Tumor sehr resistent gegenüber konventionellen Chemo- und Radiotherapien ist [Reviews 17, 18], müssen neuartige Therapien gegen das Melanom entwickelt werden.

1.2.2 Molekulare Grundlagen bei der Entstehung des Melanoms

Melanome entstehen durch Entartung von Melanozyten, wobei das bestehende Gleichgewicht aus Differenzierung, Apoptose und Proliferation gestört wird. Während der Entartung der Melanozyten zu Melanomzellen entziehen sich diese der Kontrolle der Keratinozyten, werden autonom und können sich aus gewöhnlichen Zellverbänden lösen. Aus molekularbiologischer Sicht kommt es während der Tumorentwicklung zu einer unkontrollierten Proliferation von Melanomzellen. Dafür können Defekte in Reaktion auf Wachstumsfaktoren und Zytokine verantwortlich gemacht werden, die zu einem autonom gesteuertes

Wachstum der Melanomzellen führen. Die autokrinen Wachstumsfaktoren fördern die eigene Proliferation und Migration, wohingegen parakrine Wachstumsfaktoren das Wachstum der den Tumor umgebenden Zellen (u.a. Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen) sowie die Produktion tumorrelevanter Faktoren von diesen Zellen fördern [Review 19].

Veränderte Signaltransduktionen spielen bei der Entwicklung des Melanoms ebenfalls eine bedeutende Rolle. Im Melanom ist sowohl der MAPK- (mitogen-activated protein kinase) als auch der PI3K/AKT- (phosphatidylinositol-3 kinase) Signalweg konstitutiv aktiviert, welche zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Invasivität regulieren [Review 20]. Über eine Deregulation von Transkriptionsfaktoren kann es so zur Expression von Onkogenen sowie zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen kommen, die an der Tumorentwicklung beteiligt sind. Zusätzlich kann über antiapoptotische Moleküle wie Bcl-2 die Apoptose unterdrückt werden, sodass das Überleben von Melanomzellen gefördert wird [Review 21].

Bei der Metastasierung von Tumorzellen kommt es während Migration zu einem veränderten Adhäsionsverhalten dieser Zellen [22]. Bei der anschließenden Invasion der Tumorzellen wird die Matrix degradiert. Dafür verantwortlich sind hauptsächlich Proteine der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie Cathepsine und Serinproteasen (uPA, tPA) [Reviews 23, 24]. Später, zum Erhalt des Tumors, muss die Versorgung sichergestellt werden, wobei die Prozesse der Angiogenese und der zellulären Antwort auf Hypoxie von Bedeutung sind.

Dieser Abschnitt soll nur einen kurzen Überblick über die molekularen Grundlagen bei der Entstehung des Melanoms geben. Auf die Rolle der Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, dem melanomspezifischen Molekül MIA und der Hypoxie wird im folgendem noch in eigenen Kapiteln näher eingegangen, da es sich hierbei um wichtige Aspekte dieser Arbeit handelt.

1.2.3 Rolle der Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind bei der Regulation der Genexpression von großer Bedeutung. Die veränderte Aktivität und Expression von Transkriptionsfaktoren kann das Zellwachstum, Differenzierung, Angiogenese und Apoptose beeinflussen und letztendlich die Tumorentstehung und Metastasierung fördern.

Im folgendem wird auf einige Transkriptionsfaktoren eingegangen, die eine wichtige Rolle bei der Progression des Melanoms spielen.

Von großer Bedeutung im Melanom ist der Transkriptionsfaktor **NFκB** (nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells). NFκB ist ein homo- oder heterodimerer Komplex, der aus Proteinen der Rel-Familie besteht. Diese Proteine besitzen die Rel-Homologie-Domäne (RHD), die für die Dimerisierung sowie für die DNA-Bindung zuständig ist. Die RHD enthält auch das Kernlokalisierungssignal (NLS), welches von IκB-Proteinen erkannt wird. Es existieren die Mitglieder p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 und p52/p100, wobei das Dimer p65/p50 im Säugetier am häufigsten vorkommt [Review 25]. NFκB kann durch verschiedene Stimuli wie Bakterien, Viren, inflammatorische Zytokine (TNFα, Interleukine), oxidativen und physikalischen Stress sehr schnell aktiviert werden [Review 26]. Über aktivierte Proteinkinasen wie AKT, MEKK2 oder NIK wird IκB, welches an NFκB bindet und inaktiviert, phosphoryliert. Daraufhin wird IκB ubiquitiniert und proteosomal abgebaut. Das freie NFκB kann nun phosphoryliert werden und in den Zellkern translozieren, wo es an den Promotor der Zielgene binden und diese aktivieren kann. Im Melanom ist NFκB konstitutiv aktiv und kann die Expression vieler Zielgene induzieren, die zum Fortschreiten der Melanomentwicklung beitragen. Es werden Gene aktiviert, die beim Schutz vor Apoptose (TRAF 1/2, IAP 1/2, Bcl2), bei der Proliferation (Cyclin D1), Angiogenese (VEGF) sowie bei der Metastasierung (N-Cadherin, ICAM1) eine Rolle spielen [27-30].

Die Proteine der high mobility group (**HMG**) besitzen eine „HMG-Box“ als DNA-Bindedomäne [31]. Die HMG-Proteine binden ungewohnt für Transkriptionsfaktoren unspezifisch an die Linker-DNA zwischen zwei Nukleosomen oder wie HMG-14/-17 an den Nukleosomen-Kern. Dadurch bilden sich ungewöhnliche, dreidimensionale Strukturen von Chromatin aus, sodass HMG-Proteine auch an der Transkriptionsregulation durch andere Transkriptionsfaktoren beteiligt sind [30]. Das Protein HMGB1 ist in Tumoren besonders von Bedeutung, wobei es auch an der Regulation von MIA (melanoma inhibitory factor), das bei der Progression des Melanoms eine bedeutende Rolle spielt (siehe Kapitel 1.4), beteiligt ist. HMGB1 ist im Melanom hochreguliert, kann spezifisch an den MIA-Promotor binden und die Expression von MIA

induzieren. HMGB1 fördert somit die Invasion von Melanomzellen [Review 30, 32].

Die Transkriptionsfaktoren der **LEF/TCF** (lymphoid enhancer factor/T-cell-specific factor) Familie sind meist in den Wnt-Signalweg involviert. Bislang sind in Säugetiere die vier Mitglieder LEF-1, TCF-1, TCF-3 und TCF-4 bekannt, die ebenfalls eine homologe „HMG-Box“ DNA-Bindedomäne besitzen [30, 33]. Studien haben gezeigt, dass Proteine der TCF-Familie als Tumorinduktoren gelten. β -catenin fungiert dabei als Koaktivator, indem es an Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie bindet und die Zielgene wie c-myc und Cyclin D1 transaktiviert. Die genaue Rolle von β -catenin bei der Regulation der Transkription im malignen Melanom wird aktuell noch diskutiert. TCF kann auch als negativer Regulator an die Proteine CBP, CtBP und Groucho binden und die Transkription der Zielgene verhindern [Reviews 30, 34].

Der transkriptionelle Ko-Repressor **CtBP1** (C-terminal binding protein 1), dessen Rolle in dieser Arbeit untersucht wurde, ist an vielen molekularen Prozessen bei der Tumorigenese beteiligt. Es wurde ursprünglich als zelluläres Protein entdeckt, dass an den C-Terminus des Adenovirusproteins E1A bindet [35]. Zur Familie der CtBP-Proteine sind bislang jeweils zwei Spleißvarianten von CtBP1 (CtBP1 und CtBP/BARS) und CtBP2 (CtBP2 und RIBEYE) bekannt. CtBP1 wurde als ein Transkriptionsfaktor charakterisiert, wohingegen das zu 97% homologe CtBP/BARS, dem elf Aminosäuren am N-Terminus fehlen, eine Rolle bei der Aufrechterhaltung und Abspaltung der Golgi-Membran spielt [36-38]. CtBPs besitzen über ihre zentrale Domäne eine hohe Homologie zu NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasen. Diese Domäne hat eine bedeutende Rolle für die Dimerisierung von CtBP. Es können sich dabei Homo- und Heterodimeren von CtBP1 und CtBP2 bilden [39, 40]. CtBPs erkennen nach der Dimerisierung das PXDLS-Motiv (Pro-X-Asp-Leu-Ser) von DNA-bindenden Proteinen, entweder direkt oder über andere Proteine wie CtIP, RIP140 oder Histondeacetylasen [Review 36, 41]. Inzwischen wurde in DNA-bindenden Proteinen ein zweites Bindungsmotiv entdeckt, das über die Aminosäuresequenz RRT (Arg-Arg-Thr) an Proteine der CtBP-Familie binden kann [42]. Durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren ist CtBP1 so an der Regulation mehrerer Signalwege beteiligt, die eine Rolle beim Überleben der Zelle und bei der Tumorigenese spielen [Review 43]. CtBP1 wird ubiquitär exprimiert und wurde in meisten

untersuchten Tumorzelllinien detektiert. CtBPs können die Tumorprogression fördern, indem sie mit den Repressoren Snail, SLUG und ZEB/ δ EF1 an Promotoren von Zielgenen binden kann [Review 43]. So kann z.B. über SLUG die Expression des Tumorsuppressors BRCA2 gehemmt werden [43, 44].

Im Melanom ist CtBP1 an der Regulation des Proteins MIA beteiligt (siehe Abschnitt 1.4). In Melanozyten hemmt CtBP1 die Expression von MIA, wohingegen in Melanomzellen die Expression von MIA verloren geht und dadurch die Melanomentwicklung gefördert wird [45].

Die Aktivität der transkriptionellen Regulation von CtBP1 kann auch durch das Verhältnis NADH/NAD^+ in der Zelle moduliert werden und wird daher vermutlich durch den metabolischen Status der Zellen beeinflusst [Review 46]. Unter hypoxischen Bedingungen steigt der Gehalt von intrazellulären NADH an, wodurch das Expressionsmuster der Zelle verändert werden kann. Durch Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 kann so die Apoptose gehemmt werden. Weiterhin ist durch diese Veränderungen des zellulären Metabolismus auch eine Förderung der Migration von Tumorzellen beschrieben worden [47, 48]. Der Vollständigkeit halber erwähne ich an dieser Stelle noch den Transkriptionsfaktor **HIF-1 α** , der bei der Hypoxie in Geweben aber auch in Tumoren von großer Bedeutung ist. Da dieser Transkriptionsfaktor im Fokus meiner Untersuchungen stand, wird die Rolle von HIF-1 α und Hypoxie in einem eigenem Abschnitt beschrieben (Kapitel 1.5).

1.3 Zell-Adhäsionsmoleküle

Epitheliale Zellverbände grenzen Organe und Gewebe von der äußeren Umgebung ab. Zell-Adhäsionsmoleküle (CAMs) vermitteln dabei die Zellkontakte an engen Kontaktstellen in tierischen Geweben. Sie sorgen für den Zusammenhalt der Gewebe und ermöglichen die Kommunikation von Zellen untereinander. Es handelt sich dabei um integrale Membranproteine, die mit ihren extrazellulären Domänen mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten können. Die zwei großen Gruppen von Proteinen, die für die Zell/Zell-Adhäsionen verantwortlich sind, sind die Cadherine und die Proteine der Immunglobulin-Superfamilie (oder N-CAMs). Die heterodimeren Integrine sind dagegen vor allem für die Zell-Adhäsion an die extrazelluläre Matrix verantwortlich. Die Integrine dienen aber auch als Signalüberträger zwischen Zellen und der extrazelluläre

Matrix. Durch Fehlregulation und Verlust der Zell-Adhäsionsmoleküle geht der Zusammenhalt und die geordnete Gewebsstruktur verloren, wodurch sich die Zellen aus dem Gewebsverband lösen können. Zell-Adhäsionsmoleküle sind dadurch an der malignen Progression beteiligt [Reviews 49, 50].

1.3.1 Cadherine

Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die über homophile Interaktionen die Ca^{2+} -abhängige Zell/Zell-Adhäsion im Wirbeltiergewebe vermitteln. Sie kommen in Desmosomen und in Adherens Junctions vor. Sie spielen bei der Entwicklung und Stabilisierung der Gewebe sowie bei der Signaltransduktion eine Rolle [Reviews 51, 52]. Die klassischen Cadherine, die am besten untersucht sind, bestehen aus zwei Typen. Zu den Vertretern der Typ I der klassischen Cadherine gehören E-Cadherin (v.a. in Epithelien), N-Cadherin (v.a. in Neuronen und neuroendokrinen Geweben), P-Cadherin (v.a. in der Plazenta) und R-Cadherin. Zum Typ II gehören alle restlichen klassischen Cadherine (Cadherin-5 und darüber). Es gibt außerdem noch die desmosomalen Cadherine (Desmocolline und Desmogleine), die Protocadherine, Cadherin-verwandte Proteine (FAT-ähnliche Proteine) sowie die 7-Transmembran-Cadherine [Reviews 52, 53].

Gemeinsam sind allen Cadherinen mehrere extrazelluläre Domänen (EC), die für die hochspezifischen und homophilen Interaktionen zwischen den Zellen sorgen (Abb. 1-3). Sie sind nur in Gegenwart von Ca^{2+} stabil, das an die Ca^{2+} -Bindungsstellen zwischen diesen Domänen bindet. Die klassischen Cadherine bestehen aus fünf ähnlichen extrazellulären Domänen EC1 bis EC5, die über kurze Linkersequenzen miteinander verbunden sind. Die direkte Interaktion zwischen den Cadherinen erfolgt dabei nur über die erste extrazelluläre Domäne EC1. Diese enthält eine spezifische Erkennungssequenz, die bei den Typ I der klassischen Cadherinen aus den Aminosäuren His-Ala-Val besteht und für die homophile Interaktion verantwortlich ist [53, Reviews 54]. Intrazellulär sind Cadherine über Catenine mit dem Aktinzytoskelett verknüpft und verleihen so den Geweben die Stabilität.

Cadherine spielen auch bei der Embryogenese eine bedeutende Rolle. Verschiedene Cadherine werden während der Induktion, Migration und Differenzierung der Neuralleistenzellen, von denen die Melanozyten abstammen,

exprimiert. So wird z.B. Cadherin-7, ein klassisches Typ II Cadherin, von den Neuralleistenzellen exprimiert, die vom Neuralrohr wegwandern und ist somit an der Delamination der Neuralleistenzellen beteiligt [Review 55]. Dieses Molekül wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

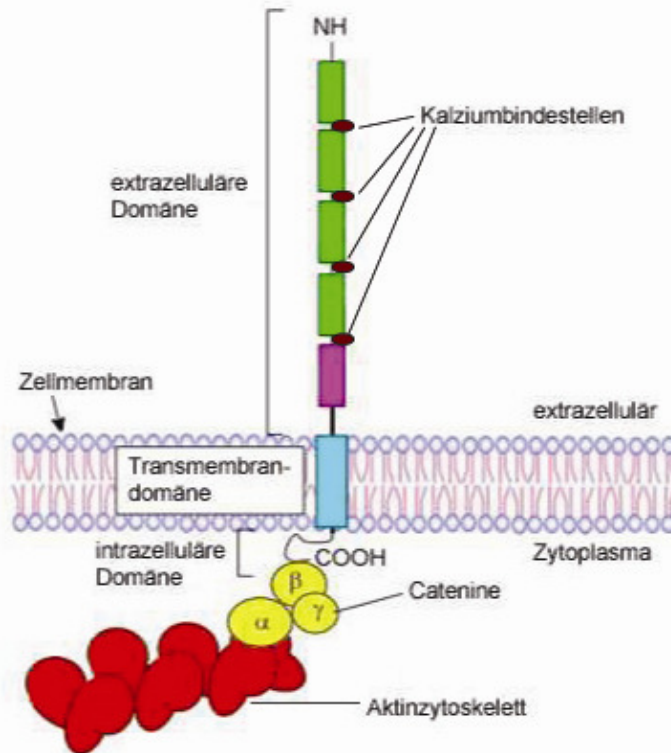


Abbildung 1-3: **Struktur von Cadherinen**

Klassische Cadherine besitzen am N-Terminus fünf homologe extrazelluläre Domäne, welche für die homophilen Interaktionen mit den gleichen Zellen verantwortlich sind. Über die Transmembrandomäne sind Cadherine in der Zellmembran verankert. Intrazellulär sind sie über Catenine mit dem Zytoskelett verbunden (modifiziert nach O'Day [56])

1.3.2 Rolle von Cadherinen im malignen Melanom

Beim Aufbau der Haut spielt das Expressionsmuster der Cadherine eine wichtige Rolle. Cadherine sind deshalb auch an allen Schritten der malignen Progression beteiligt. Während der Entartung der Melanozyten zu Melanomzellen entziehen sich diese der Kontrolle der Keratinozyten, werden autonom und können sich aus gewöhnlichen Zellverbänden lösen. In normaler Haut vermittelt E-Cadherin die Zellkontakte zwischen Keratinozyten und Melanozyten. Im Verlauf der Melanomentwicklung geht die Expression von E-Cadherin und somit die Kontrolle der Keratinozyten über die veränderten Melanozyten verloren, die dann unkontrolliert zu wachsen beginnen [22, 57]. Dabei hemmt der transkriptionelle Repressor Snail, der in Melanozyten nicht exprimiert wird, die Expression von E-

Cadherin im Melanom [58]. Gleichzeitig zum Verlust von E-Cadherin findet während der Melanomentwicklung durch die Induktion der NF κ B-Aktivität eine Expression von N-Cadherin statt, wodurch sich das Adhäsionsverhalten und die Bindungspartner der Melanomzellen verändern. Sie interagieren nun mit Fibroblasten anstatt mit Keratinozyten. Die Melanomzellen können sich nun leichter aus dem destabilisierten Zellverband lösen und werden mobiler [22, 29, 59]. Von unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine verkürzte Form von P-Cadherin in Melanomzellen exprimiert wird. Dieser Form fehlen die Transmembran- sowie die zytoplasmatische Domäne, sodass diese trunkierte Form von P-Cadherin nicht in der Membran verankert ist. Durch Stören des Zell/Zellattachments fördert das sekretierte P-Cadherin die Migration und Invasion von Melanomzellen und ist damit an der Progression des Melanoms beteiligt [60, 61].

1.4 Rolle von MIA („*Melanoma Inhibitory Activity*“)

Das Protein MIA spielt bei der Entwicklung des malignen Melanoms eine bedeutende Rolle. Es wird in allen Melanomzelllinien in hohen Mengen gebildet und sezerniert, wohingegen in Melanozyten und in normaler Haut kein MIA vorkommt [62, 63]. Die ersten Analysen ergaben, dass MIA die Proliferation von Melanomzellen *in vitro* hemmt [64]. MIA sorgt für diese wachstumshemmende Wirkung, indem es die Zellanhaftung in den Zellkulturflaschen und somit auch das Wachstum inhibiert. Spätere Untersuchungen dagegen zeigten, dass MIA die Migration und Invasion von Melanomzellen *in vivo* fördert, indem es die Adhäsion von Zellen zur umgebenden Matrix hemmt und es somit zu einer verminderten Anhaftung der Zellen an der extrazellulären Matrix führt [65, 66]. Die Induktion der MIA-Expression korreliert dabei mit der Tumorprogression des malignen Melanoms [Review 67]. Zudem wurde ein erhöhter Proteingehalt von MIA im Serum von Patienten mit Melanommetastasen entdeckt. MIA wird deshalb als verlässlicher diagnostischer Serumsmarker verwendet [68]. Desweiteren spielt MIA auch eine Rolle bei der Entstehung des malignen Melanoms und hat Einfluss auf die Zellmorphologie sowie die Regulation von Melanom-assoziierten Genen. Durch die Hemmung von MIA in Melanomzellen kommt es zu vermehrten Zell-Zellkontakten. MIA-defiziente Melanomzellen verhalten sich ähnlich wie Melanozyten. Sie zeigen eine Reinduktion der Pigmentsynthese und weisen mehr

dendritische Zellausläufer auf. Außerdem zeigen sie eine verstärkte Expression von E-Cadherin sowie den Verlust von N-Cadherin. Die MIA-defizienten Zellklone weisen auch eine verminderte Expression von Melanom-assoziierten Genen wie MT-MMP1, Integrin $\beta 3$, tPA und SPARC im Vergleich zur parentalen Zelllinie auf [69-71]. Zudem spielt MIA auch eine Rolle in Signalwegen. So wurde inzwischen nachgewiesen, dass MIA auch die Aktivität des ERK-Signalwegs im malignen Melanom negativ beeinflussen kann [72].

Mit Hilfe von Reporteranalysen konnte gezeigt werden, dass ein 5´seitig vom Gen gelegenes Fragment von 1386 Basen im humanen Promotor die spezifische Genexpression vermittelt [62, 73]. Die Expression von MIA wird im Melanom durch die Transkriptionsfaktoren HMGB1 und CtBP1 reguliert. HMGB1 bindet an das hochkonservierte HCR (*highly conserved region*) Promotorelement im melanomspezifischen MIA-Promotor und aktiviert mit p65, ein Protein der NF κ B-Familie, die Promotoraktivität in Melanomzellen. Studien aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass HMGB1 im Melanom stark exprimiert wird und an der Melanomentwicklung beteiligt ist [32]. In Melanozyten hemmt der transkriptionelle Co-Repressor CtBP1 die Expression von MIA, indem es zusammen mit TCF4 an den MIA-Promotor bindet und damit die LEF/TCF-Aktivität unterdrückt. Dagegen geht in Melanomzellen die Expression von CtBP1 verloren und die Hemmung des MIA-Promotors wird aufgehoben [45].

Inzwischen wurden weitere Mitglieder der MIA-Familie charakterisiert. Das MIA-Homolog OTOR (MIAL) wird spezifisch im Auge und im Innenohr exprimiert [74-76]. Das leberspezifische MIA2 wirkt als Tumorsuppressor im hepatozellulären Karzinom (HCC) und spielt bei entzündlichen Leberkrankheiten wie Fibrose und Zirrhose eine Rolle [77, 78]. Das MIA-Homolog TANGO wird mit Ausnahme des hämatopoetischen Systems ubiquitär exprimiert. Neue Studien belegen eine Funktion als Tumorsuppressor im HCC, Kolonkarzinom und im malignen Melanom [79, 80]. Alle Familienmitglieder sind sezernierte Proteine und besitzen eine SH3-Domäne für spezifische Proteininteraktionen.

1.4.1 Struktur von MIA

Eine Signalpeptidsequenz am N-Terminus ist für den Transport des 11 kDa großen Proteins MIA aus der Zelle in den Extrazellulärraum verantwortlich. Multidimensionale NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalysen zeigten,

dass die dreidimensionale Struktur von MIA eine hohe strukturelle Homologie zu SH3-Domänen besitzt, wobei zwei zusätzliche Disulfidbrücken der Stabilisierung dienen. MIA ist aus sieben antiparallelen β -Strängen aufgebaut, die dann zwei antiparallele β -Faltblattstrukturen, eingebettet von zwei Loop-Strukturen, bilden. Diese Strukturen kommen auch in SH3-Domänen vor (Abb. 1-4) [81-83]. MIA ist das erste bekannte extrazelluläre Protein, das eine SH3-Domäne besitzt.

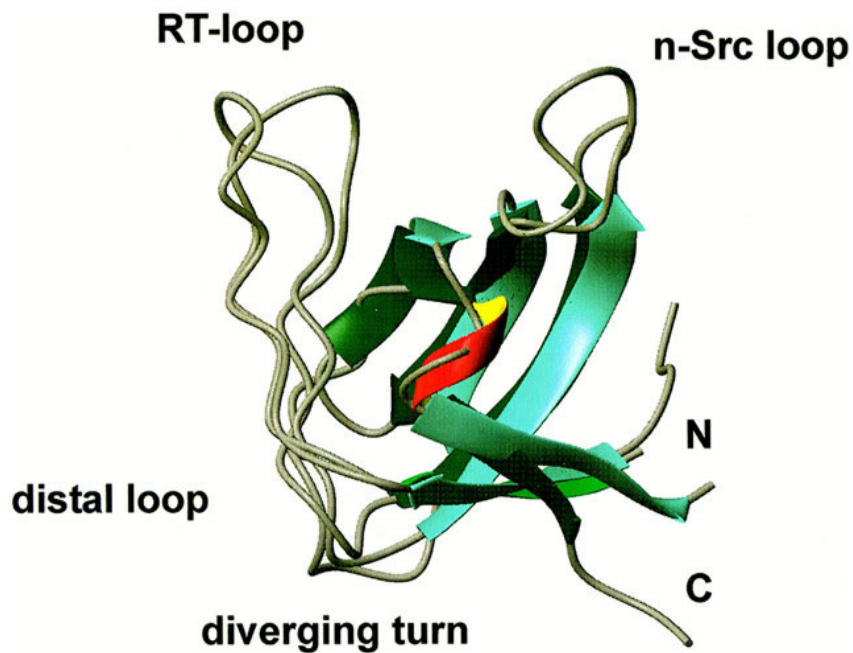


Abbildung 1-4: **Struktur von MIA**

Die dreidimensionale Struktur des Proteins MIA wurde von Dr. R. Stoll mittels NMR-Spektroskopie ermittelt [82].

1.4.2 Rolle von MIA in der Melanomprogression

Es wurde bereits gezeigt, dass das Protein MIA mit extrazellulären Matrixmolekülen wie Fibronektin und Laminin interagieren kann und das Ablösen der Melanomzellen von der extrazellulären Matrix fördert [66]. In Hamster- und Mausmodell konnte gezeigt werden, dass MIA auch *in vivo* die Metastasierung von Melanomzellen unterstützt [65, 84]. Darüber hinaus wurde eine Bindung von MIA an die Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ nachgewiesen. Es werden dabei die Bindungsstellen blockiert und die Interaktion der extrazellulären Matrix mit den Integrine unterbunden [72]. In Abbildung 1-5 ist ein Modell der Funktion von MIA dargestellt, wie die Wanderung der Melanomzellen gefördert wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MIA eine Rolle bei der Tumorprogression des

malignen Melanoms spielt, indem es das Ablösen von Zellen von Molekülen der extrazellulären Matrix fördert.

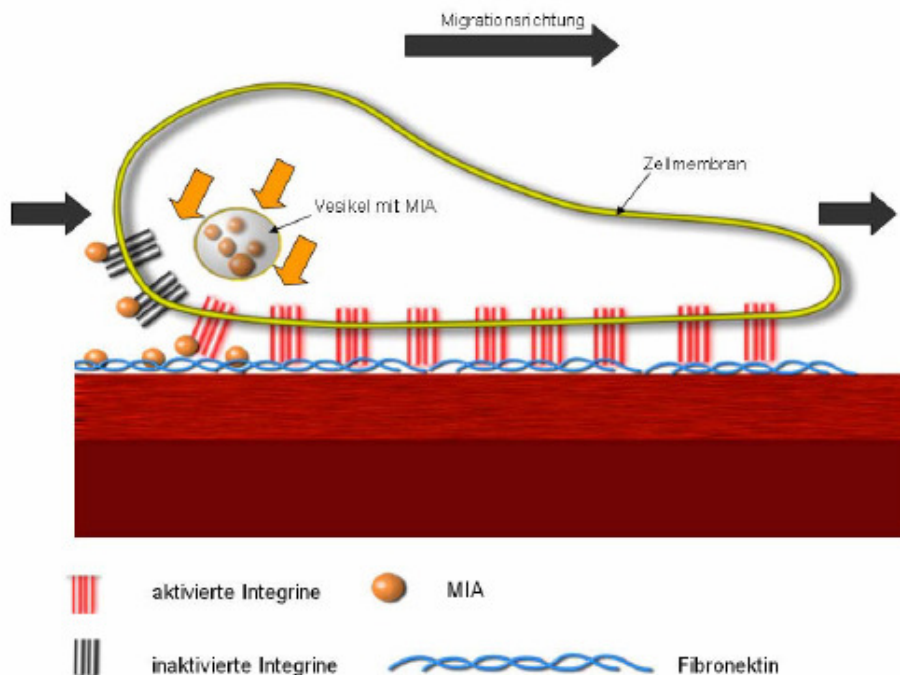


Abbildung 1-5: **Modell der Funktion von MIA während der Zellmigration**

MIA wird vermutlich am hinteren Ende der migrierenden Zelle sezerniert. Es interagiert mit Fibronektin und Integrine und maskiert die Bindungsstellen. Die Integrine werden inaktiviert und die Bindung an die extrazelluläre Matrix wird unterbunden. Dadurch kommt es zur Ablösung der Zellen von der extrazellulären Matrix und die Zellen können wandern (modifiziert nach Bosserhoff *et al.*, 2005) [67].

1.5 Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel (Hypoxie)

Die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff (O_2) ist für höhere Lebewesen essentiell. Sowohl das respirative als auch das kardiovaskuläre System sind an der Aufrechterhaltung eines konstanten Sauerstoffpartialdrucks in den Geweben beteiligt und versorgen damit das Gewebe mit dem benötigten Sauerstoff. Sauerstoff dient dabei als terminaler Elektronenakzeptor in den Mitochondrien zur Energiegewinnung.

Hypoxie entsteht sobald der physiologische Sauerstoffpartialdrucks unter ein bestimmtes Niveau sinkt, das für die Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung des betreffenden Gewebes benötigt wird, d.h. wenn der Sauerstoffbedarf das – angebot übersteigt. Die Zelle passt sich dem Sauerstoffmangel an, indem bestimmte Gene aktiviert werden, die nötig sind, um die Sauerstoffhomöostase aufrecht zu erhalten [Reviews 85, 86]. Die spezifische Antwort des Körpers erfolgt auf zellulärer (z.B. Glykolyse), lokaler (z.B. Angiogenese) und systemischer (z.B.

Erythropoiese) Ebene [87]. Unter hypoxischen Bedingungen werden Signalwege aktiviert, die vor allem über den Transkriptionsfaktor HIF (*hypoxia-inducible factor*) aktiviert werden. Eine verminderte Sauerstoffversorgung, beispielsweise verursacht durch einen Blutverlust oder eine Anämie, aktiviert unter anderen die Produktion des blutbildenden Hormons Erythropoietin (EPO) und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF, was zur Bildung neuer Blutgefäße führt [87, 88]. Insgesamt werden durch den Sauerstoffmangel Prozesse in der Zelle in Gang gesetzt, die für eine verbesserte Sauerstoffversorgung des Gewebes sorgen.

1.5.1 Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF)

Bei den Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) handelt es sich um heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus einer sauerstoffabhängigen α -Untereinheit (120 kDa) und einer vom Sauerstoff unabhängigen β -Untereinheit (91 kDa) bestehen. HIF-1 α und HIF-1 β , das schon als ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) identifiziert wurde [89], werden ubiquitär im Gewebe vieler Spezies (u.a. Mensch, Wirbeltier, Insekt und Wurm) exprimiert [90-92]. Die Aktivierung von HIF-1 hängt dabei von der durch Hypoxie induzierten Stabilisierung der α -Untereinheit ab. Dies geschieht über posttranslationale Regulation durch Prolyl-4-hydroxylasen (PHDs). Nach Eintreten des Sauerstoffmangels steht das Protein HIF-1 α innerhalb von kürzester Zeit den Zellen zur Verfügung. Normalisiert sich die Sauerstoffzufuhr, verschwindet HIF-1 α nach wenigen Minuten wieder [93]. Eine bestimmte Konzentration von HIF-1 α scheint stets nötig zu sein, um eine kontinuierliche Expression bestimmter Gene sicherzustellen, die für eine ausreichende Energiebereitstellung zur Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion sorgen [87, 94].

Neben HIF-1 α , das inzwischen als Hauptregulator der sauerstoffabhängigen Genexpression identifiziert worden ist, sind bislang zwei weitere Mitglieder der HIF-Familie (HIF-2 α und -3 α) bekannt. Die α -Untereinheiten weisen dabei hohe Homologien untereinander auf. Diese bilden unter Hypoxie mit HIF-1 β einen Komplex und aktivieren bestimmte Zielgene. HIF-2 α wurde als endotheliales PAS-Protein (EPAS1) beschrieben [95] und unterscheidet sich in ihren Expressionsmustern im Gewebe von HIF-1 α , wobei die HIF-Mitglieder teilweise auch verschiedene Zielgene aktivieren [96-99]. Das verkürzte HIF-3 α , das von

Gu *et al.* entdeckt wurde und dem eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne fehlt, wirkt in der menschlichen Niere inhibitorisch auf die hypoxie-induzierte Genexpression [100-103].

Untersuchungen an HIF-1 α knock-out Mäusen zeigten gravierende Herz- und Hirnmissbildungen sowie ein defektes Blutgefäßnetz in der embryonalen Entwicklung, wobei die Mausembryonen nicht lebensfähig waren [94, 104, 105]. HIF-1 α ist offensichtlich ein lebenswichtiger Faktor, der durch die nicht ubiquitär exprimierten HIF-2 α [106] und HIF-3 α [100] nicht ersetzt werden kann.

1.5.2 Struktur von HIF-1 α

Die α - und β -Untereinheiten von HIF enthalten jeweils am N-Terminus eine basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Domäne (*basic helix-loop-helix*) und eine PAS-Domäne, die nach den ersten identifizierten Mitgliedern (PER, ARNT und SIM) benannt wurden [Review 89]. Beide Domänen sind an der Dimerisierung mit dem jeweiligen Bindungspartner und an der DNA-Bindung von HIF-1 α beteiligt [Review 107]. Die HIF-1 α -Proteine besitzen noch zwei unabhängige Transaktivierungsdomänen (TAD), über die sie mit verschiedenen Koaktivatoren interagieren können. Über die funktionell wichtige ODD-Domäne (*oxygen dependent degradation domain*) wird die sauerstoffabhängige Proteinstabilität von HIF- α reguliert. Unter normoxischen Bedingungen hydroxylieren Prolyl-4-hydroxylasen zwei spezifische Prolylreste in der ODD-Domäne in Abhängigkeit von 2-Oxoglutarat, Eisen und Ascorbat. Dabei dient molekularer Sauerstoff als limitierender Faktor für die Prolyl-4-hydroxylasen (Abb. 1-7) [108, 109]. Das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL), eine E3-Ubiquitin-Ligase, erkennt die hydroxylierte ODD-Domäne, vermittelt die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von HIF-1 α [110, 111]. Die Bindung von VHL wird durch Acetylierung eines Lysinrests in der ODD-Domäne durch die Acetyltransferase ARD1 (*arrest defective protein 1*) erleichtert. Eine Hydroxylierung des Asparagylrests in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne durch die Asparaginyhydroxylase FIH (*factor inhibiting HIF*) führt zu einer sterischen Inhibition der Interaktion zwischen HIF- α und dem Koaktivator-Komplex p300/CBP und zu einer Hemmung der HIF-Aktivität [112, 113]. In Abbildung 1-6 ist die Struktur von HIF-1 α dargestellt.

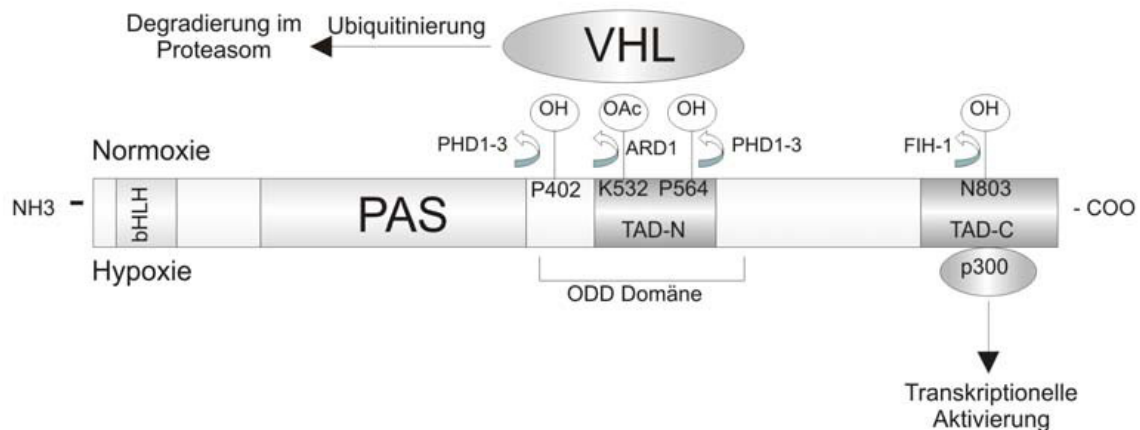


Abbildung 1-6: **Struktur des HIF-1 α Proteins**

Unter normalen Sauerstoffbedingungen werden die Proline P402 und P564 in der ODD-Domäne über Prolylhydroxylasen (PHD) hydroxyliert. Über die Bindung des von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) wird HIF-1 α ubiquitiniert und abgebaut. TAD-N und TAD-C stellen die N-terminale bzw. C-terminale Transaktivierungsdomäne dar (modifiziert nach Semenza *et al.*, 2003 [114]).

1.5.3 Genregulation durch HIF-1 α

Hypoxie bewirkt aufgrund einer verminderten Hydroxylierung durch PHDs einen reduzierten proteasomalen Abbau von HIF-1 α und führt zu einer intrazellulären Stabilisierung von HIF-1 α (siehe Abb. 1-7). HIF-1 α wird dann in den Zellkern transportiert und bindet die HIF-1 β -Untereinheit, welche konstitutiv im Zellkern vorkommt [115, 116]. Dieses Heterodimer bildet dann mit Koaktivatoren wie der Acetyltransferase p300/CBP den HIF-Komplex und bindet im Promotor der Zielgene an das *hypoxia response element* (HRE). Die DNA-Bindung des HIF-1 Heterodimers erfolgt an der *HIF-1 binding site* (HBS), die ein konserviertes 5'-ACGTG-3' - Motiv beinhaltet [Review 117]. Eine Bindung von HIF-1 an die HRE-Region von hypoxie-regulierten Genen führt zu einer Aktivierung der Expression dieser Gene [118]. Obwohl die Aktivität von HIF-1 α und deren Zielgene hauptsächlich vom Sauerstoffpartialdruck abhängig ist, spielen dabei noch andere Faktoren eine Rolle. So findet vor der Translokation in den Kern eine Phosphorylierung von HIF-1 über die p42/p44 Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) statt. Dies führt zu einer Stabilisierung von HIF-1 α und erhöht somit die Transaktivierungsaktivität [119]. Eine weitere Möglichkeit der Phosphorylierung von HIF-1 α besteht über den PI3K/Akt-Signalweg. Eine Hemmung der PI3-Kinase führt zu einer verminderten Aktivität von HIF-1 α [120, 121]. Der Verlust des Tumorsuppressor-Gens PTEN, das den PI3K/Akt-Signalweg hemmt, führt zu

einer erhöhten HIF-1 bedingten Genexpression und ist an der Tumorprogression beteiligt [122].

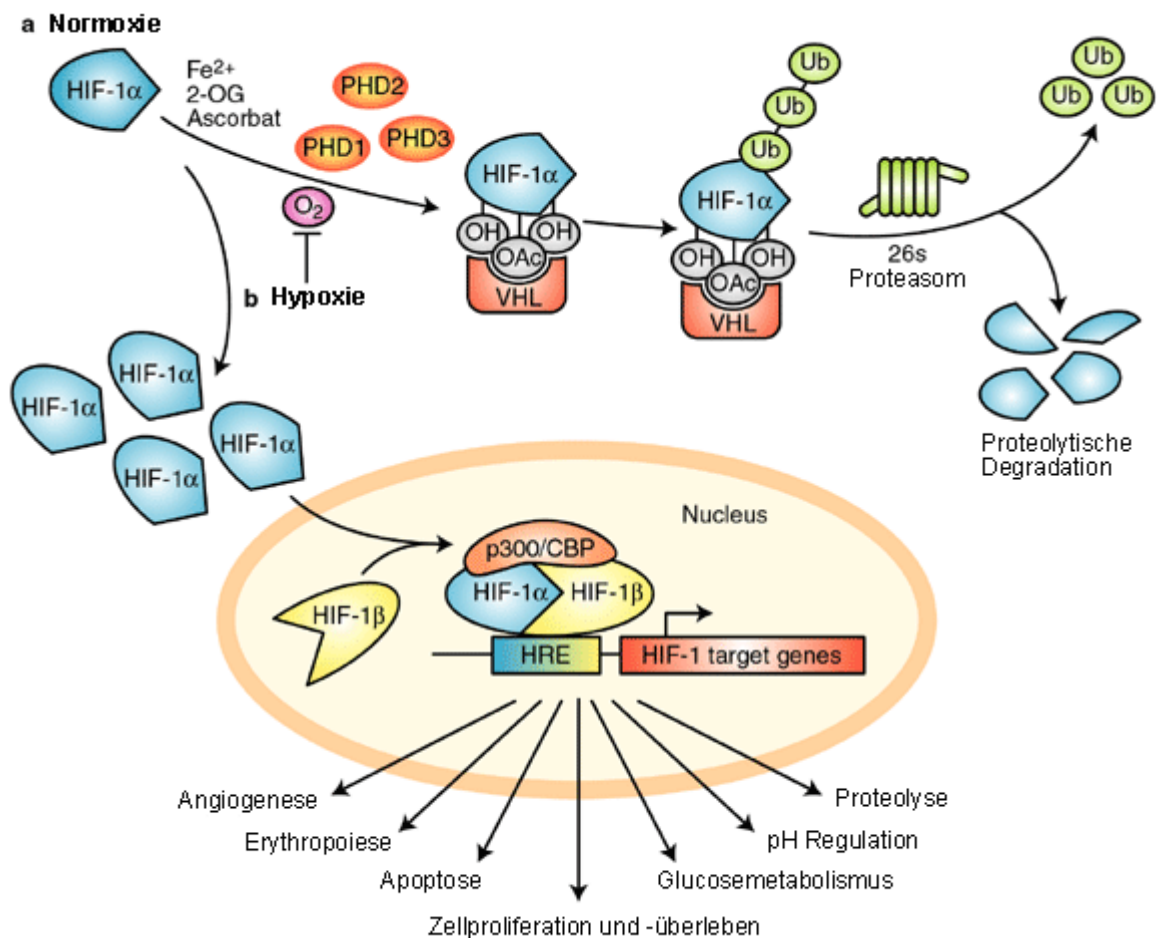


Abbildung 1-7: **HIF-1 α Regulation durch Prolinhydroxylierung**

(a) Unter normalen O₂-Bedingungen wird HIF-1 α in Anwesenheit von Fe²⁺, 2-Oxoglutarat (2-OG) und Ascorbinsäure durch Prolinhydroxylasen (PHD1, 2 und 3) hydroxyliert. Das hydroxylierte HIF-1 α wird von der E3-Ubiquitin-Ligase pVHL erkannt und mit Hilfe des Ubiquitin-Komplexes ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Eine Acetylierung (OAc) von HIF-1 α fördert auch die Bindung von pVHL.

(b) Durch Hypoxie wird die Prolinhydroxylierung verhindert. Dadurch kann VHL nicht mehr an HIF-1 α binden und HIF-1 α wird somit nicht mehr proteasomal abgebaut. HIF-1 α akkumuliert und transloziert in den Zellkern, wo HIF-1 α mit HIF-1 β dimerisiert. Dort bindet das Dimer mit Co-Aktivatoren wie p300/CBP an das *hypoxia-responsive element* (HRE) innerhalb des Promotors der Zielgene und aktiviert die Transkription dieser Gene (modifiziert nach Carroll *et al.*, 2005) [Review 123].

Als Anpassung des Organismus auf das reduzierte Sauerstoffangebot findet eine verbesserte Sauerstoffversorgung über das Blutgefäßsystem statt. Abbildung 1-8 gibt einen Überblick auf die Effekte, die durch Sauerstoffmangel ausgelöst werden. Durch HIF-1 α werden Gene aktiviert, die die Angiogenese (VEGF) und Erythropoiese (EPO) fördern [124-126]. Eine erhöhte Synthese von Transferrin

und Transferrinrezeptor führt zu einem verbesserten Eisentransport [127] und Eisenaufnahme [128]. Eisen ist für den Aufbau des Hämoglobins notwendig und damit auch am Sauerstofftransport im Blut beteiligt.

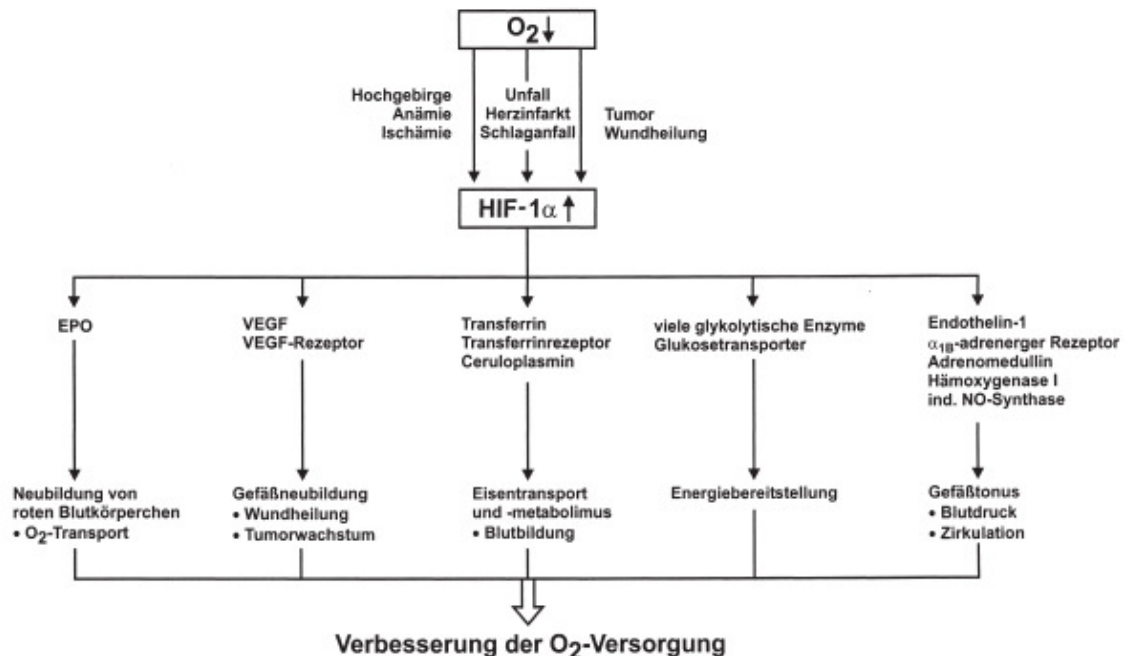


Abbildung 1-8: **Überblick über die Effekte bei Sauerstoffmangel**

Sauerstoffmangel bewirkt eine erhöhte Expression von HIF-1 α . Dadurch werden aktiviert, die letztendlich zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung des Gewebes sorgen [87].

Desweiteren induziert HIF-1 α die Expression von Glucose-Transportern (GLUT-1) und glykolytischen Enzymen (Aldolase, Enolase, Phosphofructokinase), so dass die Glucoseaufnahme der Zellen verbessert wird und den Zellen somit mehr Energie zur Verfügung steht [129-131]. Der Stoffwechsel wird den anaeroben Bedingungen angepasst und die Energiegewinnung über die Glycolyse wird gefördert. Zusätzlich wird durch HIF-1 α die Laktatdehydrogenase A aktiviert und dadurch Pyruvat in Lactat umgewandelt. Das verminderte Angebot von Pyruvat inhibiert den Citratzyklus, wodurch die Zelle weniger Sauerstoff benötigt [132-134]. Darüber hinaus spielt HIF-1 α bei Entzündungsreaktionen, bei der Immunantwort sowie bei der Entwicklung des Immunsystems eine Rolle [135-137]. Bislang sind über 100 Gene identifiziert worden, die über HIF reguliert werden [Reviews 138, 139].

Neben einer Aktivierung von HIF durch Hypoxie sind weitere Faktoren identifiziert worden, die die Expression von HIF und deren Zielgene beeinflussen. Die

Aktivierung von Wachstumsfaktoren (EGF, IGF) und Onkogenen (RAS, V-SRC) sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen wie PTEN und p53 [122, 140-145] können zu einem Anstieg der HIF-Aktivität führen. Mutationen des VHL-Proteins können den Abbau von HIF verhindern. Dies resultiert in einer konstitutiven Induktion von HIF-Zielgenen [Review 146]. Außerdem wurde eine Rolle der Reaktiven Sauerstoffradikale (ROS) bei der Regulation von HIF festgestellt (Kapitel 1.5.5).

1.5.4 Rolle von Hypoxie in Tumorzellen

Sauerstoffmangel spielt bei zahlreichen Erkrankungen, insbesondere beim Tumorwachstum, eine bedeutende Rolle. So ist in den meisten untersuchten menschlichen Tumoren ein verminderter Sauerstoffpartialdruck im Vergleich zum gesunden Gewebe festgestellt worden [Reviews 147, 148]. Hypoxische Zustände im Gewebe werden als ein zentraler Faktor für die Aggressivität und Metastasierungspotential von Tumoren angesehen. Durch das abnorme Wachstum von neoplastischem Gewebe entsteht eine Hypoxie im Tumor, die zu einem erhöhten Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen führt [Review 149]. Der Grad der Tumorphypoxie ist verbunden mit einem aggressiveren und stärker metastasierenden Phänotyp sowie mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie [150-153]. Der Transkriptionsfaktor HIF spielt dabei die zentrale Rolle bei der zellulären Antwort des Tumors auf Hypoxie. Mehrere Studien zeigten im Verlauf der Tumorprogression eine zunehmende HIF-Expression im Tumor, wobei die Expression von HIF-1 α mit dem Differenzierungsgrad und der Prognose negativ korreliert [154-156]. HIF hat eine Bedeutung für die Entstehung einiger Tumore, indem es die Bildung neuer Blutgefäße (über VEGF) induziert und für eine verbesserte Versorgung des Tumors sorgt. Eine erhöhte HIF-Konzentration wurde in verschiedenen Tumoren wie dem Brust-, Haut und Darmkrebs (HIF-1 α) sowie dem Nierenzellkarzinom (HIF-2 α) in histologischen Befunden nachgewiesen [157-160].

Im Melanom wurde auch eine steigende Expression von HIF-1 α mit fortlaufender Tumorprogression nachgewiesen. Die BRAF(V600E)-Mutante erhöht dabei die Expression von HIF-1 α und fördert das Überleben der Melanomzellen unter hypoxischen Bedingungen [161]. Es wurde bereits gezeigt, dass die physiologische Hypoxie in der Haut an der Melanozytentransformation in

Verbindung mit der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges beteiligt ist. Diese Aktivierung unter Hypoxie führt über NF κ B zu einer erhöhten Expression von Notch1 und wirkt somit an der Melanomentwicklung mit [162, 163].

1.5.5 Rolle der Sauerstoffradikale bei der Regulation von HIF

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind an der Regulation von HIF beteiligt. Diese Sauerstoffradikale sind schädliche Formen des Sauerstoffs, die bei oxidativen Stress, bei Erkrankungen sowie beim Alterungsprozess eine wesentliche pathophysiologische Rolle spielen. ROS entstehen hauptsächlich in den Mitochondrien als Nebenprodukte der Atmungskette und bei anderen Prozessen (z.B. Entzündungen), bei denen molekularer Sauerstoff metabolisiert wird (Abb. 1-9) [Review 164].

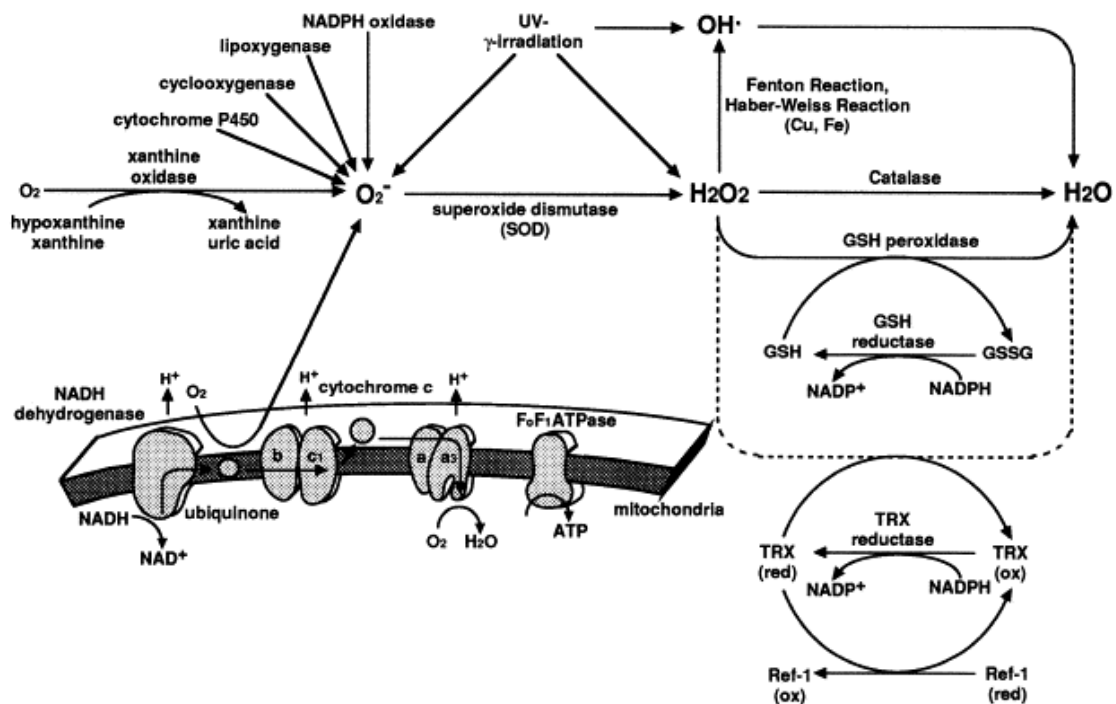


Abbildung 1-9: **Metabolische Signalwege der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)**

Die ROS werden über verschiedene Signalwege gebildet, wobei die meisten der $O_2^{\bullet -}$ über die Atmungskette in den Mitochondrien entstehen. Die Superoxiddismutase wandelt die $O_2^{\bullet -}$ in H_2O_2 um, welches über die Katalase und die Glutathionperoxidase zu H_2O abgebaut wird [164].

Zu den ROS gehören freie Radikale wie das Superoxid-Anion ($O_2^{\bullet -}$), das hochreaktive Hydroxylradikal (OH^{\bullet}) und das Peroxylradikal (RO_2^{\bullet}), die sehr reaktionsfreudig sind und das Genom schädigen können. Zudem gibt es noch stabile, nicht-radikale Spezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon (O_3) und

Hypochlorit-Anion (OCl^-) sowie angeregte Sauerstoffmoleküle (Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$). Bei geringen Konzentrationen agieren die ROS als Signalmoleküle und sind für zelluläre Signalwege von Bedeutung. Zu hohe Mengen können dagegen die Zelle schädigen, was letztendlich zum Zelltod führen kann. Die Zelle hat deshalb ein Schutzsystem aus Antioxidanten entwickelt, das die gefährlichen Radikale unschädlich macht [Review 164]. Wenn das Gleichgewicht zwischen Produktion und Neutralisierung der ROS gestört ist, können die normalen zellulären Prozesse verändert werden. Das ist ein Vorgang, der in Tumorzellen oft vorkommt. Die normale Haut ist aufgrund ihrer Entfernung zu den Blutgefäßen ein leicht hypoxisches Gewebe. In der Haut werden aufgrund eines erhöhten Metabolismus durch transformierte Zellen, UV-Strahlung, Melaninproduktion und ein verändertes Antioxidantensystem vermehrt ROS gebildet. Dadurch könnte die Transformation der Melanozyten sowie die Entwicklung des Melanoms gefördert werden [Review 165].

Die ROS können HIF stabilisieren, indem sie die Aktivität der PHDs, hauptsächlich die PHD2, hemmen. Dafür ist wahrscheinlich der oxidative Status und Gehalt der Fe^{2+} , welche als Cofaktoren für die Aktivität der PHDs erforderlich sind, in der Zelle verantwortlich [Review 166]. Es wurde demonstriert, dass die ROS, die im mitochondrialen Komplex III entstehen, die Hydroxylierung des Proteins HIF-1 α verhindern und somit HIF-1 α unter Hypoxie stabilisieren [Review 167]. In neueren Studien wurde gezeigt, dass ROS die Stabilität und transkriptionelle Aktivität von HIF sowohl unter sauerstoffreichen als auch unter hypoxischen Bedingungen regulieren können [Review 168]. Antioxidanten und Radikalfänger werden deshalb als mögliches Therapeutikum bei HIF-abhängigen Krankheiten wie Krebs angesehen.

Insgesamt deuten die bisherigen Daten an, dass der HIF-Signalweg über Veränderungen des zellulären oxidativen Stresses reguliert werden kann. Dies geschieht wahrscheinlich über die veränderten Fe^{2+} -Level in der Zelle, der zu Änderungen der Hydroxylaseaktivität der PHDs führen und somit die Stabilität von HIF regulieren [Review 169].

1.6 Ziele der Arbeit

Ein Schwerpunkt der Forschung unserer Arbeitsgruppe stellt das sezernierte Molekül MIA („Melanoma Inhibitory Activity“) dar, das bei der Entstehung und Metastasierung des malignen Melanoms eine bedeutende Rolle spielt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Transkription und Aktivität von MIA auf molekularer Ebene näher zu untersuchen. Die Arbeit kann in dieser Hinsicht drei Abschnitte gegliedert werden.

1. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurden bereits mehrere Moleküle entdeckt, die mit MIA interagieren können und so an der Metastasierung des Melanoms beteiligt sind. Im ersten Teil sollten weitere Interaktionspartner von MIA isoliert und charakterisiert werden. Die Rolle von Cadherin-7 als neuer MIA-Bindungspartner bei der Regulation der Aktivität und Expression von MIA wurde hier untersucht.
2. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des transkriptionellen Ko-Repressor CtBP1, der die Expression von MIA in Melanozyten hemmt. Daneben wurde nach weiteren Zielgenen von CtBP1 gesucht, die bei der Melanomentwicklung und –progression von Bedeutung sein könnten.
3. Im dritten Teil wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 α untersucht, der unter hypoxischen Bedingungen, wie sie oft in primären Tumoren vorkommen, exprimiert wird und die Tumorprogression fördert. Hier sollten die molekularen Mechanismen aufgeklärt werden, die für die hohe Aktivität von HIF-1 α im Melanom auch unter normalen Sauerstoffbedingungen verantwortlich sind und so zur Entwicklung des Melanoms beitragen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Materialien

Alexis Biochemicals, Lörrach	Echinomycin
Applied Biosystems, Californien, USA	ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Premix), Template Suppression Reagent
BD Biosciences, Bedford, USA	Matrigel, BioCoat™ Matrigel Invasion Chamber
BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene Round-Bottom Tube
Behrens, Hamburg	Agar
BioRad, Richmond, USA	Immun- Blot™ PVDF Membran
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA	SeaKem® LE agarose
Carl Zeiss, München-Hallbergmoos	AxioCam, MR Grab Software
Dako, Hamburg	DAKO-LSAB2-Kit
Invitrogen, Carlsbad, USA	Lipofectamine PLUS™ Reagent, Lipofectamine™ Reagent SuperScript™ II RNase H-Reverse Transkriptase, SeeBlue® Plus2, Ready-Load™ 100 bp DNA Ladder, pcDNA3 Vektor, pcDNA3.1/ V5-His- TOPO Vektor
Invitrogen Molecular Probes, Eugene, USA	CFSE (5-(and 6-)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester)
Lonza Cologne AG, Köln	Cell line Nucleofector Kit R
Merck, Darmstadt	alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität, Hemacolor Fixierlösung, Farbreagenz rot, Farbreagenz blau, YC-1

Millipore, Eschborn	Einmal-Sterilfilter
New England Biolabs GmbH, Frankfurt	Restriktionsendonukleasen, NEBuffer für Restriktionsenzyme, T4 DNA-Ligase
Nunc GmbH & Co., Wiesbaden	Lab-Tek™ Chambered Coverglass
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Dulbeccos Modified Eagle Medium, Fötale Kälberserum, Trypsin, PBS (phosphate buffered saline), Penicillin/Streptomycin
Pierce, München	BCA Protein Assay Kit
Promega, Mannheim	Dual–Luciferase® Reporter Assay System, pRLTK Vektor, pGL3-basic Vektor, LacZ Vektor
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium, Melanozyten
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi und Maxi Kit, RNeasy® Mini Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, HiPerFect Transfection Reagent
Roche Diagnostics, Mannheim	Taq-Polymerase, RNase A, LightCycler DNA Master SYBR Green I, Primer 'random' (#1034731), LightCycler Capillaries
Roth, Karlsruhe	Roti® Load1 4x- Konz., Roti® Load 4x, nicht denaturierend
Sigma, St. Louis, USA	Acrylamid 30 % Lösung und 40 % Lösung, Bromphenolblau, NP-40, Trypsin, BSA (bovine serum albumin), TEMED, Monoclonal Anti-β-Actin Antikörper
Sigma Genosys, Steinheim	Oligonukleotide
Stratagene, Heidelberg	Epicurian Coli® XL2-Blue MRF' Ultracompetent Cells
Vector Laboratories, Burlingame, USA	Ziegerserum, Pferdeserum; Vectashield Mounting Medium with DAPI

Whatman International Ltd, Maidstone, Whatman 3MM Filterpapier,
England Nucleopore® Track- Etch Membrane
Zymed Laboratories Inc, San Francisco, BCIP/NBT Substrate Kit
USA

2.1.2 Geräte

Autoklaven

Tuttnauer/Systec, Wetztenberg	Tischautoklav Modell 2540EL, Autoklav 2540 EK
-------------------------------	--

Blotapparaturen

Whatman Biometra, Göttingen	Minigel Twin, Fastblot B34
-----------------------------	----------------------------

Brutschränke

Heraeus, Hanau	Zellinkubator CO ₂ -Auto-Zero, Begasungsbrutschrank BB6220, CO ₂ - Inkubator HeraCell 240
----------------	---

Gelelektrophoreseapparaturen

BioRad, München	Wide Mini Sub® Cell GT
-----------------	------------------------

Heiz- und Kühlblöcke

Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436, Thermomixer comfort, Thermomixer compact
--------------------	---

Mikroskope

Zeiss, Jena	Axiovert 10, Axiovert S100, Axio Imager.Z1
Leica Microsystems CMS, GmbH, Bensheim	DM IL Type 090-135.001

Spannungsgeräte

Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England	Electrophoresis Power Supply 1001, Electrophoresis Power Supply 301
BioRad, München	PowerPac Basic, PowerPac HC

Sterilwerkbänke

Heraeus, Hanau	LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18
----------------	---------------------------------

Thermocycler

MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cycler PTC- 200
Roche Diagnostics, Mannheim	LightCycler II

Waagen

Sartorius, Göttingen	R160P, L2200S
----------------------	---------------

Zentrifugen

Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5810R, MiniSpin Plus
Heraeus, Hanau	Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0
Kisker, Steinfurt	Tischzentrifuge
Roche Diagnostics, Mannheim	LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte

Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser
Amaga GmbH, Köln	Nucleofector I
Bachofner, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm
Bandelin, Berlin	SONOPULS Ultraschall- Homogenisator HD2070, MS 72
BD Biosciences, San Jose, USA	Mikrospitze aus Titan
Berthold, München	FACSCalibur, CellQuest Software
Bühler, Edmund, Tübingen	Lumat LB 9507
Heidolph, Kelheim	Schüttler SM 25
	Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer REAX 2000
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
MWG Biotech, Ebersberg	ELISA-Reader Emax, Geldokumentationssystem 2001i
Savant, New York, USA	Speedvac Concentrator SC 110
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522

Xenox, Niersbach

Stab-Homogenisator 40/E

2.1.3 Bakterien

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF'

Ultracompetent Escherichia Coli

2.1.4 Säugerzelllinien

501 Mel	Humane Melanomzelllinie
HepG2	ATCC-Nr.: HB-8065, Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie
SW480	ATCC-Nr.: CCL-228, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus primären kolorektalem Adenokarzinom
HMB2	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
HMB2 -5	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit antisense MIA
HTZ 19d	Humane Melanomzelllinie aus Hirnmetastase eines Melanoms
Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	DSMZ Nr.: ACC62, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Juso	DSMZ Nr.: ACC74, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Melanozyten	Humane primäre Melanozyten aus normaler Haut
Sk Mel 3	ATCC Nr.: HTB-69, Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase eines Melanoms
Sk Mel 28	ATCC Nr.: HTB-72, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor

2.1.5 Vektoren

pcDNA3

Der pcDNA3 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) wird zur Expression von Genen unter Kontrolle des CMV-Promotors in Säugerzelllinien benutzt.

pCMX-PL1

Der Vektor pCMX-PL1 [170] ist ein Expressionskonstrukt, der Vektoren pUC19 und CDM8 kloniert wurde.

pGL3 basic

Der pGL3 basic Vektor (Promega, Mannheim) ist ein Reportervektor, der eine multiple Klonierungsstelle besitzt, in die ein Promotor insertiert werden kann. Das *Luciferase*-Gen, das aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* isoliert wurde, dient als Reportergen, mit dem man die transkriptionelle Aktivität eines Promotors bestimmen kann.

pRL-TK

Für die Transfektionskontrolle bei der Durchführung des Luciferase Assays wird der kommerziell erhältliche pRL-TK Vektor (Promega), der das Renilla Luciferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält, benutzt.

Antisense Cadherin-7 (asCad7)

Für das antisense Cadherin-7 Konstrukt wurde die cDNA der Extrazellulären Domänen 1 und 2 von Cadherin-7 mRNA mittels RT-PCR amplifiziert und revers über EcoRI-Schnittstellen in den pCMX-PL1 Vektor kloniert.

Cadherin-7

Das Expressionskonstrukt von Cadherin-7 (cCad7) wurde die gesamte kodierende Sequenz des chicken Cadherin-7 in den pCMX-PL2 Vektor über eine BamHI- und HindIII-Schnittstelle unter der Kontrolle des CMV-Promotors kloniert.

CtBP1

Das Expressionskonstrukt CtBP1 wurde in den pCMX-PL1 Vektor kloniert [171].

6 x HRE Luc

Für das 6 x HRE Luc Konstrukt wurde sechsmal die Sequenz von HRE mit der HIF-Bindestelle vor das *Luciferase*-Gen in den pGL3 basic Vektor kloniert [172]. Das Konstrukt wurde von Dr. Christina Warnecke, Abteilung für Nephrologie und Hypertensiologie, Universitätsklinikum Erlangen, zur Verfügung gestellt.

NFκB Luc

Das Konstrukt NFκB Luc wurde von der Firma Promega (Mannheim) hergestellt.

Ad5lκB

Der rekombinante replikationsdefiziente Adenovirus Ad5lκB wurde von Hellerbrand *et al.* [173, 174] hergestellt und beschrieben.

NFκB Expressionsplasmide

Die NFκB-Untereinheiten p50, p52 und p65 wurden in den Expressionsvektor pET4T kloniert [175].

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA Genosys, England synthetisiert. Es wurde eine 100 μM Stammlösung der Oligonukleotide durch Lösen in H₂O hergestellt und bei –20 °C gelagert.

Primer für RT-PCR und quantitative PCR:

Genname	for	rev
AP1S1	GGAGGAGATGGGTTTGGCAT	GTGGAGGGAGGGAATGTTTGA
ATP1B1	TGGCTGGCATCTTCATCGGA	CTTTCGGTTCACTGGGCACA
CAD7	TCACCAACAAACCCGTGGA	ATCATCAGCATCCGTCGCT
CLDN11	TCTGTTGCTCAGGCTGGAGT	CGAGGCGGGAGGATACTTTGA
COL1A2	CCCAGCCGGAGATAGAGG	TCACCAGGCTCACCAGCAGG
CtBP1	CGACCTCCGATCATGAAC	GCTAAAGCTGAAGGGTTCC
ENC1	GCAACTTCCAAACCATCAGGA	TCTGGGAGGTAGCAATAGCG
ENPP2	GGAGAGTCGCATTGGGTTGA	TGTAGGGAGAGTGTGTGCCA
FAT	CCAATGATAATCCACCCGAGTT	TAACAACACCCGTCACGC
FSCN1	CCTGGGCGTGTAGTGTAAC	CACCACAAGGGTCAGTCCTA
FUS	TTCGTTGCTTGCTTGCCCTG	TGTAAGCTCTGCTGTCCGTAGG
HIF-1α	CACAGGCCACATTCACGTA	ATCCAGGCTGTGTGCACTG
MIA	CATGCATGCGGTCCTATGCCCAAGCTG	GATAAGCTTTCCTGGCAGTAGAAATC
MLL5	TGGGCTTGTATCTGGTTTCGG	CTGGTGTGGTAAAGGTAGGCTA
SLC26A2	GATTGGTGAGACAGTTGACCG	TTGAAAGAAGCCCATCGCTAC
THBS1	ACTGCGTTGGTGATGTAACAG	GTGCTCTCCATTGTGGTTGAA
TMED4	TGGGATAAGCAGAAGGAGGTC	ATCTCAGGGTAGTTGTTGGCA
VCAN	TCAGAACAGCAAGTGGCAGCGA	CAACACAAGTGGCTCCATTACGAC

Primer für Klonierung des Konstrukts antisense Cadherin-7:

hCad7 for 5'-GACGAATTCATGAAGTTGGGCAAAGTGG-3'

hCad7 EC1/2 rev 5'-GACGAATTCCTAGGCTACAGGTAATGACTC-3'

2.1.7 Short Interference RNAs (siRNA)

Die siRNAs wurden von der Firma Qiagen (Hilden) synthetisiert.

Genname	sense	antisense
HIF-1 α	5'-CUGAUGACCAGCAACUUGA	5'-UCAAGUUGCUGGUCAUCAG
HIF-2 α	5'-CAGCAUCUUUGAUAGCAGU	5'-ACUGCUAUCAAAGAUGCUG
pGL3-luc	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA	5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAG

2.2 Medien, Antibiotika und Puffer

2.2.1 Medien zur Anzucht von E.coli und Säugerzellkulturen

Luria Bertani Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl Substanzen wurden in dest.H ₂ O gelöst und autoklaviert Für Platten: + 15 g/l Agar Zur Selektion: + 100 µg/ml Ampicillin bzw. + 25 µg/ml Kanamycin
DMEM	Pulver wurde in demineralisiertem Wasser gelöst, der pH mit NaHCO ₃ auf 7,3 eingestellt, und sterilfiltriert; Zusätze: 10% (v/v) FKS 0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin 0,0005% (w/v) Phenolrot
NHEM Medium	Promocell, Heidelberg
Einfriermedium	Pro 100 ml: 50 ml DMEM (mit 10% FKS) 30 ml FKS 20 ml DMSO

2.2.2 Antibiotika

Ampicilin-Stammlösung (500 ×)	50 mg/ml in dest. H ₂ O (-20 °C)
Geneticin-Stammlösung	100 mg/ml in dest. H ₂ O (-20 °C)
Kanamycin-Stammlösung (100x)	10 µg/ml in dest. H ₂ O (-20 °C)

2.2.3 Puffer und Lösungen

RNase A Lösung	10 mM Tris/HCl pH 7,0 10 mg/ml RNase A
----------------	---

Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese:

TAE (50 ×)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	0,8 - 2% (w/v) Agarose gelöst in TAE (1 ×)
DNA-Gel-Ladepuffer (10 ×)	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 40% (v/v) Saccharose
Ethidiumbromidlösung	0,04% in H ₂ O bidest

Lösungen für die Zellkultur:

PBS (Phosphate buffered saline)	PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
---------------------------------	------------------------------

Lösungen für die Plasmidisolierung aus *E.coli*:

Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung III	60 ml 5 M NaOAc 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H ₂ O

Lösungen und Gele für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Proteinauftrennung):

SDS-Page-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
---------------------	--

12,5%-Trenngel	31,25% (v/v) Acrylamid:Bis 40% 37,5% (v/v) 1 M Tris pH 8,8 0,1% (v/v) SDS 0,05% (v/v) APS 0,05% (v/v) TEMED
4%-Sammelgel	10% (v/v) Acrylamid:Bis 40% 12% (v/v) 1 M Tris pH 6,8 0,1% (v/v) SDS 0,05% (v/v) APS 0,05% (v/v) TEMED

Lösungen für Western Blot:

Western Blot-Transferpuffer	10% (v/v) Methanol 25 mM Tris 190 mM Glycin
PBS (10 ×)	80 g/l NaCl 2,0 g/l KCl 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ mit HCl auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert
Blockierungslösungen	3% BSA in PBS 5% Milchpulver in TBS

Lösung für Ko-Immunpräzipitation:

Bindungspuffer	150 mM NaCl 20 mM NaPO ₄ , auf pH 7,5 eingestellt
----------------	---

Lösung zur Isolation von Gesamtprotein:

RIPA Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1% Nonidet® P40 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS
-------------	--

HIF-RIPA Puffer	6,65 M Urea
	10% Glycerol
	1% SDS
	10 mM Tris pH6,8
	Proteaseinhibitoren (Complete mini
	EDTA-frei von Roche)
	5 mM DTT (frisch dazugeben)

2.3 Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten, Arbeiten mit Bakterien und Säugerzellen wurden in sterilen Gefäßen und mit sterilen Lösungen durchgeführt.

Experimente, bei denen nicht explizit die Reaktionstemperaturen angegeben werden, fanden bei Raumtemperatur statt.

2.3.1. Arbeiten mit *Escherichia Coli*

2.3.1.1 Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht von *E.coli* Kulturen erfolgte auf festen Nährboden oder in flüssiger Schüttelkultur. Für die Selektion transformierter Bakterien wurde das Medium beziehungsweise die Nährplatte je nach Resistenzgen auf dem Plasmid, mit einem Selektionsantibiotikum (Kanamycin oder Ampicilin) versetzt. Zum Animpfen von Schüttelkulturen wurde eine Einzelkultur mit einer sterilen Spitze gepickt, bei Agarplatten wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank, die flüssigen Kulturen wurden bei 37°C im Schüttler mit 250 rpm inkubiert.

2.3.1.2. Transformation von *E.coli*

Zur Transformation kompetenter *E.coli* wurden je 100 ng Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenten Zellen, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 min auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen, wurden die Zellen anschließend für 45 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach dem Hitzeschock kühlte man die Bakterien zwei Minuten auf Eis ab, gab pro Ansatz 500 µl LB Medium zu und lies die Kultur für 60 min bei 37°C unter Schütteln anwachsen. Die

transformierten *E.coli* wurden dann 5 min bei 4000 U/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium wieder resuspendiert. Das Ausplattieren der Zellen erfolgte auf einem selektierenden Medium mit dem Antibiotikum, für das ein Resistenzgen in der eingebrachten Plasmid-DNA vorlag.

2.3.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

E.coli Bakterien können durch Behandlung mit Kalziumchlorid bei niedriger Temperatur in die Lage versetzt werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Bakterienkultur (XL-2) wurde in LB-Medium bei 37 °C so lange kultiviert, bis die Bakterienlösung eine optische Dichte (OD_{650}) von 0,2 bis 0,5 hatte. Die Zellen wurden nach Erreichen der Zelldichte für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation bei 4000 U/min über 10 min bei 4 °C geerntet und das Pellet in 20 ml eiskalter 50 mM Kalziumchlorid-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min wurden die Zellen erneut zentrifugiert (4000 U/min, 10 min, 4 °C) und anschließend in 4 ml eiskalter 50 mM Kalziumchlorid-Lösung resuspendiert. Für die Lagerung der Bakterien bei -80 °C wurden 3,4 ml der Bakteriensuspension (in 50 mM Kalziumchlorid-Lösung) mit 0,6 ml sterilem Glycin vermengt und jeweils 200 µl der Bakteriensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Es wurden 3 ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm über Nacht auf dem Schüttelinkubator herangezogen. 1,5 ml der Schüttelkultur wurden bei 4000 U/min. abzentrifugiert, das Kulturmedium entfernt und das Bakterienpellet in 100 µl der Lösung I (siehe 2.2.3 Lösungen für Plasmidisolierung) resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis werden 200 µl der Lösung II zur Lyse der Bakterien zugegeben und zur Durchmischung das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Dieser Schritt ermöglichte die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA: Proteine wurden durch SDS denaturiert, DNA durch das alkalische Milieu. Um denaturierte Proteine zu entfernen, erfolgte die Zugabe von 150 µl der Lösung III und eine 3 bis 5-minütige Inkubation auf

Eis. Die Sedimentation der dabei präzipitierten Proteine und Membranbestandteile mit der daran anhaftenden chromosomalen DNA erfolgte mittels Zentrifugation bei 13000 U/min für 5 min. Der Überstand der Zentrifugation wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 900 µl 100%igem Ethanol gefällt. Dazu wurde je 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 U/min pelletiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird verworfen und das Pellet der Plasmid-DNA in der Speedvac Zentrifuge für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Um die störende RNA aus dem Präparat zu entfernen, wird das Pellet nach der Trocknung in 10 µl RNase Mixes (120 µl H₂O + 5 µl RNase A) resuspendiert und bei 37°C etwa 20 min geschüttelt.

2.3.1.5 Isolierung von Plasmid DNA im größeren Maßstab (Midipräparation)

Für die Midipräparation wurden 50 ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit 50 µl Bakteriensuspension aus der Minipräparation angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator herangezogen. Die eigentliche Plasmidisolierung erfolgte mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen beziehungsweise Promega nach der beiliegenden Isolationsanleitung. Die Plasmid-DNA wurde mit 650 µl H₂O eluiert und bei –20°C gelagert. Die Ausbeuten lagen etwa bei 150 bis 250 µg Plasmid-DNA pro 50 ml Bakterienkultur.

2.3.1.6 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung erfolgte mittels des *QIAamp* DNA Mini Kits von Qiagen. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach Protokoll von Qiagen. Für die Isolierung genomischer DNA aus Blut wurden jeweils 200 µl Blut verwendet und nach Protokoll von Qiagen verfahren.

2.3.2 Molekularbiologische Methoden

2.3.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen zu analytischen Zwecken erfolgte meist in einem Volumen von 10 µl mit etwa 0,5 µg Plasmid-DNA, 5 U des entsprechenden Enzyms und 1 µl des vom Hersteller empfohlenen 10 × Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden für 1 bis 2 h bei der optimalen

Reaktionstemperatur inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Größe der DNA-Fragmente werden Agarosekonzentrationen von 0,8 bis 2% in 1 × TAE-Puffer verwendet. Die Auftragsproben werden mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und nach der Polymerisation des Gels in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm durchgeführt. Das Anfärben der DNA erfolgte mit einer Ethidiumbromid-Lösung für 10 bis 30 min, wobei das Ethidiumbromid zwischen die DNA interkaliert. Die aufgetrennte DNA wurde durch UV-Licht visualisiert und die Größe der Fragmente wurde durch einen ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA-Längenstandards abgeschätzt.

2.3.2.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden in 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und nach der Färbung in Ethidiumbromid-Lösung unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten. Die eigentliche Gelextraktion wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt.

2.3.2.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde mittels UV-Absorption in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für optische Dichten kleiner 1 gilt näherungsweise folgender linearer Zusammenhang:

1 OD_{260nm} Einheit = 50 µg/ml dsDNA und Plasmide bzw. 40 µg/ml RNA.

2.3.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide

Zur Herstellung von antisense Plasmiden, Expressionsplasmiden und Reportergenkonstrukten wurde das jeweilige DNA-Fragment (Insert) mittels PCR aus cDNA bzw. genomischer DNA amplifiziert. Die Primer für die PCR enthielten dabei zusätzlich die Sequenz für verschiedene Restriktionsschnittstellen. Der Plasmid-Vektor und die Insert-DNA wurden jeweils mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, mittels QIAquick® Gel Extraction Kit der

Firma Qiagen aufgereinigt und anschließend miteinander ligiert. Die Ligationsreaktion wurde 16 h bei 16 °C in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

- 0,3 - 0,5 µg Plasmid-Vektor
- 3-5 facher Überschuss der Insert DNA
- 2 µl 10 × Ligase-Puffer
- 1 µl T4 DNA Ligase (400 U)
- add 20 µl H₂O

2.3.2.6 RNA-Isolation aus Säugerzellen

Die Isolation von RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Konfluent wachsende Zellen wurden einmal mit PBS gespült und anschließend mit einem Zellschaber von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst. Die Zellen werden bei 3000 U/min pelletiert. Das Zellpellet wurde in RNA Lysispuffer resuspendiert und lysiert. Die RNA wurde nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

2.3.2.7 Reverse Transkription

Pro Reaktionsansatz wurde 1 µg Gesamt- RNA, die aus Zelllinien bzw. Gewebe mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen extrahiert wurde, eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt:

- 4 µl First Strand buffer (5 ×)
- 2 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl dN₆ random-Primer
- 11 µl RNA + H₂O

Der Ansatz wurde 5 min bei 70 °C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Nach der Denaturierung wurde 1 µl (200 U) Superscript II zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 37 °C für 60 min. Danach wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min inaktiviert. Eine anschließende Inkubation mit 1 µl RNase für 30 min bei 37 °C entfernte die restliche störende RNA. Die fertige cDNA wurde bei –20 °C eingefroren.

2.3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerasekettenreaktion

genutzt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 µl.

Reaktionsansatz:

- 10 ng Template-DNA
- 5 µl 10 × PCR-Puffer
- 1 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1 µl Primer sense (20 mM)
- 1 µl Primer antisense (20 mM)
- 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)

PCR-Programm:

- | | |
|------------------------------|--------------------|
| 1. Denaturierung: | 5 min, 94 °C |
| 2. Denaturierung: | 30 sec, 94 °C |
| 3. Annealing: | 45 sec, 55 – 68 °C |
| 4. Elongation: | 45 sec, 72 °C |
| 5. abschließende Elongation: | 5 min 72 °C |

Nach Ablauf der PCR werden 10 µl des Ansatzes auf einem analytischen Agarosegel überprüft.

2.3.2.9 Quantitative Real-time PCR

Die Quantifizierung der Expressionsstärke von mRNA wurde in einer quantitativen RT-PCR Reaktion mit Hilfe des LightCycler II Systems (Roche Diagnostics, Mannheim) und mit dem SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa Bio Inc., USA) durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem in 2.3.2.7 beschriebenen Protokoll. Die quantitative RT-PCR Reaktion wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt:

- 10 ng cDNA Template
- 10 µl DNA Master SYBR Green Mix (2x)
- je 0,5 µl der Primer (20 mM)
- add 20 µl H₂O

Der Versuchsansatz wurde dabei folgendem Programm im LightCycler II unterzogen:

Denaturierung:	1 Zyklus:	20 °C/ s auf 95 °C, 30 sec
Amplifikation:	40 Zyklen:	20 °C/ s auf 95 °C, 3 sec
		20 °C/ s auf x °C, 5 sec
		(x °C: optimierte Temperatur für jedes Primerpaar)
		20 °C/ s auf 72 °C, 16 sec
Analyse der Schmelzkurve:	1 Zyklus:	20 °C/ s auf 95 °C, 15 sec
		20 °C/ s auf 65 °C, 15 sec
		20 °C/ s auf 95 °C, 15 sec
		0,1 °C/ s auf 40 °C

Als Standard zur Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde das Haushaltsgen β -Aktin benutzt. Die Quantifizierung der mRNA Expression erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers.

2.3.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurde das Kulturmedium von konfluent wachsenden Säugerzellen abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit dem Zellschaber abgeschabt und in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 3000 U/min für 5 min wurde das Zellpellet in 200 μ l RIPA Puffer lysiert und danach 15 min bei 4 °C im Schüttelinkubator geschüttelt. Die in Puffer gelösten Proteine konnten dann durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 13000 U/min und 4 °C von den nicht-löslichen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Das Proteinextrakt wurde in neue Gefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten für HIF-Western Blots wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, abgeschabt und bei 2000 U/min für 5 min bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 100 – 250 μ l HIF-RIPA Puffer gelöst und zur Scherung der DNA zweimal für 1 min bei 4 °C sonifiziert. Nach 15 min auf Eis wurden die noch nicht gelösten Proteine durch Zentrifugation (13000 U/min; 10 min; 4 °C) abgetrennt und der Überstand in neue Gefäße überführt.

2.3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach der Methode von Smith *et al.* [176] unter Verwendung des BCA-Protein-Assay Kits (Pierce) durchgeführt. Diese basiert auf der alkalischen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine (Biuret Reaktion), welches mit Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet, der durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann.

Zu 5 μl Gesamtproteinlösung bzw. 1 μl Kernproteinlösung mit 4 μl H_2O wurden 200 μl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in eine 96-Well Platte gegeben und 20 min bis zur Entwicklung der violetten Färbung bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messung bei 562 nm in einem ELISA-Reader konnte die Absorption bestimmt werden, die durch parallele Quantifizierung von BSA-Standards in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden konnte.

2.3.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt werden. Das im Probenpuffer enthaltene SDS denaturiert die Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung. 40 μg Proteinproben wurden jeweils in 1 \times Roti-Load 10 min bei 70°C zur vollständigen Denaturierung aufgekocht und anschließend bei 0,8 mA/cm^2 durch SDS-PAGE auf 8% bis 15% Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

2.3.3.4 Western Blot

Um durch SDS-Page aufgetrennte Proteine durch Antikörper nachzuweisen, wurden diese auf eine PVDF-Membran geblottet. Hierzu wurden die SDS-PAGE Gele nach dem Gellauf zusammen mit der PVDF-Membran 10 min in 1 \times Western-Blot Puffer getränkt und danach die Proteine mittels elektrophoretischem Transfer (Whatman Biometra, Fastblot B34 Unit, 1 h bei 1,5 mA/cm^2) auf die Membran übertragen. Die Western Blot-Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in PBS mit 3% BSA inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:1000-1:10000) geschwenkt. Nach dem Waschen (3 \times 5 min mit PBS) wurde die Membran mit einem gegen den konstanten Teil des Primär-Antikörpers gerichteten (speziesspezifischen) Sekundär-Antikörper (1:4000) für

1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sekundär-Antikörper sind mit einer Alkalischen Phosphatase zur Detektion einer Farbreaktion konjugiert. Nach dreimaligem Waschen (3×10 min mit PBS) wurde das Substrat für die alkalische Phosphatase (BCIP/ NBT Substrate Kit) zugegeben und die Membran darin inkubiert bis sich eine Farbreaktion zeigte.

2.3.3.5 SELDI-TOF-Massenspektrometrie

Proteininteraktionen können mittels SELDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt werden. Die SELDI-TOF-MS Technologie (**S**urface-**e**nhanced **l**aser **d**esorption / **i**onization **t**ime-**o**f-flight **m**ass **s**pectrometry) besteht aus Protein-Chip Arrays und Massenspektrometrie zur Identifizierung von Proteininteraktionen. Diese Untersuchungen wurden bei unserem Kooperationspartner Christian Melle (Core Unit Chip Application, Institut für Human Genetik und Anthropologie, Friedrich-Schiller- Universität, Jena) durchgeführt.

Dazu wurden 30 μ l Streptavidin Agarose Beads (Molecular Probes; Eugene, OR) mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 μ l rekombinantem biotinyliertem MIA bzw. TANGO in PBS über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Beads nur mit PBS inkubiert. Parallel dazu wurden 5×10^6 Mel Im Zellen, welche mit bzw. ohne PMA kultiviert wurden, lysiert. Der Lysepuffer bestand dabei aus folgenden Komponenten: 100 mM Natrium Phosphat pH 7,5, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 3 mM 2- β -Mercaptoethanol, 0,1% CHAPS, 500 μ M Leupeptin und 0,1mM PMSF. Anschließend wurde das Zelllysate ebenfalls mit Streptavidin Agarose Beads inkubiert, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Im Anschluss wurde das gereinigte Zelllysate mit den Streptavidin Agarose Beads, welche mit rekombinantem MIA bzw. TANGO inkubiert wurden, vermengt und für 2 Stunden auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die ungebundenen Proteine wurden durch mehrmaliges Waschen mit PBS 0,5 mM Natrium Chlorid, 0,05% Triton X-100 und Aqua bidest entfernt. Die gebundenen Proteine wurden durch 30 μ l 50% Acetonitril / 0,5% Trifluoroacetic acid durch Vortexen von den Beads gelöst.

Die Identifizierung der Proteine wurde wie von Melle *et al.* beschrieben durchgeführt [177]. Die Eluate wurden dann mit der SpeedVac auf 10 μ l Gesamtvolumen aufkonzentriert und auf ein SDS Gel aufgetragen. Im Anschluss wurde das Gel mit Simply Blue Safe Stain (Enhanced Coomassie, Invitrogen)

gefärbt. Interessante Gelbanden wurden ausgeschnitten, entfärbt und getrocknet. Im Anschluss wurden diese wieder rehydriert und mit 10 µl einer Trypsinlösung (0,02 µg/µl; Promega) über Nacht bei 37 °C verdaut. Der Überstand des Verdaus wurde direkt auf einen NP20 ProteinChip Array (Ciphergen) aufgetragen und mit dem ProteinChip Reader (Serie 4000, Ciphergen) nach einem automatisiertem Programm vermessen. Ein Standard Protein Mix (all-in-1 peptide standard mix; Ciphergen), welcher Arg8-Vasopressin (1082.2 Da), Somatostatin (1637.9 Da), Dynorphin (2147.5 Da), ACTH (2933.5 Da) und Insulin beta-chain (3495.94 Da) enthält, wurde zur Kalibrierung verwendet. Potentiell mit MIA interagierende Proteine wurden ermittelt, indem die identifizierten Peptidfragmente in ein öffentlich zugängliches Suchprogramm eingegeben wurden (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe).

2.3.3.6 Ko-Immunpräzipitation

100 µg RIPA Zelllysat aus verschiedenen Zelllinien wurde in Bindungspuffer (20 mM NaPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5) gelöst und mit dem anti-Cadherin-7 Antikörpers (CCD7 [178]) inkubiert. Danach wurde eine Stunde mit 20 µl protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham, Biosciences) inkubiert. Daraufhin wurde dreimal mit Bindungspuffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 20 µl nicht-reduzierenden Lämmli Puffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C erhitzt. Aufgetrennt wurde die Ko-Immunpräzipitation auf 15%tigem Polyacrylamidgel. Proteinbindung an Cadherin-7 wurde mittels eines Western Blots identifiziert. Die spezifische Interaktion mit MIA wurde mittels einer 1:200-Verdünnung (3% BSA/PBS) des anti-MIA (1705) Antikörpers [72] nachgewiesen.

2.3.3.7 Herstellung von rekombinanten biotinyliertem MIA und TANGO

Um die Detektion von MIA in den Versuchen einfacher zu gestalten, wurde das Protein mit Biotin markiert. Zunächst wurde die cDNA von MIA in den Expressionsvektor pIVEX2.3-MCS (Roche) kloniert. Die Sequenz beinhaltet einen Abschnitt, der für eine Biotinbindestelle kodiert (*Avi-Tag*). Die 5'Primer wurden mit einer NdeI-Restriktionsschnittstelle, einer *Avi-Tag*-Sequenz und einer FXa-Schnittstelle hergestellt. Die 3'Primer enthielten ein Stop-Kodon und eine BamHI-Restriktionsschnittstelle. In einer PCR-Reaktion wurde der mit *Avi-Tag* fusionierte, kodierende Teil der MIA-cDNA ohne Signalsequenz amplifiziert. Das

Produkt wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pIVEX2.3-MCS (Roche) kloniert. Dieses Expressionsplasmid wurde dann in das *Rapid Translation System* (RTS, Roche) eingesetzt. Dies ist ein zellfreies, auf *E.coli* basierendes, *in vitro* Protein Transkriptions-/Translationssystem. Durch Zugabe von Biotin, ATP und der *E.coli* Biotinligase BirA wurde das Protein am eingefügten Avi-Tag am N-Terminus biotinyliert [72]. Rekombinantes biotinyliertes TANGO wurde nach derselben Vorgehensweise hergestellt [79]. Mit Hilfe des RTS-Systems war es möglich, ausreichend große Proteinmengen von etwa 4 µg/µl für funktionelle Assays herzustellen.

2.3.4 Zellkulturmethoden

2.3.4.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese nach Waschen mit PBS für 5 min mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei 37°C inkubiert, in DMEM mit 10% FKS aufgenommen und 1 : 5 bis 1 : 10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

2.3.4.2 Transfektion von Zellkulturen

Zur Transfektion von Melanomzellen mit Plasmiden wurde die Lipofektamin Methode mit Lipofektamin™ Reagent und LipofektaminPlus Reagent (Invitrogen) verwendet. Für transiente Transfektionen wurden Zellen in 6-Well Platten mit 50-80%iger Konfluenz benutzt, die Zellen mit frischem Medium versorgt und der Transfektionsansatz nach Angaben des Herstellers zugegeben. Dabei wurden 0,02 bis 0,5 µg an Plasmid-DNA pro Versuchsansatz eingesetzt. Das Transfektionsgemisch wurde nach 4h durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur Ernte weitere 24 bis 48 h inkubiert.

Transfizierte Zellen wurden entweder mit Luciferase-Reportergen-Analysen (siehe Kapitel 2.3.4.3) untersucht oder es wurde Gesamtproteinextrakt (siehe Kapitel 2.3.3.1) bzw. RNA (siehe Kapitel 2.3.2.6) hergestellt.

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde der Vektor mittels einer Transfektion mit Lipofektamin in die Zellen eingebracht und durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums zum Kulturmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. Das Selektionsantibiotikum wurde je nach Resistenzgens des transfizierten

Vektors ausgewählt. Es wurde das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Durch das Selektionsmedium konnten nur Zellen überleben, die den gewünschten Vektor aufgenommen haben.

Short-interfering RNAs (siRNA) wurden mittels des HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) transfiziert. Die pelletierten Zellen wurden in Medium ohne FKS resuspendiert und jeweils 200.000 Zellen davon in 6-Well Platten in FKS-freiem Medium ausgesät. Der Transfektionsansatz (5,4 µl siRNA (20 µM), 94,6 µl Medium ohne FKS, 18 µl HiPerFect) wurde nach 10 min Inkubationszeit tropfenweise auf die flottierenden Zellen gegeben. Nach 4 Stunden wurde FKS zugegeben. Die Ernte der Zellen oder eine Transfektion mit Lipofektamin eines Expressionsplasmid erfolgte nach insgesamt 24 h.

2.3.4.3 Luciferase-Reportergen-Assay

Regulatorische DNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe von sogenannten Reportergen Analysen untersuchen. Die bei den Transfektionen verwendeten Plasmide stellen sogenannte Luciferase-Vektoren dar. Um die Aktivität eines Promotors zu untersuchen, wird ein DNA-Fragment, das den Promotorbereich des Gens enthält, vor das *Luciferase*-Gen des Reporterplasmids pGL3-basic kloniert. Die Expression des Reportergens verhält sich im eukaryontischen Testsystem proportional zum Aktivierungspotential des klonierten DNA-Fragments. Durch Zugabe eines Substrats (Luciferin) für das Enzym Luciferase kommt es zur Chemilumineszenz, welche an einem Luminometer gemessen wird. Um die unterschiedliche Transfektionseffizienz der einzelnen Versuchsansätze anzugleichen, wurden die Zellen mit einem Kontrollvektor (pRL-TK, Promega, Heidelberg), der das Renilla Luciferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält, kotransfiziert. Die Chemilumineszenz der Renilla Luciferase wurde ebenfalls im Luminometer erfasst.

Zur Durchführung des Luciferase Assays wurde der *Luciferase Assay Kit* (Promega) verwendet. Hierfür wurden je 250.000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und mit Lipofektamin (siehe 2.3.4.2) transfiziert. Zur Ernte wurde das Kulturmedium der transfizierten Zellen abgegossen und die Zellkultur zweimal mit normalem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden pro Well der 6-Well Kulturplatte 300 µl Lysispuffer zugegeben und die Zellen 20 min bis zu 2 h auf

einem Schüttler lysiert. Nach der Lyse wurden je 50 µl eines Versuchsansatzes, mit den im Kit bereitgestellten Chemikalien im Luminometer vermessen.

2.3.4.4 Migrations- und Matrigel Invasions-Assay (Boydenkammer)

Der Migrations- bzw. Matrigel Invasions-Assay diente zur Untersuchung der Migration und Invasivität von verschiedenen Zellklonen. Dazu wurden spezielle Kammern, die Boydenkammern im unteren Kompartiment mit 210 µl konditioniertem Medium befüllt. Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden konfluente Fibroblasten 24 h in Medium ohne FKS kultiviert, dieses Medium anschließend abgenommen, abzentrifugiert und für den Assay benutzt. Auf das konditionierte Medium im unteren Kompartiment wurde eine Polykarbonat-Membran (Neuro Probe, Inc., USA) mit einer Porengröße von 8 µm luftblasenfrei aufgelegt und der Aufsatz der Boydenkammer aufgeschraubt. Bei den Migrations Assays wurde die Membran vor der Verwendung mit Gelatine beschichtet. Für die Herstellung der Gelatinemembranen wurden die Polykarbonat-Filter 20 min in 0,5% Essigsäure bei 50°C langsam gerührt, anschließend über einen Faltenfilter abfiltriert und 2 x mit Aqua bidest gespült. Danach wurden die Filter für 1 h in 5 mg/l Gelatine (in Wasser) gekocht, abfiltriert und mit einer Pinzette auf Whatman Papier verteilt. Nach einstündiger Trocknung bei 100°C konnten die Filter für Migrations-Assays eingesetzt werden.

Für die Invasions-Assays wurden zusätzlich 52 µl Matrigel (1:3 verdünnt, BD Biosciences, USA) auf die Membran pipettiert und die Kammer leicht auf der Tischoberfläche aufgeklopft, um das Gel gut zu verteilen. Das Gel wurde zum Gelieren für 30 min bei 37°C inkubiert. Bei beiden Assays wurden die jeweiligen Zelllinien bzw. Zellklone mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und gezählt, um eine Zellzahl von 30.000 Zellen pro ml (Migrations-Assay) bzw. von 200.000 Zellen pro ml (Invasions-Assay) einzustellen. Die Zellen wurden dabei in DMEM ohne FKS aufgenommen. Von der jeweiligen Zellsuspension wurden je 800 µl pro Boydenkammer in das obere Kompartiment eingebracht und 4 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension aus allen Kammern abgegossen, der Aufsatz abgeschraubt und der Filter herausgenommen. Die Oberseite der Filter wurde an einem mit Wasser getränktem Papiertuch abgewischt, in einen Färberahmen eingelegt und in einer Hemacolor Schnellfärbung, bestehend aus Fixierlösung, roter Färbelösung

(Eosin) und blauer Färbelösung (Hämalaun) gefärbt, mit Leitungswasser gespült und mit der Unterseite nach oben auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurde die Anzahl der gewanderten Zellen im Mikroskop bestimmt.

2.3.4.5 Durchflußzytometrische Analyse von Zellen (FACS)

Um die Cadherin-7 Expression auf der Zelloberfläche zu analysieren, wurden die Zellen mit 5 mM EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und in PBS resuspendiert. Es wurden jeweils 10^6 Zellen eine Stunde lang mit 4% Paraformaldehyd (gelöst in PBS) bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit einer 1:1000 - Verdünnung des anti-Cadherin-7 Antikörpers in 3% BSA/ PBS eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Der Cadherin-7 Antikörper wurde von Dr. Veronica Contreras-Shannon (UTHSCSA, USA) hergestellt. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (FITC anti-rabbit, DakoCytomation) für 30 min bei 4 °C versetzt. Nach zusätzlichen Waschschritten wurden die Zellen in einem Volumen von 300 bis 500 µl PBS resuspendiert und die FACS-Analyse wurde am BD FACSCalibur durchgeführt. Die Auswertungen erfolgten mit dem Softwareprogramm *Cellquest* (Beckton Dickinson).

2.3.4.6 Proteinnachweis mittels Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 100.000 Zellen auf sogenannten "4er Lap Tek" (chamber cover slide) ausgesät. Es wurde der F-Actin Rhodamine-Phalloidin based kit (Amersham Biosciences, Deutschland) verwendet und nach den Vorschriften des Herstellers vorgegangen. Eine Stunde vor der Fixierung wurden die Zellen mit 100 ng/ml mit rekombinanten biotinyliertem MIA behandelt. Nach der Fixierung, Permeabilisierung und mehreren Waschschritten wurden die Zellen 1h mit der Blockierungslösung (1% BSA/PBS) bedeckt. Danach wurden die Zellen mit einer 1:20-Verdünnung des MIA (1705) Antikörpers (Biogenes, Berlin) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit einer 1:20-Verdünnung (in PBS) des sekundären Antikörpers (FITC antirabbit, DakoCytomation, Dänemark) für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen, auf dem Objektträger „eingedeckelt“ und die Zellkerne mit einer DAPI-Lösung (Vectashield, H-1500) angefärbt. Die Bilder wurden mit dem Zeiss Axio Imager.Z1-Mikroskop aufgenommen.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der GraphPad Prism Software (GraphPad software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit dem Student's paired t-test ermittelt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der ersten beiden Abschnitte konnten bereits publiziert werden [179, 180]. Eine dritte Veröffentlichung über die Rolle von HIF-1 α im Melanom ist in Vorbereitung. Im folgendem werden die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, dargestellt und ausführlich diskutiert.

3.1 Bedeutung von Cadherin-7 im malignen Melanom

3.1.1 Charakterisierung von MIA-Bindungspartnern

Es wurde bereits beschrieben, dass MIA mit Proteinen der extrazellulären Matrix und Integrinen interagieren kann [Review 67]. Zur Identifikation neuer Bindungspartner von MIA, wurden Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit anschließender SELDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Diese Experimente wurde von Dr. Stephanie Arndt und Dr. Christian Melle am Universitätsklinikum Jena durchgeführt. Mit dieser SELDI-Technologie können bei der Suche nach Proteininteraktionen eines bestimmten Moleküls Gesamtproteinlysate analysiert werden. Dazu wurden Proteinlysate der Melanomzelllinie Mel Im verwendet und für eine Ko-Immunpräzipitation mit rekombinanten, biotinylierten MIA behandelt. Es wurden die an biotinyliertes MIA gebundenen Proteine präzipitiert und diese anschließend in der Gel-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt (Abb. 3-1 / A). Eine spezifische Proteinbande wurde später im Massenspektrum als Cadherin-7 identifiziert. Um auszuschließen, dass das Protein an den biotinylierten N-Terminus des rekombinanten MIA bindet, wurde als Negativkontrolle rekombinantes, biotinyliertes TANGO [181], ein Protein der MIA-Familie, verwendet. Dieser Versuch bestätigte die spezifische Bindung an MIA und identifizierte Cadherin-7 als weiterer endogener MIA-Interaktionspartner. Phage Display Assays, die von Dr. Ines Hochkeppler durchgeführt wurden, unterstützen zusätzlich die Interaktion von MIA und Cadherin-7. Diese Untersuchungen zeigen eine Bindung von MIA im Bereich der Transmembrandomäne von Cadherin-7.

Die Bindung zwischen MIA und Cadherin-7 konnte durch Ko-Immunpräzipitation bestätigt werden, indem Proteinlysate von drei verschiedenen Melanomzelllinien verwendet und mit einem Cadherin-7 Antikörper behandelt wurden. Bei diesem

Ko-Immunpräzipitations-Ansatz wurde die Interaktion von Cadherin-7 und MIA nochmals dargelegt (Abb. 3-1 / B).

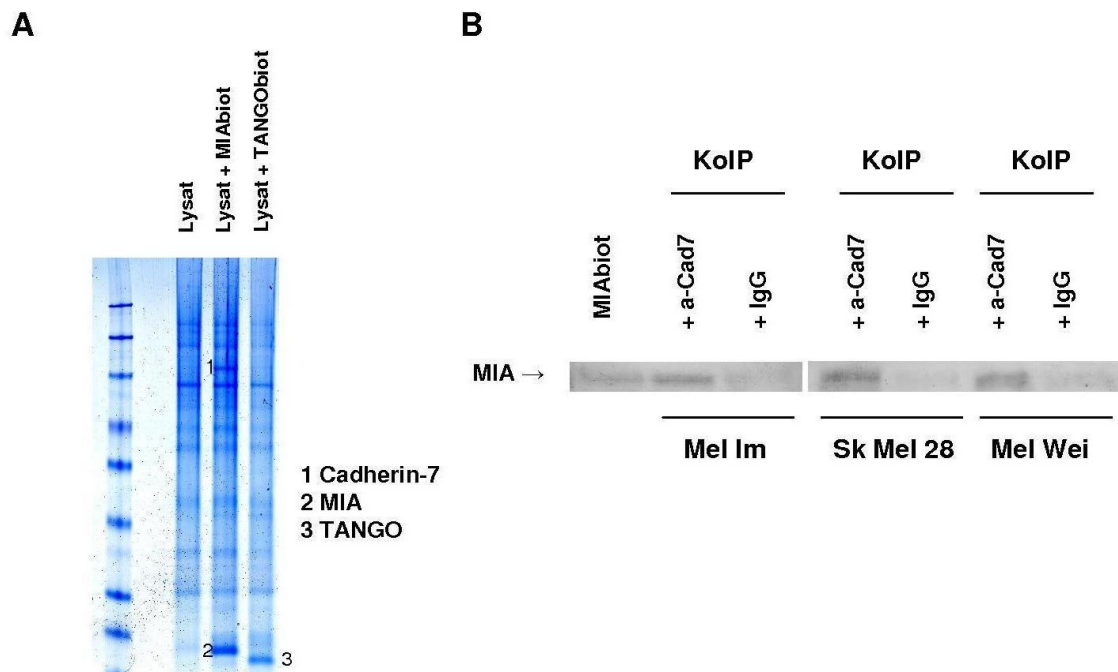


Abbildung 3-1: Identifizierung von Cadherin-7 als MIA-Bindungspartner

(A) Mit Hilfe der SELDI-Technologie können Proteininteraktionspartner bestimmt werden. Es wurde zuerst eine Ko-Immunpräzipitation mit rekombinanten MIA- bzw. TANGO-behandelten Proteinlysaten von Mel Im Zellen durchgeführt, wobei die präzipitierten Proteine anschließend über Massenspektrometrie identifiziert werden können. Zuerst wurde dazu ein mit Streptavidin Agarose Beads beschichteter Proteinchip mit rekombinantem biotinyliertem MIA bzw. TANGO behandelt und inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Beads nur mit PBS inkubiert. Im Anschluss wurden die Mel Im Zelllysate mit den Streptavidin Agarose Beads, die mit rekombinanten MIA bzw. TANGO behandelt wurden, inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden von dem Proteinchip eluiert, aufkonzentriert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Bei der anschließenden Coomassie-Färbung zeigte sich durch die Interaktion mit MIA eine zusätzliche Bande (1) im Vergleich zu den Negativkontrollen. Diese Bande wurde ausgeschnitten, entfärbt und mit Trypsin verdaut. Das trypsinierte Produkt wurde mittels SELDI-TOF-Massenspektrometrie als Cadherin-7 identifiziert.

(B) Ko-Immunpräzipitationsexperimente bestätigten die direkte Interaktion von MIA und Cadherin-7. Dazu wurde ein Cadherin-7 Antikörper (a-Cad7) verwendet. Die Interaktion wurde in drei Melanomzelllinien durch Western Blots mit einem MIA-Antikörper nachgewiesen. Rekombinantes MIA diente dabei als Positivkontrolle und IgG als Negativkontrolle.

3.1.2 Expression von Cadherin-7 in Melanomzelllinien

Es wurde von einer weiteren Arbeitsgruppe bereits festgestellt, dass Cadherin-7 im Melanom exprimiert wird [182]. Um das Expressionsmuster von Cadherin-7 auch mit unseren im Labor zur Verfügung stehenden Melanomzelllinien zu analysieren, wurden quantitative Real-Time PCRs von Melanomzelllinien durchgeführt. Interessanterweise zeigten die Zelllinien aus Primärtumoren eine

hohe Expression von Cadherin-7 im Vergleich zu metastatischen Zelllinien. In normalen Melanozyten (NHEM) war die Cadherin-7 Expression sehr gering bzw. nicht detektierbar (Abb. 3-2 / A). Im Gegensatz zu Cadherin-7 steigt die Expression von MIA in Metastasen im Vergleich zu Zelllinien aus Primärtumoren an (Abb. 3.2 / B).

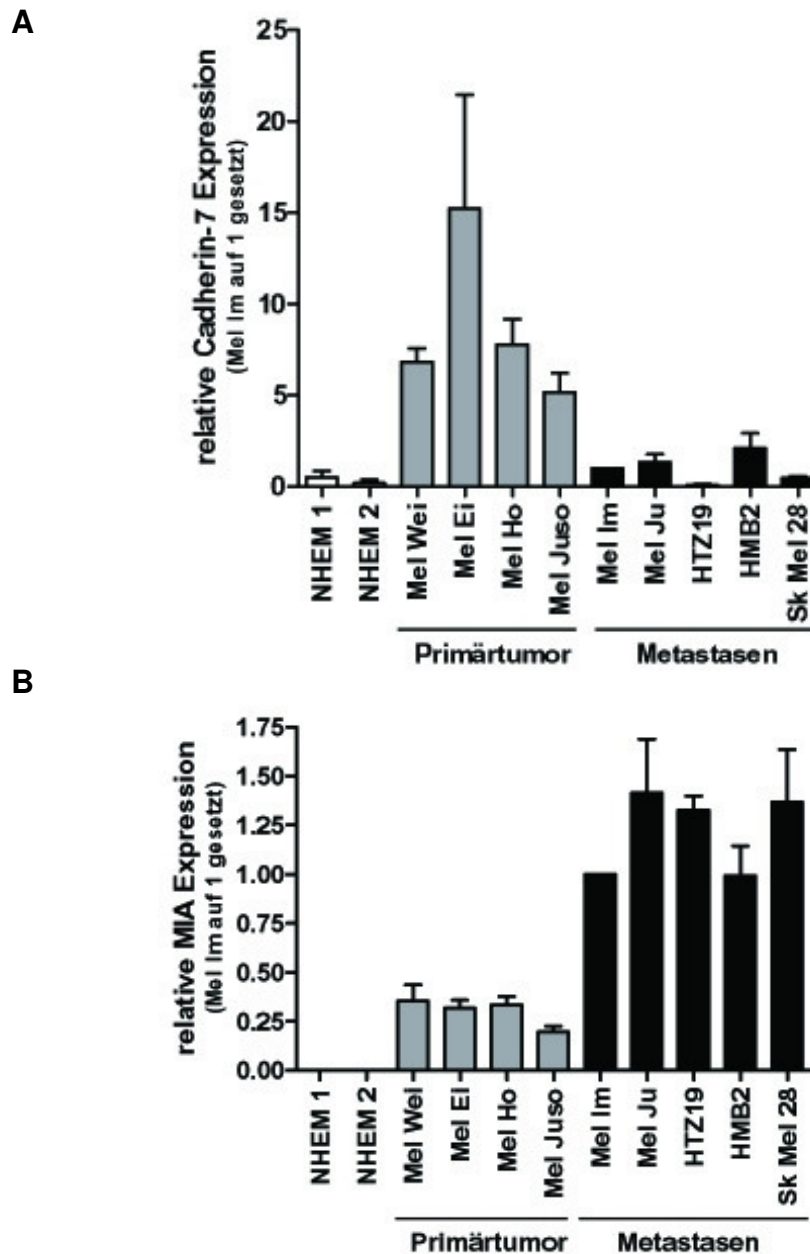
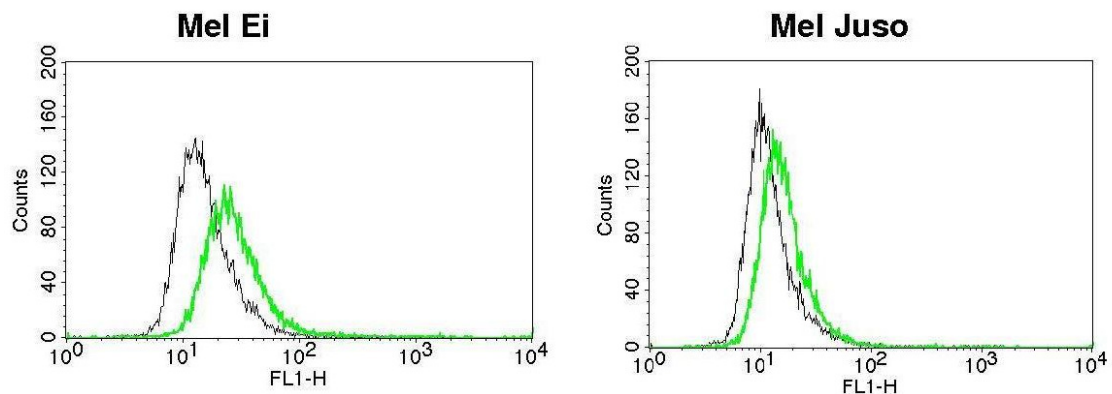


Abbildung 3-2: **Expressionsmuster von Cadherin-7 und MIA im malignen Melanom**
 (A) Quantitative RT-PCR zeigte eine hohe mRNA-Expression von Cadherin-7 im Primärtumor im Vergleich zu Zelllinien aus Metastasen. In normalen Melanozyten (NHEM) wurde nur eine sehr geringe Menge an Cadherin-7 detektiert.
 (B) In den metastatischen Zelllinien zeigte sich im Vergleich zu den Melanomzelllinien von Primärtumoren eine starke mRNA-Expression von MIA. In den Melanozyten (NHEM) wird dagegen kein MIA exprimiert.

Um die differentielle Expression von Cadherin-7 im Primärtumor und in Metastasen zu bestätigen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Übereinstimmend mit den RNA-Daten wiesen die Zelllinien aus Primärtumoren (Mel Ei, Mel Juso) im Vergleich zu den Metastasen (Mel Im, Mel Ju) einen höheren Gehalt von Cadherin-7 auf der Zelloberfläche auf (Abb. 3-3).

Zelllinien von Primärtumoren



Zelllinien von Metastasen

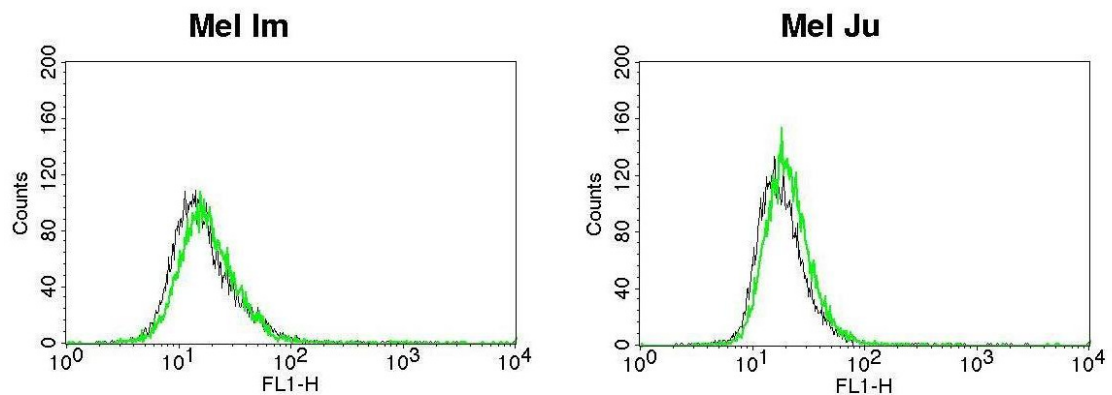


Abbildung 3-3: **Analyse der Präsentation von Cadherin-7 auf der Zelloberfläche**

FACS-Experimente wurden mit Zelllinien aus Primärtumoren und Metastasen durchgeführt. Die Zelllinien wurden mit einem Cadherin-7 Antikörper inkubiert. Dabei zeigte sich eine Bindung an Cadherin-7 auf der Zelloberfläche (grüne Linien). Die schwarzen Linien präsentieren die Negativkontrollen. Es wurde eine höhere Expression von Cadherin-7 in Zelllinien aus Primärtumoren im Vergleich zu den Metastasen festgestellt.

Als nächstes wollten wir zeigen, dass MIA mit Cadherin-7 an der Zellmembran kolokalisiert. Deshalb haben wir für eine Immunfluoreszenzfärbung Mel Juso Zellen (Mock-Kontrolle), die Cadherin-7 exprimieren, und Zellen mit einem reduzierten Cadherin-7 Gehalt (asCad7 #4) mit MIA angefärbt und analysiert. In

den Mel Juso Kontrollzellen ist ein hoher Gehalt von MIA an der Zellmembran lokalisiert. Im Vergleich dazu wurde in dem asCad7-Zellklon eine geringere Menge an MIA festgestellt (Abb. 3-4). Dies deutet darauf hin, dass verschiedene Mengen von MIA, abhängig von der Cadherin-7 Konzentration, an die Zelloberfläche binden können und dass MIA mit Cadherin-7 an der Zellmembran von Melanomzellen interagiert.

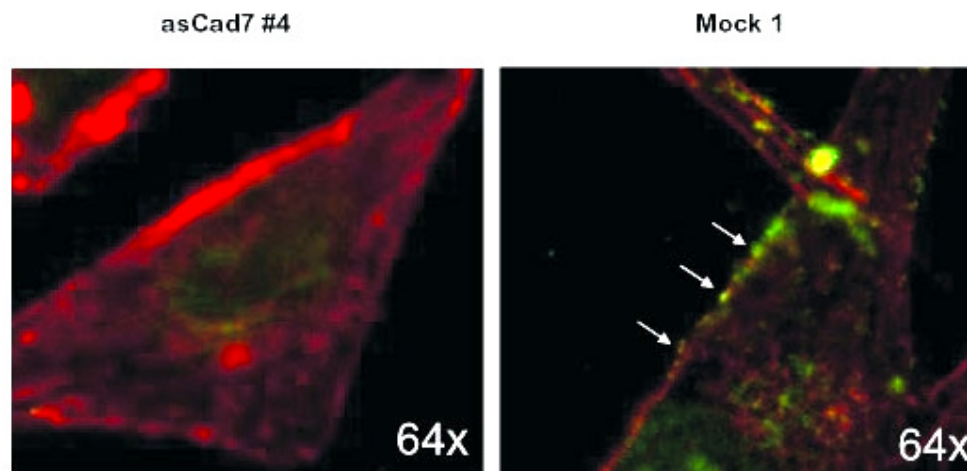


Abbildung 3-4: **Ko-Lokalisation von Cadherin-7 und MIA**

Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, bei der die Melanomzellen mit MIA angefärbt wurden. Dabei wurden Mel Juso Zellen verwendet, die Cadherin-7 exprimieren (Mock 1) bzw. eine reduzierte Expression von Cadherin-7 (asCad7 #4) aufweisen. Das Aktinzytoskelett wurde mit Rhodamine-Phalloidin angefärbt (rot). Die Zellen wurden 1 h mit rekombinanten biotinylierten MIA behandelt, fixiert und mit einem MIA-Antikörper angefärbt (grün). Die Mock-Kontrolle zeigte einen höheren Gehalt von MIA an der Zellmembran (Pfeile) als die mit asCad7 stabil transfizierten Zellen.

3.1.3 Einfluss von Cadherin-7 auf die Migration von Melanomzellen

Zur Analyse der Funktion von Cadherin-7 im Melanom wurden stabile Zellkone einer Primärtumorzelllinie (Mel Juso) hergestellt, die mit einem antisense Cadherin-7 (asCad7) exprimierenden Vektor transfiziert wurde. Eine verminderte mRNA Expression von Cadherin-7 in diesen Zellklonen wurde mittels quantitativer Real-time PCR (nicht gezeigt) nachgewiesen. FACS-Analysen bestätigten eine verminderte Expression von Cadherin-7 der stabilen antisense Cadherin-7 Zellklone (Abb. 3-5).

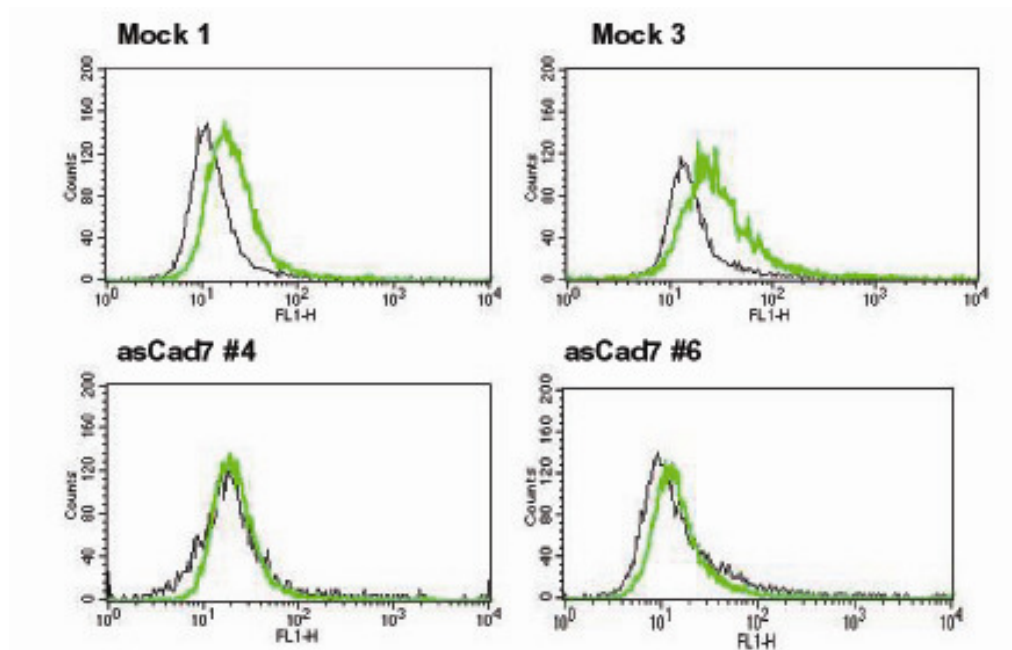


Abbildung 3-5: **Expression von Cadherin-7 der stabilen antisense Cadherin-7-Klone**
Die Primärmelanomzelllinie Mel Juso wurde mit einem antisense Cadherin-7 Konstrukt stabil transfiziert und die Zellklone (asCad7 #4, #6) wurden mittels FACS-Analysen untersucht. Die antisense Cadherin-7 Zellklone zeigten eine verminderte Oberflächenexpression von Cadherin-7 im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Klonen (Mock 1, Mock 3).

Eine Modulation der Expression von Cadherin-7 brachte keine Veränderungen in der Proliferation von Melanomzellen. Hingegen zeigten Boydenkammer-Assays eine verminderte Migration der asCad7-Zellklone im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Mel Juso Zellen (Abb. 3-6). Dies deutet auf eine unterstützende Rolle von Cadherin-7 in der Migration von Primärtumorzellen hin.

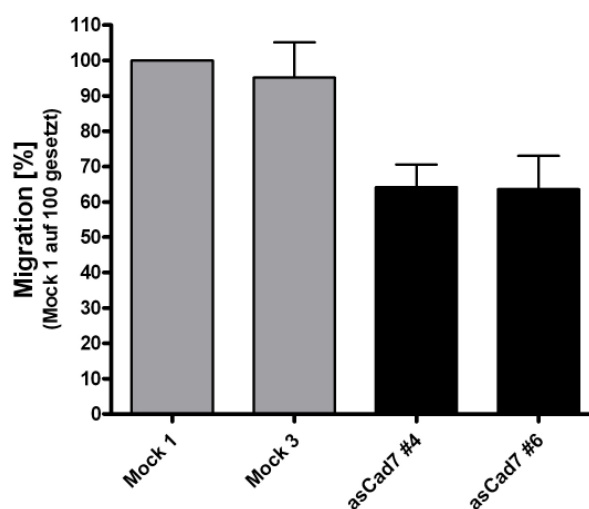


Abbildung 3-6: **Migration der antisense Cadherin-7 Zellklone**
Boydenkammer-Assays zeigten eine verminderte Migration der mit antisense Cadherin-7 stabil transfizierten Mel Juso Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Mock 1 und 2).

Als nächstes wurden stabile Zellklone einer Melanommetastase (Mel Im) hergestellt, die eine erhöhte Expression von Cadherin-7 aufweisen. Dazu wurden die Zellen mit einem sense Cadherin-7 exprimierenden Vektor (cCad7) transfiziert. Die Überexpression von Cadherin-7 wurde mittels RT-PCR (nicht gezeigt) und FACS-Analysen bestätigt (Abb. 3-7).

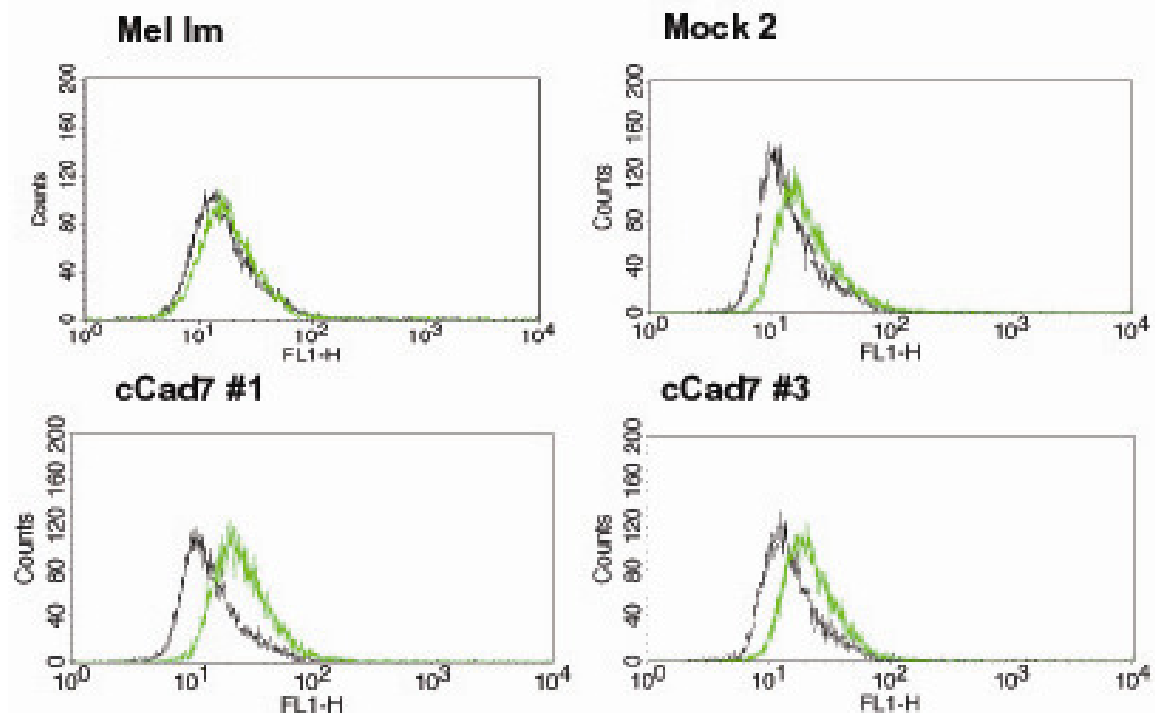


Abbildung 3-7: **Cadherin-7 Expression der stabilen full length Cadherin-7 Zellklone**

Mel Im Zellen wurden mit einem Cadherin-7 überexprimierenden Vektor stabil transfiziert und die Oberflächenexpression von Cadherin-7 wurde mit FACS-Analysen untersucht. Die Cadherin-7 Zellklone (cCad7 #1, #3) zeigten eine Induktion der Cadherin-7 Expression im Vergleich zu dem Kontrollklon (Mock 2) sowie zur parentalen Zelllinie Mel Im.

Untersuchungen der Proliferation zeigten in Mel Im Zellen keinen Einfluss durch eine erhöhte Expression von Cadherin-7. Interessanterweise migrierten die Zellen aus Melanommetastasen (Mel Im) durch eine Induktion der Cadherin-7 Expression weniger als die Kontrollzellen (Abb. 3-8). Das scheint im Widerspruch zu der beobachteten migrationsfördernden Eigenschaft von Cadherin-7 in Primärtumoren zu stehen. Hier scheint es, als ob Zellen aus Melanommetastasen die Expression von endogenem Cadherin-7 herunterregulieren müssen, um ihre Migrationsfähigkeit zu erreichen.

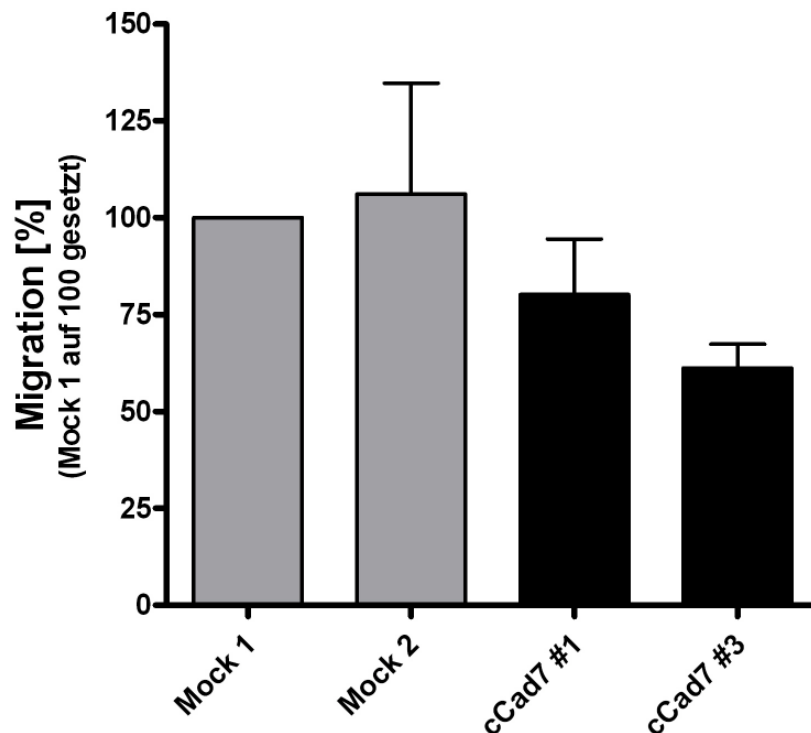


Abbildung 3-8: **Migration der Cadherin-7 überexprimierenden Zellklone**

Mel Im Zellen wurden stabil mit einem Cadherin-7 überexprimierenden Vektor transfiziert und die Migration mittels Boydenkammer analysiert. Die Cadherin-7 Zellklone (cCad7 #1, #3) zeigten eine verminderte Migration im Vergleich zu den Kontrollen (Mock 1 und 2).

Als nächstes stellte sich die Frage, ob dieses interessante Ergebnis mit der Bindung von MIA an Cadherin-7 zusammenhängt. Wir stellten die Hypothese auf, dass die ursprüngliche Funktion von MIA durch Cadherin-7 Überexpression beeinflusst wird und es somit auch zu einer Beeinflussung der Migrationsfähigkeit der Zellklone kommt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Cadherin-7 überexprimierenden Zellklone mit rekombinanten MIA behandelt und die Migration in Boydenkammer-Assays untersucht. Es wurde bereits nachgewiesen, dass MIA in diesen Assay die Migration hemmt, indem es das Zellattachment unterdrückt [Review 67]. Wie erwartet, zeigen die Kontrollzellen eine verminderte Migration durch MIA, wohingegen die Cadherin-7 überexprimierenden Zellklone keine signifikanten Veränderungen in ihrem Migrationsverhalten offenbaren (Abb. 3-9). Cadherin-7 scheint also die durch MIA verursachten Migrationseffekte aufzuheben.

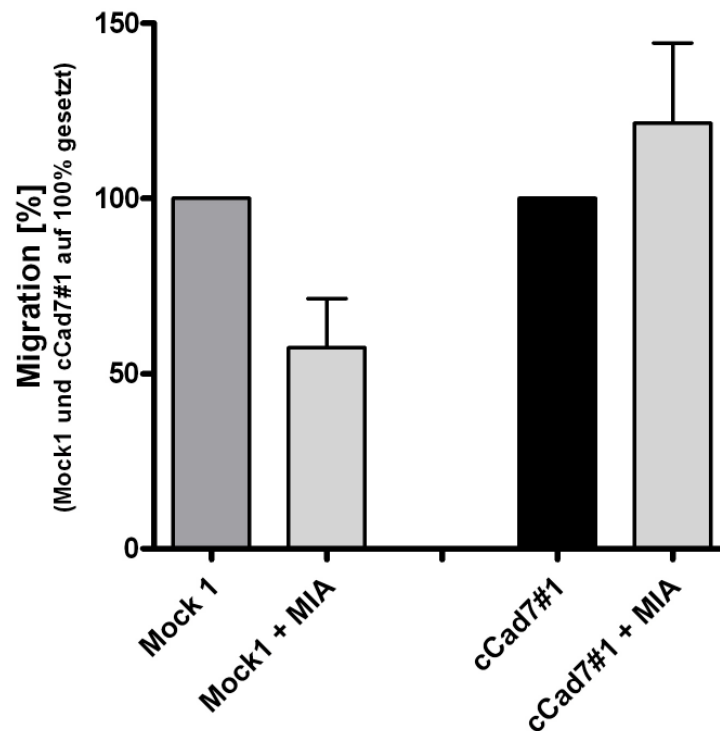


Abbildung 3-9: **Einfluss von MIA auf Migration der Cadherin-7 Klone**

Bei Boydenkammer-Experimenten von Mel Im Kontrollzellen zeigte sich eine verminderte Migration durch eine Behandlung mit rekombinanten MIA (200 ng/ml). In den Cadherin-7 überexprimierenden Zellen wurde dagegen dieser Migrationseffekt durch eine Behandlung mit MIA nicht beobachtet.

3.1.4 Cadherin-7 reguliert die Expression von MIA

Da eine Hemmung der Funktion von MIA durch Cadherin-7 nur teilweise die starke Verminderung der Migration (s. Abb. 3.8) erklären kann, fragten wir uns, ob dieser Effekt infolge einer Regulation der MIA-Expression zustande kommt. Wir bestimmten den MIA-Gehalt der Cadherin-7 überexprimierenden Mel Im Zellklone (Cad7 #1, #3, #4) und der Zellklone mit einer verminderten Cadherin-7 Expression (asCad7 #2, #7, #8) auf RNA-Ebene mittels RT-PCR. Die Überexpression von Cadherin-7 führte zu einer verminderten mRNA-Expression von MIA, während durch das antisense Cadherin-7 Konstrukt die MIA-Expression verstärkt wurde (Abb. 3-10). Weitere Untersuchungen von Mel Juso Zellklonen bestätigten den Einfluss von Cadherin-7 auf die Expression von MIA. Diese Ergebnisse legen dar, dass Cadherin-7 die Expression von MIA durch bislang unbekannte Signalwege beeinflussen kann.

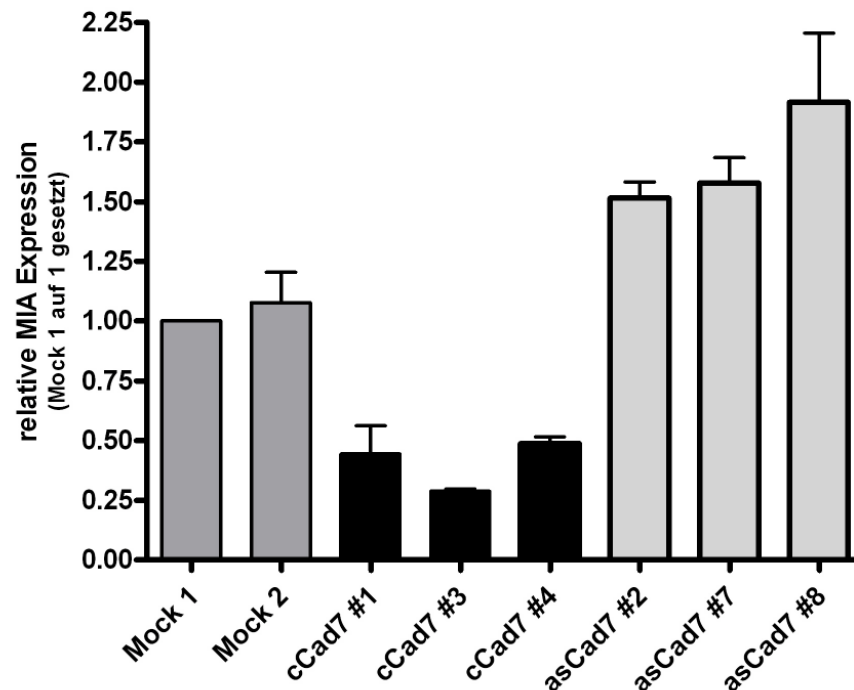


Abbildung 3-10: **Cadherin-7 reguliert die MIA-Expression**

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von MIA in den Mel Im stabil transfizierten Zellklonen analysiert. Dabei zeigte sich eine verminderte MIA-Expression der Cadherin-7 überexprimierenden Zellklone im Vergleich zu den Kontrollzellen. Zusätzlich wurden Mel Im Zellen stabil mit einem antisense Cadherin-7 Vektor transfiziert und die MIA-Expression bestimmt. Hier wurde eine erhöhte Expression von MIA beobachtet.

Diese Daten weisen bereits auf die wichtige transkriptionelle Regulation von MIA im Melanom hin, die in Zukunft auch weiterhin detailliert untersucht werden sollte. Im nächsten Kapitel gehe ich auf einen Transkriptionsfaktor näher ein, der hinsichtlich der Regulation von MIA bereits identifiziert wurde.

3.2 Rolle von CtBP1 im malignen Melanom

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit der Funktion des transkriptionellen MIA-Repressors CtBP1. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von CtBP1 im malignen Melanom verloren bzw. stark reduziert ist. Somit wird die Hemmung von MIA aufgehoben und die MIA-Expression induziert [45]. Um die zellulären Mechanismen, die von CtBP1 im Melanom reguliert werden, zu analysieren, wurden mittels stabiler Transfektion von Melanomzellen CtBP1-exprimierende Zellklone hergestellt und anschließend funktionelle Assays durchgeführt. Die drei ausgewählten Zellklone der

Melanomzelllinie Mel Im zeigten auf mRNA- (nicht abgebildet) und Proteinebene eine starke CtBP1-Expression des vollständigen (full length) Moleküls (Abb. 3-11 / A). Um die Regulation der MIA-Expression zu bestätigen, wurden quantitative RT-PCRs durchgeführt. Es zeigte sich dabei eine signifikante Verminderung der MIA-Expression in den CtBP1-exprimierenden Zellklonen im Vergleich zu den Kontrollen Mock 1 und Mock 2 (Abb. 3-11 / B).

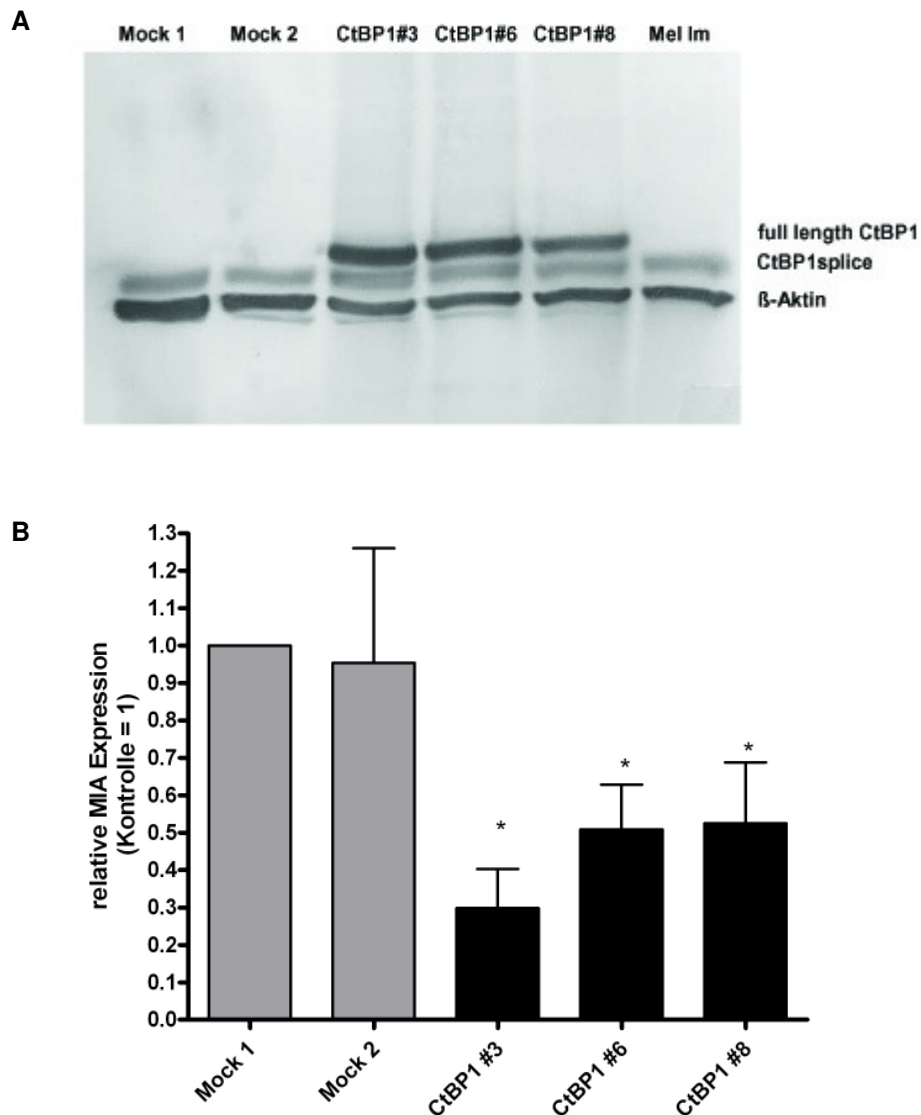


Abbildung 3-11: CtBP1-exprimierende Melanomzellklone

Ein CtBP1-Expressionsplasmid wurde in Mel Im-Zellen mittels stabiler Transfektion eingebracht. (A) Die Expression des Proteins CtBP1 wurde über Western Blot analysiert. Es wurde die Expression von full length CtBP1 in den CtBP1-transfizierten Zellklone CtBP1#3, CtBP1#6 und CtBP1#8 beobachtet, jedoch nicht in den Mock-Kontrollen und in der Mel Im-Zelllinie. (B) Der Einfluss von CtBP1 auf die mRNA-Expression von MIA wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die drei CtBP1-exprimierenden Zellklone zeigten eine stark verminderte MIA-Expression im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellklonen. (*: $p < 0.05$ im Vergleich zu Mock 1)

In weiteren Versuchen wurden die Proliferation und das zelladhäsionsunabhängige Wachstum der CtBP1-exprimierenden Zellklone untersucht. Dabei wurden allerdings keine Veränderungen im Zellwachstum im Vergleich zu den Kontrollklonen festgestellt. Dagegen wurde in Boydenkammer-Experimenten eine verminderte Migration und Invasion der CtBP1-exprimierenden Klone beobachtet (Abb. 3-12). Das führte zu der Vermutung, dass CtBP1 und von CtBP1-regulierten Gene die zelluläre Migration und Invasion kontrollieren.

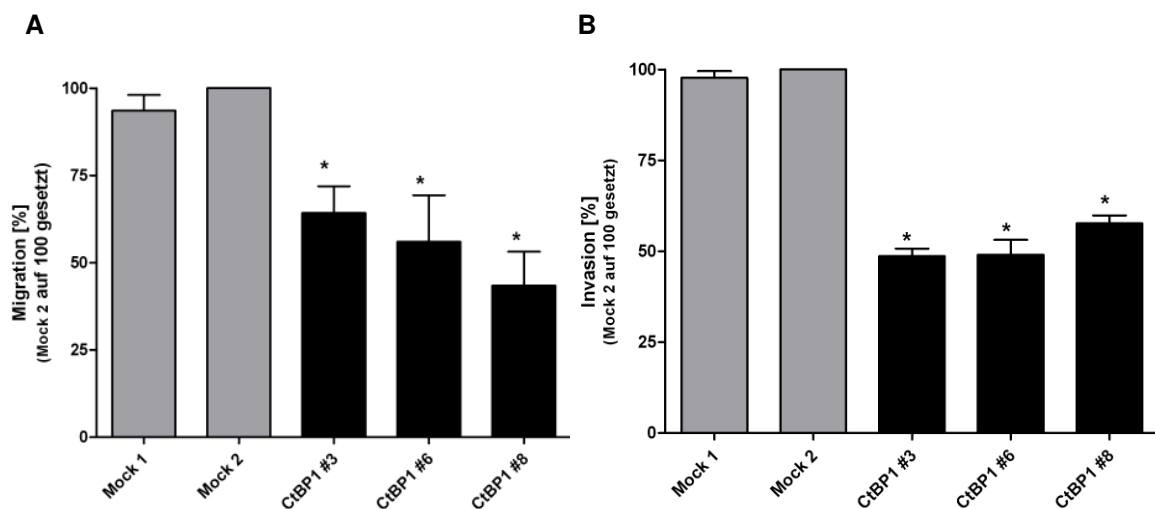


Abbildung 3-12: Migration und Invasion in den CtBP1-exprimierenden Zellklonen
Das Migrations- und Invasionspotential der Mel Im-Zellklone, die CtBP1 überexprimieren, wurde mittels Boydenkammer-Versuchen untersucht. Es zeigte sich hierbei eine starke Verminderung bei der Migration (A) und Invasion (B) in durch Expression von CtBP1 im Vergleich zu den Kontrollen. (*: $p < 0.05$ im Vergleich zu Mock 2)

Interessanterweise zeigte sich im Western Blot mit einem CtBP1-Antikörper (Abb. 3-11 / A) ein zweites Protein, dass ca. 5 kDa kleiner ist als das full length CtBP1 (RefSeq entry NM_001328). Um zu bestimmen, ob es sich bei dieser Bande um ein alternatives Spleißprodukt handelt, haben wir mehrere Primersets designed. Mit Hilfe dieser PCR-Primer und anschließender Sequenzierung des PCR-Produkts konnten wir klar zeigen, dass Melanomzellen ein alternatives CtBP1-Produkt (CtBP1splice), in dem das Exon 4 fehlt, exprimieren (Abb. 3-13 / A). Auch der direkte Vergleich von Melanozyten (NHEM) und der Melanomzelllinie Mel Im bezüglich der Analyse des Exons 4 von CtBP1 zeigte, dass Melanozyten hauptsächlich das vollständige CtBP1 und Mel Im Zellen die Spleißvariante exprimieren. Das Expressionsmuster von CtBP1splice im Melanom wird in Abb.

3-13 / B dargestellt. Dabei zeigte sich, dass in acht von elf Melanomzellen die Spleißvariante exprimiert wird. Die verminderte Expression von full length CtBP1 im Melanom wurde von uns bereits nachgewiesen [45].

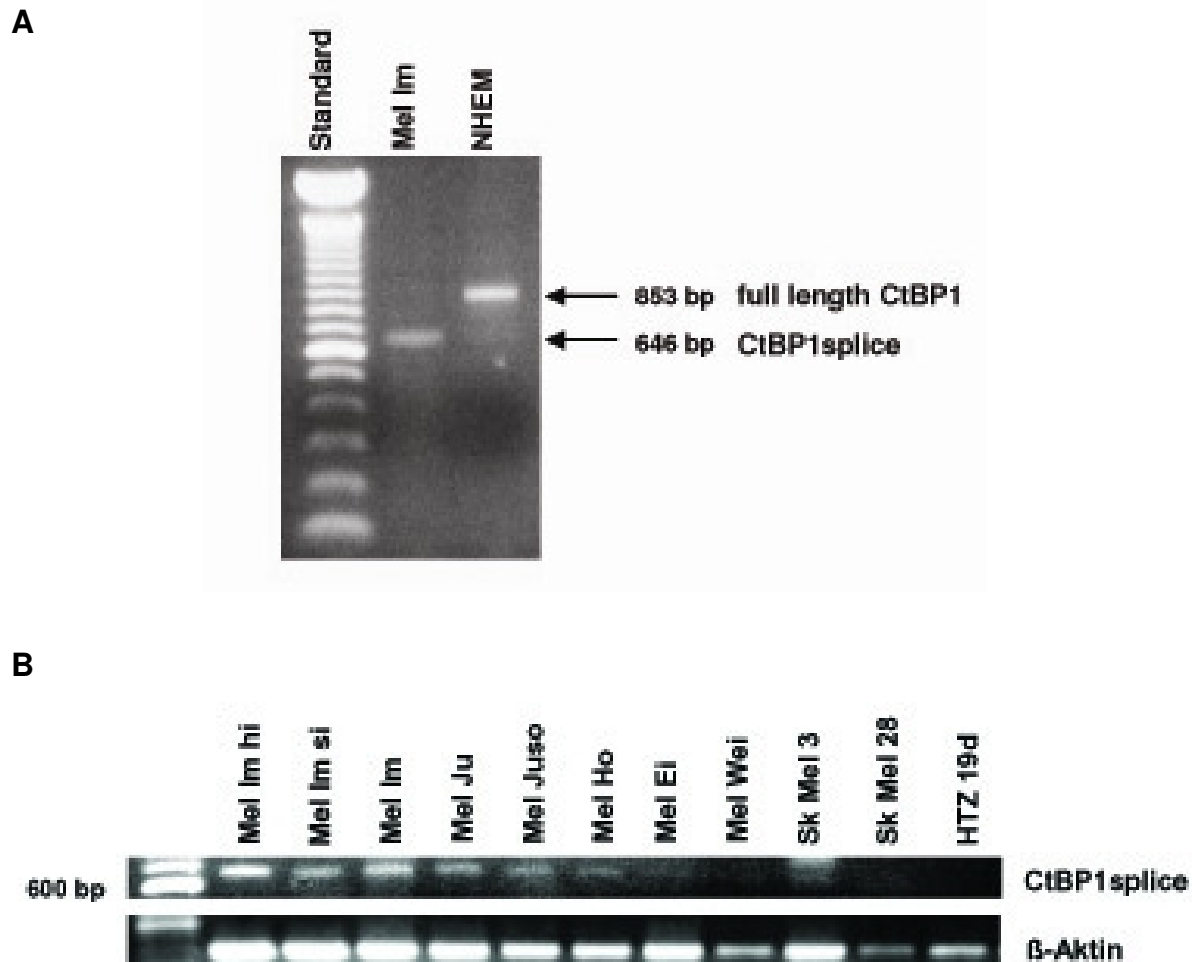


Abbildung 3-13: **Expression von CtBP1splice im Melanom**

Es wurden PCR-Primer verwendet, die das Exon 4 von CtBP1 flankieren. Dabei zeigte sich klar, dass in der Melanomzelllinie Mel Im im Vergleich zu Melanozyten (NHEM) das Exon 4 fehlt (A). Die Expression von CtBP1splice wurde in acht von elf Melanomzelllinien mittels PCR festgestellt (B).

Bei CtBP1splice handelt es sich um ein Protein, bei dem die Aminosäuren 114 bis 182 (in frame) fehlen. Dabei handelt es sich um die N-terminale Region der Dehydrogenase homologen Domäne (siehe auch Einleitung), die auch die PAK1-Phosphorylierungsstelle enthält (Abb. 3-14).

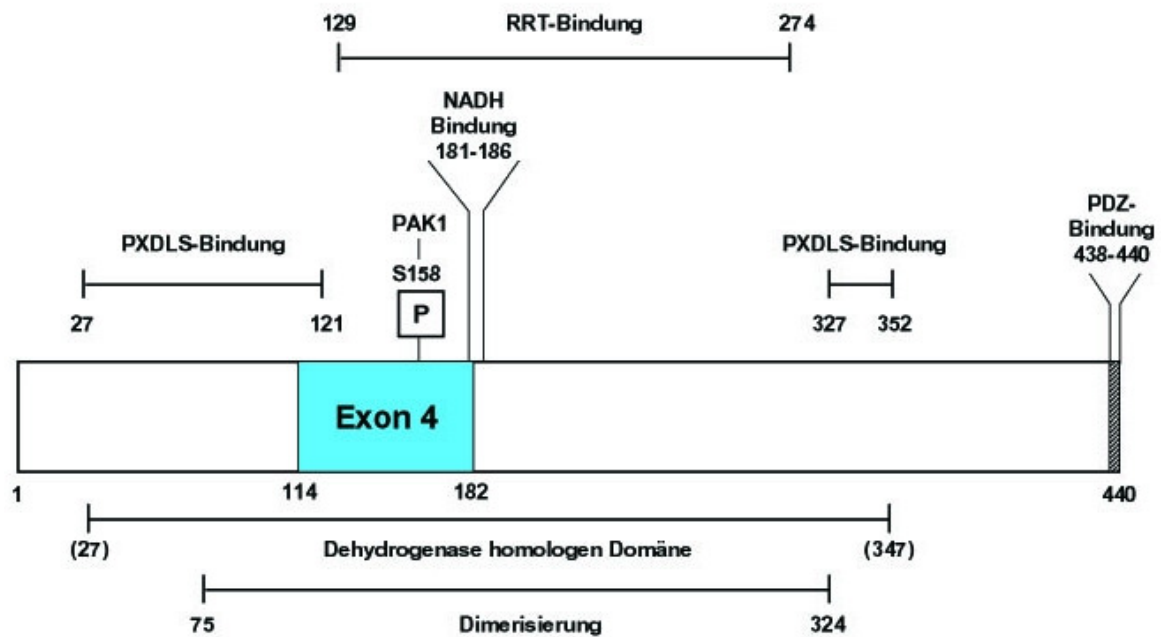


Abbildung 3-14: **Schema der Struktur von CtBP1splice**

Bei der Spleißvariante von CtBP1 fehlen die Aminosäuren 114 bis 182, die das Exon 4 (blau dargestellt) des full length CtBP1 bilden. Hier fehlen große Bereiche der Dehydrogenase homologen Domäne und der RRT-Bindestelle. Das Exon 4 enthält außerdem die PAK1-Phosphorylierungsstelle sowie zwei Aminosäuren der NADH-Bindestelle, wodurch die Bindung von NADH an der verkürzten Spleißvariante beeinflusst sein könnte (modifiziert nach Chinnadurai, 2007) [Review 46].

Da die Eigenschaften der alternativen Spleißvariante noch komplett unbekannt sind, wollten wir aufklären, ob CtBP1splice genauso wie full length CtBP1 bekannte Proteininteraktionen eingehen kann. Wir haben deshalb untersucht, ob eine Bindung von CtBP1 an TCF4 (reguliert die MIA-Expression) und Snail, ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Melanomentwicklung, noch intakt ist. Eine Interaktion von full length CtBP1 und Snail sowie eine Beteiligung an der Tumorprogression wurde bereits gezeigt [183, 184]. Über Ko-Immunpräzipitation haben wir eine Bindung von TCF4 und Snail an full length CtBP1 in den CtBP1-exprimierenden Zellklonen feststellen können. Dagegen bindet die Spleißvariante von CtBP1 nicht mehr an TCF4 und Snail (Abb. 3-15). Das deutet darauf hin, dass CtBP1splice die transkriptionelle Repressoraktivität zusammen mit TCF4 und Snail nicht ausführen kann. Somit kann im Melanom auch die Expression und die Funktion von MIA nicht gehemmt werden. Andere Funktionen von CtBP1 bleiben womöglich in der Spleißvariante unbeeinflusst.

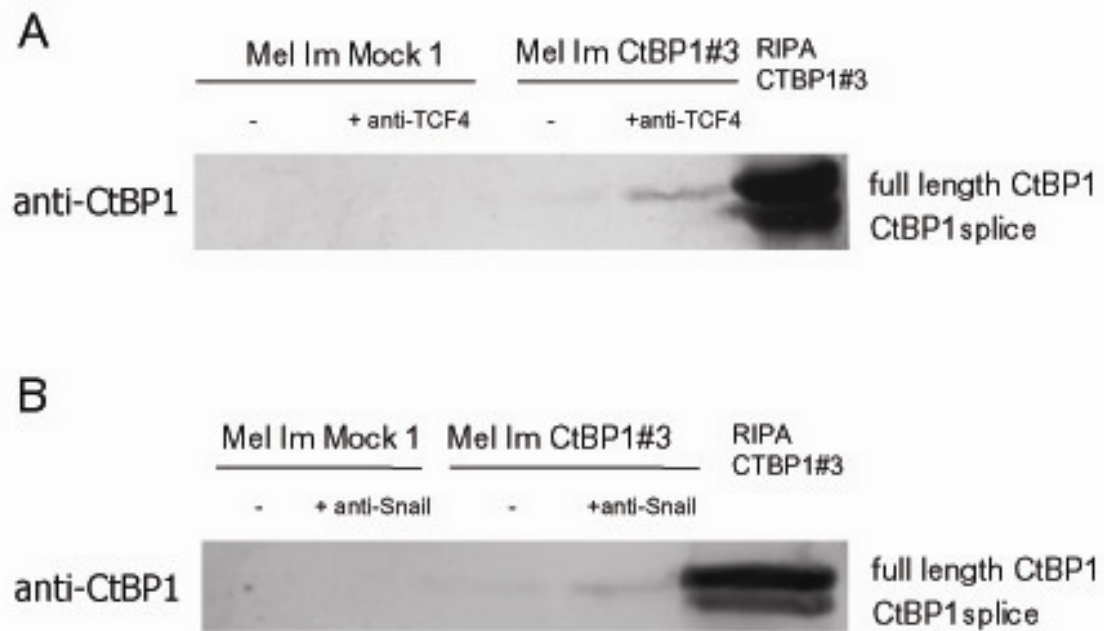


Abbildung 3-15: **Fehlende Interaktion von CtBP1splice mit TCF4 und Snail**

Es wurden Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit Proteinlysaten der Zellklone Mock 1 (Kontrolle) und CtBP1#3 durchgeführt. Diese Lysate wurden mit einem TCF4- (A) bzw. Snail-Antikörper (B) inkubiert. Die Western Blot-Analyse mit einem CtBP1-Antikörper zeigte jeweils eine Bindung von full length CtBP1 an TCF4 (A) bzw. Snail (B), wohingegen keine Interaktion mit der Spleißvariante von CtBP1 festgestellt werden konnte.

3.2.1 CtBP1-Zielgene im Melanom

Da die Expression von full length CtBP1 im Melanom verloren gegangen ist, haben wir spekuliert, ob CtBP1 eine Funktion als Tumorsuppressor hat. Dabei könnten Gene negativ reguliert werden, die bei der Melanomentwicklung und – progression eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass CtBP1 ein Repressor des LEF/TCF-Signalweges ist. Deshalb haben wir uns dabei zuerst auf bekannte LEF/TCF-Zielgene konzentriert. Die Expression von MMP7 beispielsweise wurde im Melanom durch die Reexpression CtBP1 deutlich gehemmt, wohingegen c-myc und Laminin $\gamma 2$ durch CtBP1 nicht beeinflusst wird. Um neue mögliche LEF/TCF-Zielgene im Melanom zu finden, haben wir mit der Genomatix Software nach Genen gesucht, die eine LEF/TCF-Bindestelle (TT/GCTTTG) in ihrem Promotor besitzen. Es wurden Gene ausgesucht, die mindestens eine LEF/TCF-Bindestelle besitzen. Diese Gene könnten aktiviert sein, wenn die Hemmung durch CtBP1 im Melanom verloren gegangen und der mit LEF/TCF

zusammenhängende Wnt-Signalweg aktiviert ist. Diese Gene wurden analysiert, indem über GEO Profiles (NCBI) die Daten des Melanom-Microarray GDS1989 [185] benutzt wurden. Bei diesem Array wurde die Expression von Genen während der Melanomentwicklung analysiert. Wir konzentrierten uns dabei auf Gene, von denen gezeigt wurde, dass sie während der Entwicklung oder Progression der Krankheit hochreguliert sind. 14 von 250 untersuchten Gene haben die Kriterien (LEF/TCF-Bindestelle und im Melanom hochreguliert) erfüllt (Tabelle 1). Die Regulation der Gene durch CtBP1 wurde durch quantitative RT-PCR in den CtBP1-überexprimierenden Zellklonen überprüft und mit den Mock-Kontrollen verglichen (Tabelle 1). Eine Hemmung der Genexpression durch CtBP1 wurde mit Ausnahme von zwei Genen (THBS1, MLL5) in allen Genen beobachtet. Dabei zeigten Col1A2, FAT, SLC26A2 und VCAN die stärkste Regulation. Eine Herunterregulation dieser Gene durch CtBP1 wurde auch mittels transienter Transfektion von CtBP1 in die Melanomzelllinie Mel Im bestätigt (Col1A2: 0.31, FAT: 0.52, SLC26A2: 0.72, VCAN: 0.75 verglichen mit der Mock-Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde).

Um weitere Informationen über die Relevanz der gefundenen Gene, die im Melanom durch CtBP1 reguliert werden, zu bekommen, haben wir Microarray-Daten von Hoek *et al.* benutzt. Dabei wurden in Expressionsanalysen von Melanomzelllinien zwei Transkriptionssignaturen identifiziert, die jeweils mit einer proliferativen und invasiven Phänotyp-Kultur übereinstimmen [186]. Diese Daten zeigen, dass die Expression der elf CtBP1-regulierten Gene (73%) mit einem invasiven Phänotyp assoziiert ist und nicht mit dem proliferativen Cluster zusammenhängt. Diese Ergebnisse unterstützen unsere funktionellen Daten, dass CtBP1-regulierte Gene die zelluläre Migration kontrollieren (Tabelle 1).

In diesem Abschnitt konnten wir zeigen, dass im Melanom eine Spleißvariante von CtBP1 vorliegt, die die Repressorfunktion von full length CtBP1 nicht mehr ausüben kann. Diese Variante kann die Aktivität von MIA nicht unterdrücken und somit das Metastasierungspotential von Melanomzellen nicht vermindern. Es wurden zudem Expressionsmuster von Zielgenen von CtBP1 analysiert, die mit der Invasivität des Melanoms verbunden sind.

3 Ergebnisse

Gensymbol	Genname	TCF/LEF site	GDS1989 [x-fach induziert, Nävis auf 1 gesetzt] [185]			CtBP1-Klone im Vergleich zu Mock	Hoek et al. [186]		x-fache Induktion	P<
			MIS	RGP	LN met		prol.	inv.		
AP1S1	adaptor-related protein complex 1. sigma 1 subunit	+	2.02	2.99	5.23	0.77	0.99	1.10	1.11	ns
ATP1B1	ATPase. Na+/K+ transporting. beta 1 polypeptide	+	3.11	3.89	2.63	0.77	1.01	2.05	2.03	ns
CLDN11	claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein)	+	1.06	5.15	2.30	0.67	1.97	128.6	65.38	0.003
COL1A2	collagen type I alpha 2	+	1.01	2.90	2.00	0.38	6.25	34.62	5.54	0.005
ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	+	2.58	13.19	14.38	0.68	0.69	2.66	3.88	0.003
ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 2 (autotaxin)	+	0.86	1.36	2.31	0.66	1.40	4.43	3.17	0.047
FAT	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	+	1.29	2.65	3.29	0.52	0.85	1.66	1.95	0.004
FSCN1	fascin homolog 1. actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	+	2.07	4.36	3.21	0.79	0.75	2.77	3.67	0.0002
FUS	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	+	1.70	2.59	3.29	0.82	1.31	0.94	0.71	0.039
MLL5	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog. Drosophila)	+	1.77	3.43	3.91	1.32	1.22	1.03	0.85	ns
SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter). member 2	+	1.86	4.8	3.11	0.41	1.20	1.87	1.56	ns
THBS1	thrombospondin 1	+	1.28	5.91	3.61	1.2	0.27	13.59	49.87	9.46E-06
TMED4	transmembrane emp24 protein transport domain containing 4	+	0.81	1.75	1.99	0.74	0.91	1.73	1.89	0.002
VCAN	versican	+	0.88	3.02	4.53	0.42	0.73	15.43	21.24	0.0001

Tabelle 1: Übersicht über Gene, die durch CtBP1 reguliert werden und an der Melanomentwicklung beteiligt sind

Es wurden Gene mit einer LEF/TCF-Bindestelle in ihrem Promotor analysiert. Mittels computergestützten Analysen wurde nach LEF/TCF-Bindestellen gesucht und dabei die Software Genomatix benützt. Zur Analyse der Gene wurde die Microarray-Daten GDS1989 [185] verwendet. In den Spalten 4 bis 6 wird gezeigt, dass diese Gene während der Melanomentwicklung und Progression hochreguliert sind. Die Regulation dieser Gene durch CtBP1 wurde in CtBP1 überexprimierenden Zellklonen mittels quantitativer RT-PCR gezeigt (Spalte 7). Für die Analyse des proliferativen und invasiven Phänotyps wurden die Daten von Hoek *et al.* [186] verwendet (Spalte 8, 9). Der P-Wert < 0,05 ist fettgedruckt.

Abkürzungen: MIS, Melanoma-in-situ; RGP, radiale Wachstumsphase; LN met, Lymphknotenmetastase; prol., proliferativer Phänotyp; inv., invasiver Phänotyp.

Im Rahmen dieses Projektes wurden wir über Studien anderer Arbeitsgruppen darauf aufmerksam, dass die Aktivität von CtBP1 über hypoxische Bedingungen reguliert werden kann. Dieser interessante Aspekt führte zu Untersuchungen des Transkriptionsfaktors HIF im Melanom, die im nächsten Abschnitt erläutert werden.

3.3 Rolle von HIF-1 α im Melanom

Durch Literaturrecherchen im Zusammenhang mit dem CtBP-Projekt sind wir auch auf die interessante Verbindung zwischen transkriptioneller Regulation von Genen und Hypoxie gestoßen. Es war bereits bekannt, dass CtBP unter metabolischem Stress oder Hypoxie aktiviert wird. Hypoxische Effekte werden zum größten Teil durch Moleküle der HIF Familie vermittelt. In diesem Zusammenhang wurde bereits eine bedeutende Rolle von HIF-1 α im malignen Melanom beschrieben. Zudem handelt es sich bei der Haut auch um ein leicht hypoxisches Gewebe [Review 187].

Interessanterweise wurde in neueren Untersuchungen gezeigt, dass HIF-1 α auch durch nicht-hypoxische Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Insulin hochreguliert werden kann [145, 188-190]. Da nun außerdem im Speziellen für HIF-1 α aus der HIF-Familie interessante Vordaten zum Thema malignes Melanom vorlagen [161, 187], starteten wir unsere Experimente zur Analyse der Aktivität von HIF in Melanomzelllinien zunächst unter normoxischen Kulturbedingungen. Dazu wurde die Aktivität eines HRE- (*hypoxia response element*) Konstruktes, welches einem *Luciferase*-Gen vorgeschaltet ist [172], im Melanom gemessen. Dieses 6 x HRE-Konstrukt enthält HIF-Bindestellen, an die

das HIF-Dimer im Promotor der potentiellen Zielgene binden kann. Es wurde eine stark erhöhte 6 x HRE Aktivität in Melanomzelllinien festgestellt, wohingegen in Zelllinien aus anderen Geweben nur eine schwache Aktivität beobachtet wurde (Abb. 3-16 / A). Um neben der HIF Aktivität auch speziell die HIF-1 α Expression in diesen Zelllinien zu überprüfen, wurden quantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine hohe mRNA-Expression von HIF-1 α in den Melanomzelllinien im Vergleich zu Leber- und Kolonzelllinien (Abb. 3-16 / B).

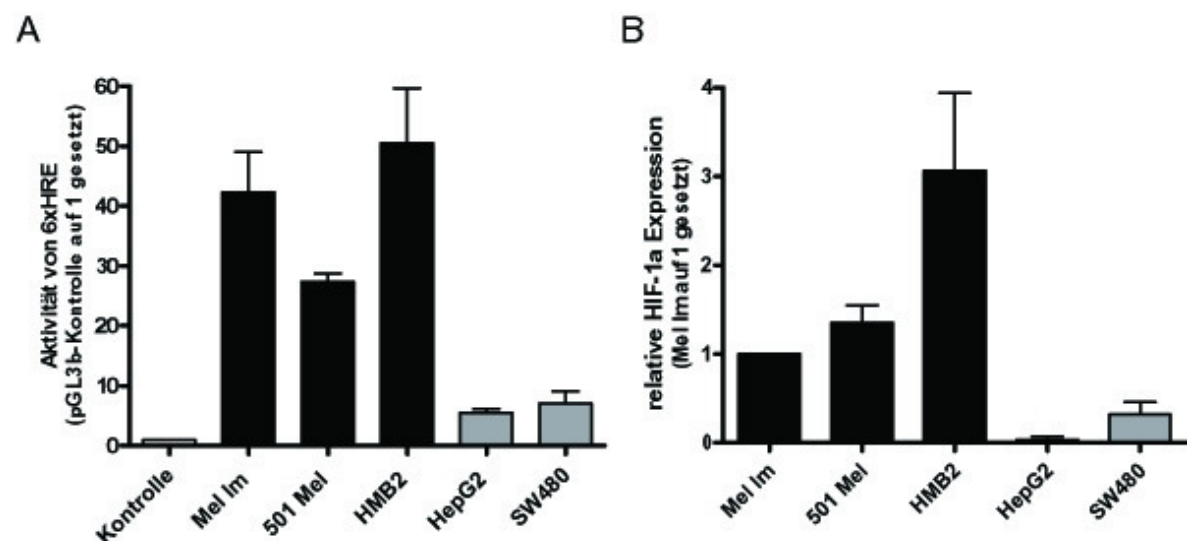


Abbildung 3-16: **HIF-Analyse in Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben**

(A) Die Luciferaseaktivitätsmessung zeigte in den Melanomzelllinien Mel Im, 501 Mel und HMB2 eine stark erhöhte Aktivität eines 6 x HRE-Konstrukts im Vergleich zur Leberzelllinie HepG2 und der Kolonzelllinie SW480. Als Kontrolle diente der pGL3basic Vektor.

(B) In quantitativen RT-PCR Analysen wurde eine verstärkte mRNA-Expression von HIF-1 α in den Melanomzelllinien festgestellt. Dagegen zeigten die Zelllinien HepG2 und SW480 eine geringere Expression von HIF-1 α .

Zur Bestätigung, dass es sich bei der erhöhten HIF Aktivität in den Melanomzelllinien um den Einfluss von HIF-1 α handelt, wurden Mel Im Zellen mit siRNAs gegen HIF-1 α und -2 α transfiziert und die Aktivität des 6 x HRE-Konstrukts gemessen. Dabei zeigte sich nur durch Ausschalten von HIF-1 α eine verminderte 6 x HRE Aktivität (Abb. 3-17 / A). Als weitere Bestätigung wurden Mel Im Zellen mit den HIF-1 α Inhibitoren Echinomycin und YC-1 behandelt [191, 192]. Hier wurde durch die Hemmung von HIF-1 α jeweils eine deutliche Abnahme der Aktivität des 6 x HRE-Konstrukts festgestellt (Abb. 3-17 / B).

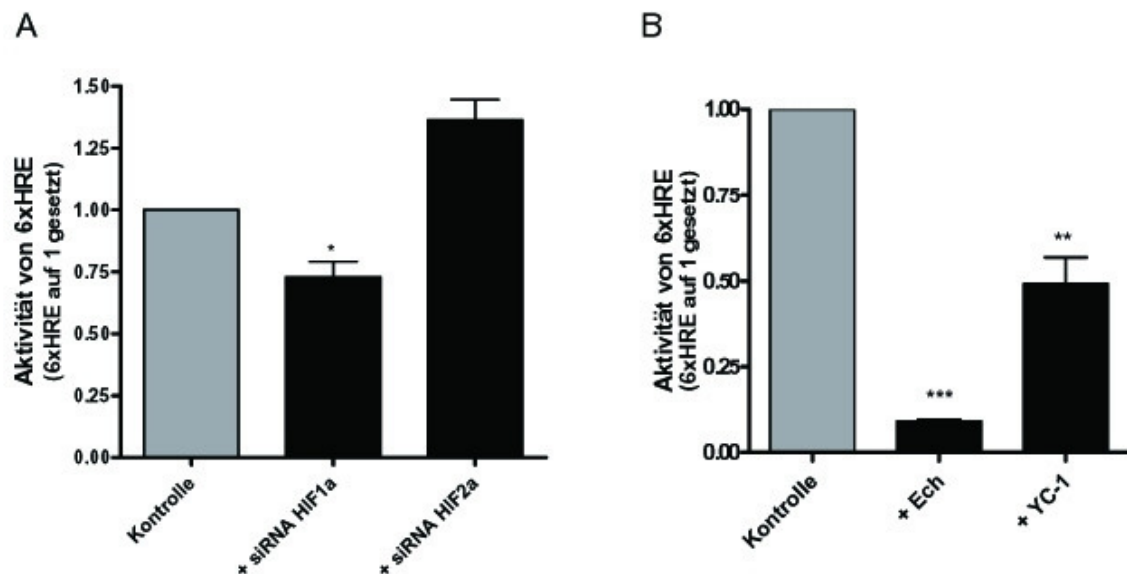


Abbildung 3-17: Aktivität von HIF-1 α im Melanom

(A) Mel Im Zellen wurden mit siRNAs gegen HIF-1 α und 2 α transfiziert. 24 h nach der Behandlung wurden die Zellen mit dem 6 x HRE-Konstrukt transfiziert. Dabei zeigte sich durch Ausschalten von HIF-1 α eine signifikante Verminderung der Aktivität des 6 x HRE-Konstrukts.

(B) Nach Transfektion mit dem 6 x HRE-Konstrukt wurden Mel Im Zellen mit den HIF-1 α Inhibitoren Echinomycin (5 nM Ech) und YC-1 (30 μ M) behandelt. Hier konnte jeweils die HIF Aktivität deutlich verringert werden.

Im Melanom wurde im Western Blot auch eine Proteinexpression von HIF-1 α unter Normoxie nachgewiesen. Auch auf Proteinebene wurde eine verminderte HIF-1 α Expression durch Ausschalten von HIF-1 α mittels siRNAs gezeigt (Abb. 3-18). Diese Versuche lassen den Schluss zu, dass die erhöhte Aktivität des 6 x HRE-Konstrukts im Melanom auf HIF-1 α zurückzuführen ist. Ebenso zeigte sich, dass das Protein HIF-1 α im Melanom auch unter normoxischen Bedingungen vorliegt und nicht abgebaut wird.

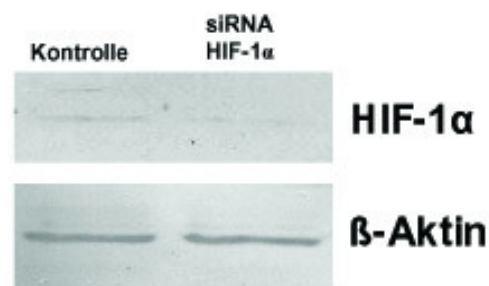


Abbildung 3-18: Proteinexpression von HIF-1 α im Melanom

Die Expression des Proteins HIF-1 α wurde im Melanom mittels Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich durch Ausschalten von HIF-1 α mittels einer siRNA-Transfektion von Mel Im Zellen eine verminderte HIF-1 α Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. β -Aktin diente hier als Ladekontrolle.

Bei der Melanomentwicklung ist eine Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beschrieben worden [165]. Ebenso ist bereits bekannt, dass die ROS die Aktivität von HIF, auch unter nicht-hypoxischen Bedingungen, regulieren können [168]. Deshalb wurde eine Beteiligung der ROS an der erhöhten HIF-Aktivität im Melanom untersucht. Dazu wurden Mel Im Zellen mit den Radikalfängern POBN (α -(4-Pyridyl N-oxide)-N-tert-butylnitron) und Histidin behandelt. Hier zeigte sich eine deutlich verminderte Aktivität des 6 x HRE-Konstrukts durch die Behandlung mit den Radikalfängern. Auch auf Proteinebene wurde eine verringerte Expression von HIF-1 α durch die Radikalfänger festgestellt (Abb. 3-19).

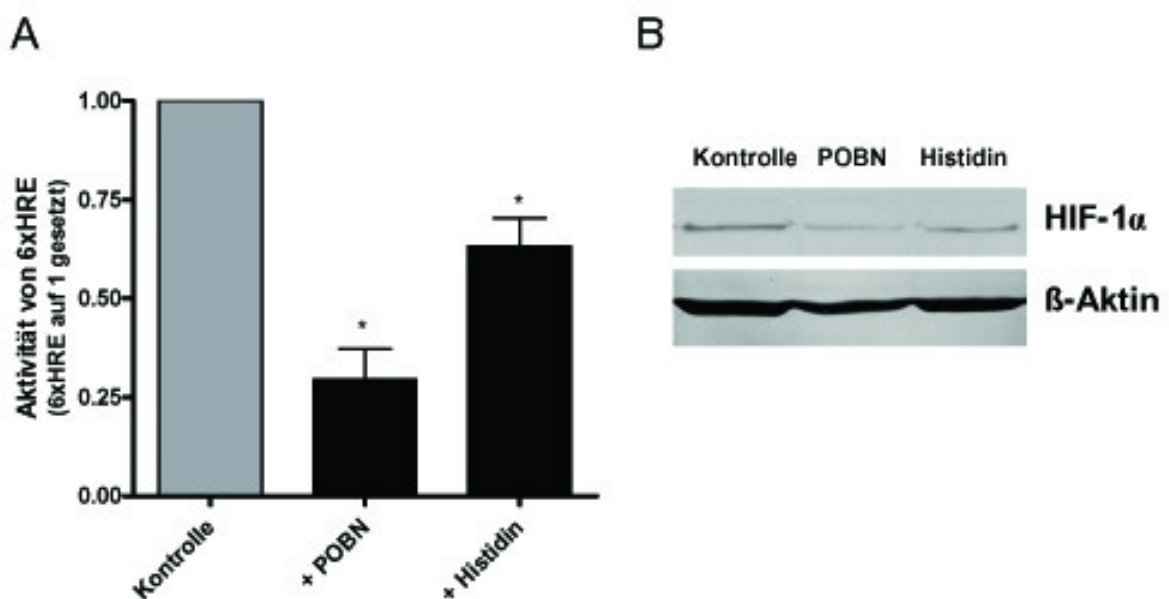


Abbildung 3-19: Verminderte Aktivität von HIF-1 α durch Radikalfänger

(A) Nach Transfektion mit dem 6 x HRE-Konstrukt wurden Mel Im Zellen mit den Radikalfängern POBN (30 μ M) und Histidin (30 μ M) behandelt und nach 16 h die Luciferaseaktivität gemessen. Dabei zeigte sich eine signifikante Verringerung der HIF Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

(B) Die Behandlung mit den Radikalfängern zeigte auch auf Proteinebene eine verminderte Expression von HIF-1 α in der Melanomzelllinie Mel Im.

Eine Erhöhung des ROS-Levels in der Zelle durch Behandlung mit den ROS-Induktoren As₂O₃ und Pyrogallol induzierte die HIF-Aktivität. Die Induktion der ROS erhöhte auch den HIF-1 α Proteinlevel der Melanomzellen (Abb. 3-20). Diese Daten belegen eine Beteiligung der ROS bei der erhöhten Aktivität und Stabilität von HIF-1 α im Melanom.

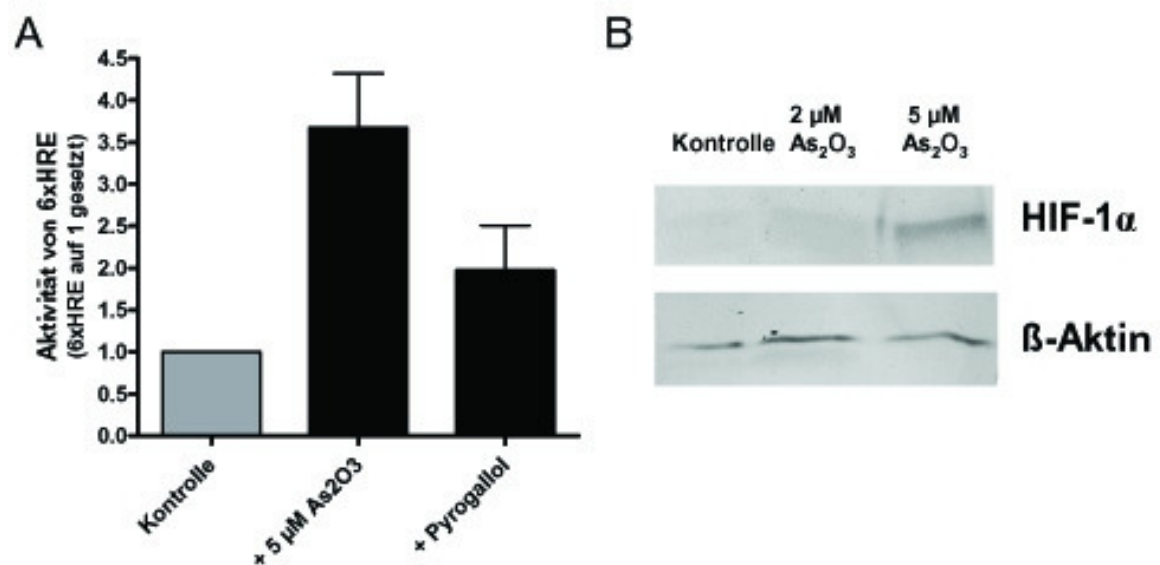


Abbildung 3-20: **Aktivierung von HIF-1 α durch ROS**

(A) Eine Induktion von Radikalen mit den Radikalinduktoren As_2O_3 (5 μM) und Pyrogallol (30 μM) zeigte nach 16 h eine erhöhte Aktivität des 6 x HRE-Konstrukts in Mel Im Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.

(B) Die Expression von HIF-1 α konnte durch den Radikalinduktor As_2O_3 in Mel Im dosisabhängig induziert werden. In der Western Blot Analyse diente β -Aktin als Ladekontrolle.

In der Literatur wurde beschrieben, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die Aktivität von HIF-1 α über den Transkriptionsfaktor NF κ B regulieren können [193]. Darum wurde der Einfluss von NF κ B auf die Aktivität von HIF-1 α analysiert. Da im malignen Melanom eine konstitutive NF κ B Aktivität vorliegt, wurde diese Aktivität zuerst durch die Überexpression des NF κ B Repressors I κ B reduziert. Die Überexpression von stabilen I κ B in Melanomzellen verminderte dabei die HIF Aktivität (Abb. 3-21 / A). Durch eine Überexpression der bekannten NF κ B Untereinheiten in Melanomzellen konnten wir mittels Kotransfektion von Expressionsplasmiden eine erhöhte Aktivität von HIF feststellen (Abb. 3-21 / B). Diese Daten deuten auf eine Beteiligung des NF κ B-Signalwegs an der Regulation von HIF-1 α im Melanom hin.

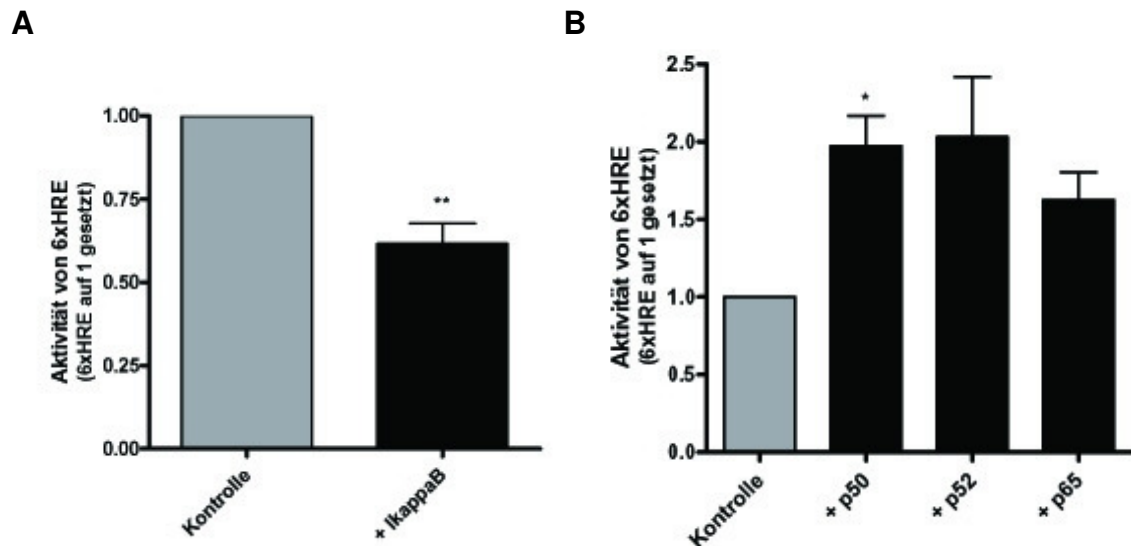


Abbildung 3-21: **Induktion der Aktivität von HIF-1 α durch NF κ B**

(A) Mel Im Zellen wurden nach Transfektion des 6 x HRE-Konstrukts mit einem I κ B-überexprimierenden Virus behandelt. Dadurch zeigte sich in Reporteranalysen eine signifikant verminderte Aktivität von HIF im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen.

(B) Eine Kotransfektion der NF κ B-Untereinheiten p50, p52 und p65 führte zu einer erhöhten HIF Aktivität im Melanom.

Da es schon mehrere Hinweise gibt, dass ROS die Aktivität von NF κ B beeinflussen können [194], wurde eine mögliche Beteiligung der ROS an der Regulation von NF κ B untersucht. Hierzu wurde in Mel Im Zellen die Aktivität von NF κ B nach Behandlung mit Radikalfängern analysiert. Durch die Radikalfänger konnte Aktivität von NF κ B verringert werden, so dass von einer Beteiligung der ROS an der hohen Aktivität von NF κ B im Melanom auszugehen ist (Abb. 3-22).

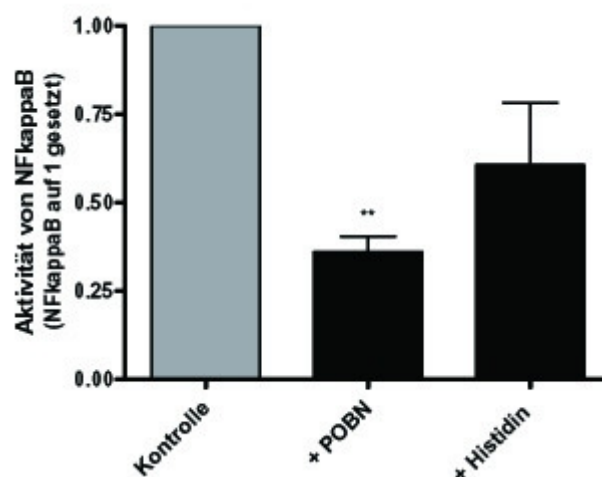


Abbildung 3-22: **ROS aktivieren die Aktivität von NF κ B**

Mel Im Zellen wurden mit einem NF κ B-Luciferase Konstrukt, welches Bindestellen für NF κ B enthält, transfiziert und mit den Radikalfängern POBN (30 μ M) bzw. Histidin (30 μ M) behandelt. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine deutliche Verminderung der Aktivität von NF κ B.

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass im Melanom über die reaktiven Sauerstoffspezies der Transkriptionsfaktor NF κ B induziert wird. Dies führt zu einer transkriptionellen Regulation von HIF-1 α , wobei im Melanom die Aktivität und Stabilität von HIF-1 α auch unter nicht-hypoxischen Bedingungen induziert wird.

4 Diskussion

4.1 Rolle von Cadherin-7 bei der Melanomprogression

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung des sezernierten Proteins MIA bei der Entwicklung und Metastasierung des malignen Melanoms näher untersucht werden. Ein Schwerpunkt unserer Forschung lag in der Aufklärung der Regulierung der Transkription und der Aktivität von MIA. Neuere Studien unserer Arbeitsgruppe lassen darauf schließen, dass MIA durch Interaktion mit anderen Proteinen bei der Progression und Ausbreitung des Melanoms eine Rolle spielt (62,67). Wir suchten deshalb mit der SELDI-Methode nach weiteren MIA-Bindungspartnern. In unserer Studie haben wir mit Cadherin-7 einen neuen Interaktionspartner von MIA im malignen Melanom entdeckt. Es ist bekannt, dass Cadherine bei der Embryogenese, bei dynamischen Zell-Adhäsionsprozessen, bei der Ablösung und Migration von Zellen beteiligt sind [Review 195]. Wir nehmen deshalb an, dass Cadherin-7 an der Tumorprogression des malignen Melanoms, die unter anderen von MIA verursacht wird, involviert ist.

Vor kurzem wurde von Moore *et al.* gezeigt, dass Cadherin-7 in mehreren Melanomzelllinien hochreguliert ist [182]. Wir konnten die Expression von Cadherin-7 in anderen Melanomzelllinien durch quantitative RT-PCR Analysen zeigen. Interessanterweise sind die mRNA-Expression und die Präsentation auf der Zelloberfläche von Primärtumoren höher als in Zelllinien von Metastasen. Es ist bereits bekannt, dass die Expression von Cadherin-7 bei der Delamination von Neuralleistenzellen aus dem Neuralrohr wichtig ist und dabei streng zeitabhängig reguliert wird [178]. Das führte zu der Hypothese, dass Cadherin-7 an der frühen Delamination von Melanomzellen von den sie umgebenden Keratinozyten beteiligt ist. Gerade die gesteigerte Expression von Cadherin-7 in den primären Melanomzellen fördert die Migration der Zellen und könnte zu einem gesteigerten Herauslösen aus dem normalen Gewebeverband führen. Viele Studien belegen bereits, dass andere Cadherine wie E- und N-Cadherin die frühe Entwicklung des malignen Melanoms beeinflussen, wobei E-Cadherin als Tumorsuppressor beschrieben wurde. Der Verlust von E-Cadherin ist dabei mit einem hohen Potential zur Invasion und Metastasierung verbunden [196, 197]. Der Switch von E-Cadherin zur Expression von N-Cadherin in Melanomzellen hat einen großen Einfluss bei der Entwicklung und Progression des Tumors. Aufgrund der

Expression von N-Cadherin wechseln die Melanozyten ihre Bindungspartner und treten nun mit Fibroblasten statt mit Keratinozyten in Kontakt. N-Cadherin ist so an der malignen Transformation der Melanozyten beteiligt und fördert das Überleben und die Migration von Melanomzellen [22]. Zusätzlich wurde im Brustkrebs ein Umschalten eines Typ I Cadherins (E-Cadherin) zu einem Typ II Cadherin (Cadherin-11) während der Tumorprogression gezeigt [196, 198]. Im Melanom könnte ein Umschalten zu einem Typ II Cadherin (Cadherin-7), die schwächere interzelluläre Adhäsionen formen, ebenfalls zu der erhöhten Migration der Tumorzellen beitragen. Dieses Umschalten könnte zu schwächeren interzellulären Adhäsionen zwischen den Zellen führen und so die Migration der Melanomzellen fördern.

Unsere Studien zeigen, dass Cadherin-7 eine Bedeutung bei der Migration der Primärtumorzellen hat. Dagegen zeigen die metastatischen Zellen nur eine schwache Expression von Cadherin-7. Die Reduktion der Cadherin-7 Expression scheint hier mit der Tumorprogression zu korrelieren. Damit übereinstimmend verminderte die durch Transfektion verursachte Überexpression von Cadherin-7 die Migration der Melanommetastasen. Das konnte in ähnlicher Weise auch für E-Cadherin gezeigt werden. Es konnte belegt werden, dass viele Melanommetastasen eine Reexpression von E-Cadherin zeigen, sobald der Tumor nicht mehr migrieren „muss“ [199, 200].

Wir haben in unseren Untersuchungen festgestellt, dass die Interaktion von MIA und Cadherin-7 einen Einfluss auf die beobachteten Effekte hat. Melanomzellen benötigen MIA ganz besonders für die Metastasierung, indem MIA an Fibronectin und Integrine bindet und dadurch die Kontakte der Zellen zur umgebenden Matrix unterbindet. Dadurch kommt es zum Ablösen der Melanomzellen aus dem ehemaligen Gewebeverband und dann erst in Folge zur Zellmigration und Zellinvasion [Review 67]. Wir konnten zeigen, dass eine Überexpression von Cadherin-7 in Metastasenzellen die funktionelle Aktivität von MIA aufhebt, wodurch die Zellen ein vermindertes Migrationspotential besitzen. Die Überexpression von Cadherin-7 kompensiert dabei die Migrationseffekte von MIA, die im Boydenkammer-Experiment in den Kontrollzellen beobachtet wurden. Dieser Effekt könnte über die Interaktion zwischen Cadherin-7 und MIA erklärt werden, wodurch es zu einer Hemmung der Aktivität von MIA kommt. In Melanommetastasen würde die Expression von Cadherin-7 eher stören, weil es

einen so drastischen Effekt auf die ursprüngliche MIA Funktion ausübt. Indem Cadherin-7 das sezernierte MIA bindet und „wegfängt“, würde der Gehalt an freien MIA sinken und die Migrationseffekte von MIA unterdrückt.

Eine Beeinflussung der Migration durch Interaktion von Proteinen mit Zelladhäsionsmolekülen wurde im Melanom schon nachgewiesen. Galectin-9 unterdrückt die Zelladhäsion von Tumorzellen, indem es an Zelladhäsionsmolekülen wie Integrine bindet und die Interaktion zu Molekülen der extrazellulären Matrix hemmt. Im Gegensatz zu MIA unterbindet hier Galectin-9 die Metastasierung von Melanomzellen [201]. Ein weiteres Molekül, das die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix beeinflusst, ist das sekretierte Glykoprotein SPARC. Es induziert über Integrin $\alpha 5\beta 5$ die Migration von invasiven Tumorzellen. Im Melanom wurde eine Rolle von SPARC bei der frühen Melanozytentransformation festgestellt, wobei SPARC die Tumorgenese über eine Induktion von Snail und die dadurch verursachte Hemmung von E-Cadherin fördert [202, 203].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Cadherin-7 in frühen Melanomen eine große Rolle bei der Migration besitzt und zu diesem Zeitpunkt die Expression von MIA eine untergeordnete Stellung für den Tumor besitzt. Die Expression von Cadherin-7 geht im Melanom vermutlich beim Übergang von der radialen zur vertikalen Wachstumsphase größtenteils verloren, die Expression von MIA wird nicht mehr unterdrückt und die Funktion von MIA gewinnt an Priorität. In der vertikalen Wachstumsphase ist MIA durch Interaktionen mit Molekülen der extrazellulären Matrix an der Regulation des zellulären Attachments und an der Invasion von Melanomzellen beteiligt. In dieser Phase und später in Melanommetastasen wird MIA nicht mehr von Cadherin-7 in seiner Funktion beeinflusst und regt so die Progression des Tumors an.

Zusätzlich zur Modulation des MIA-Gehalts über Protein-Protein Interaktionen konnten wir zeigen, dass Cadherin-7 die mRNA-Expression von MIA reguliert. Es wurde bereits in mehreren Studien eine Beteiligung der Cadherine an der Regulation der Genexpression festgestellt. So führt im malignen Melanom der Verlust von E-Cadherin zur Induktion von NF κ B [204]. Eine Regulation der MIA-Expression über NF κ B wurde bereits vorher gezeigt [32]. Der Einfluss von Cadherin-7 auf Signalwege wurde bislang noch nicht im Detail analysiert. Wir können deshalb nur spekulieren, dass Cadherin-7 die Genexpression von MIA

über eine Modulation bekannter Signalwege, welche für eine starke MIA-Expression in Metastasen notwendig sind, reguliert. Abbildung 4-1 gibt einen Überblick auf die Expression und die Effekte von Cadherin-7 und MIA während der Melanomentwicklung.

	Melanoblast	Melanozyt	Primärtumor	Metastase
Expression:	CDH 7 ↑ MIA ?	CDH 7 ↓ MIA ↓	CDH 7 ↑ MIA →	CDH 7 ↓ MIA ↑
Effekt:	Delamination der Neuralleistenzellen	Ruhende Zellen im Hautverband	Delamination aus dem Zellverband	Interaktion der Zellen mit ECM Molekülen = Metastasierung

Abbildung 4-1: **Expressionsschema bei der Melanomentwicklung**

Während der Embryogenese wird Cadherin-7 von den Neuralleistenzellen exprimiert, wodurch sich die Neuralleistenzellen vom Neuralrohr ablösen und migrieren können. In Melanozyten wird weder Cadherin-7 (CDH7) noch MIA exprimiert. In Primärtumoren liegt eine hohe Expression von Cadherin-7 vor, die für das Auswandern der Melanomzellen aus dem umgebenden Zellverband verantwortlich ist. Zusätzlich hemmt Cadherin-7 die Expression und Aktivität von MIA und unterdrückt so die Migrationseffekte von MIA. In den Metastasen liegt eine starke Reduktion der Expression von Cadherin-7 vor, wodurch MIA nicht mehr gehemmt und die Metastasierung der Melanomzellen gefördert wird.

Insgesamt haben wir eine biphasische Expression von Cadherin-7 im malignen Melanom gezeigt, wie es vor kurzem ähnlich in uvealen Melanomzelllinien von den Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 nachgewiesen worden ist [205]. Es liegt jeweils eine hohe Expression im Primärtumor und eine verminderte Expression in Metastasen vor. Diese Daten deuten darauf hin, dass Cadherin-7 die frühe Entwicklung des Tumors fördert, indem möglicherweise die Delamination von den umgebenden Zelltypen unterstützt wird. Später in der Tumorprogression scheint die Expression von Cadherin-7 entbehrlich, oder die Migration sogar negativ zu beeinflussen. Dieser negative Einfluss kann teilweise über eine negative Regulation der MIA-Expression und über eine Hemmung der Aktivität von MIA erklärt werden, wobei die Ablösung und die Migration der Zellen verhindert wird.

4.2 Bedeutung von CtBP1 im malignen Melanom

Im ersten Abschnitt wurde die Transkription und Aktivität von MIA in Verbindung mit Cadherin-7 analysiert, wobei eine Regulation von MIA durch Cadherin-7 festgestellt worden ist. Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde die transkriptionelle Regulation von MIA über den Transkriptionsfaktor CtBP1 näher untersucht. Es ist bereits bekannt, dass CtBP1 als Ko-Repressor an der Genregulation mit mehreren anderen Transkriptionsfaktoren beteiligt ist. In unserer Arbeitsgruppe haben wir den Verlust der CtBP1-Expression im Melanom beschrieben, wodurch die Expression von MIA nicht mehr gehemmt werden kann [45]. Dieser Teil meiner Arbeit hatte zum Ziel, die Bedeutung von CtBP1 in der Melanomentwicklung näher zu beleuchten. Daneben wurde nach weiteren Zielgenen von CtBP1 gesucht, die wie MIA an der Metastasierung des Melanoms beteiligt sein könnten.

Interessanterweise enthüllten Western Blot und RT-PCR-Studien in Melanomzellen die Existenz einer Spleißvariante von CtBP1 (CtBP1splice). Bei dieser CtBP1-Variante fehlt das Exon 4 (in frame), was zu einem Verlust der Aminosäuren 114 bis 182 führt. Aufgrund des Exonverlustes kann die Spleißvariante nicht an TCF4 oder Snail binden. Das deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil der Ko-Repressoraktivität von CtBP1 bei dieser Spleißvariante verloren gegangen ist. Die Expression von MIA kann dadurch im Melanom nicht mehr gehemmt werden, was zu einem Fortschreiten der Tumorprogression führt. In Melanozyten wird die Expression von MIA und damit die Entwicklung des Melanoms durch full length CtBP1 unterdrückt.

Allerdings scheint die Expression dieser Spleißvariante in Tumoren generell wichtig zu sein. Sie wurde auch in Brust-, Kolon- und im hepatozellulären Karzinomzellen entdeckt, in denen full length CtBP1 nicht mehr exprimiert wird (nicht gezeigt). Andere Spleißvarianten von CtBP1 sind bereits bekannt [206], diese Variante wurde jedoch noch nicht beschrieben. Das Fehlen der PAK-Phosphorylierungsstelle könnte zu Änderungen in der Kontrolle der Kern/Zytosol-Translokation und der Ko-Repressoraktivität führen [207]. Zudem könnte die Bindung von NAD an CtBP1 und die Dimerisierung von CtBP1 beeinträchtigt sein. Da die NAD(H)-abhängige Dimerisierung für die transkriptionelle Hemmung erforderlich ist, könnte die Repressorfunktion von CtBP1 auch dadurch beeinflusst sein. Zusätzlich könnten Veränderungen in den zwei

Proteinbindungsstellen Auswirkungen auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren an CtBP1splice haben [208, 209]. Nach dem Verlust von full length CtBP1 könnte die Expression von CtBP1splice für die generellen Funktionen von CtBP1 in Tumorzellen wichtig sein. Es wurde gezeigt, dass CtBP1 in der Morphogenese des Golgi-Apparats bei der Assoziation zu den Zentrosomen [210] und am vesikulären Transport beteiligt ist [Review 37]. Es ist auch interessant, dass einige Publikationen auf eine tumorfördernde Rolle von CtBP hindeuten [Review 46]. Jin *et al.* haben beschrieben, dass der ABC-Transporter MDR1 (*multidrug resistant 1*) durch CtBP1 aktiviert ist und dadurch die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika erhöht [211]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CtBP1 die Expression von Wnt-Zielgenen unabhängig von TCF aktivieren kann [212]. Es gibt noch keine Belege, ob diese tumorfördernden Effekte durch die neue Spleißvariante von CtBP1 verursacht werden. Es sind weitere Studien nötig, um die Rolle und Funktion von CtBP1splice in der Karzinogenese zu verstehen. In Abbildung 4-2 wird die Rolle von CtBP1 im Melanom dargestellt.

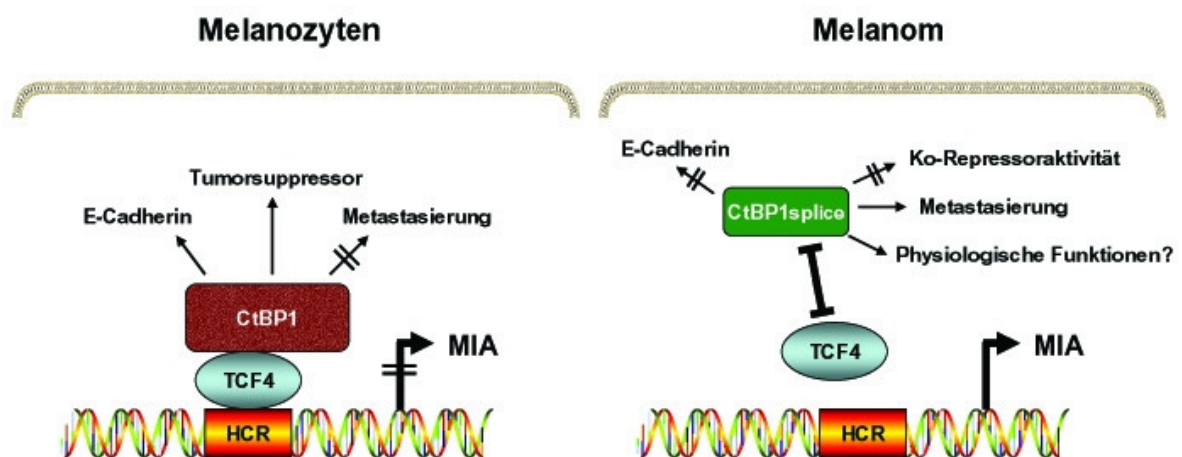


Abbildung 4-2: **Rolle von CtBP1 im Melanom**

Durch full length CtBP1 können viele Zielgene gehemmt werden, die an der Metastasierung beteiligt sind (siehe Tabelle 1). Full length CtBP1 agiert dabei in Melanozyten als Tumorsuppressor. In Melanozyten interagiert TCF4 mit full length CtBP1, bindet an das HCR-Element (*highly conserved region*) im MIA-Promotor und hemmt so die Expression von MIA. In Melanomzellen kommt nur noch die Spleißvariante (CtBP1splice) vor. Diese Variante kann nicht mehr mit TCF4 interagieren, wodurch die Hemmung von MIA aufgehoben wird. Die genaue Funktion von CtBP1splice ist noch nicht geklärt. Ein Teil der Ko-Repressorfunktion ist in der Spleißvariante verloren gegangen und könnte so an der Metastasierung von Melanomzellen beteiligt sein. CtBP1splice könnte auch für generelle Funktionen von Tumorzellen wichtig sein. Die fehlende Interaktion mit Snail ist vermutlich am Verlust von E-Cadherin im Melanom beteiligt.

Es wird diskutiert, ob full length CtBP1 an der Wachstumskontrolle von normalen Zellen beteiligt ist. Es wurde bereits gezeigt, dass die Bindung von CtBP an das adenovirale E1A mit der Hemmung von E1A mit einer H-ras Kotransformation, der Tumorgenese und Metastasierung korreliert (31). Darüber hinaus wurde eine Repressorfunktion von CtBP auf die E2F/Rb-verursachte Transkription festgestellt [213]. In unserer Studie wurden nach Reexpression von CtBP1 keine Veränderungen der Proliferation festgestellt, wohingegen Migrations- und Invasionsexperimente auf eine Rolle von CtBP1 in der Zellmigration hindeuten. Die Reexpression von CtBP1 reduzierte dabei das Migrationsverhalten der Melanomzellen. Dieses Ergebnis wurde durch eine detaillierte Analyse der CtBP1-regulierten Gene unterstützt. Beim Vergleich der Gene, die eine LEF/TCF-Bindungsstelle besitzen, mit den cDNA-Arraydaten (GDS1989) aus dem Melanom [185], zeigten 14 Gene eine Korrelation mit der Melanomentwicklung und -progression. Die Regulation dieser Gene durch CtBP1 wurde mittels quantitativer RT-PCR bestätigt. Interessanterweise werden die meisten der hier diskutierten CtBP1-regulierten Gene mit dem invasiven Zustand von Zellen, wie er von Hoek *et al.* beschrieben wurde [186], assoziiert. Diese Erkenntnisse unterstützen, dass der Verlust von CtBP1 im Melanom das Migrationsverhalten der Zellen verstärkt.

Nur von zwei der CtBP1-regulierten Gene wurde bislang eine Rolle beim Melanom beschrieben. Autotaxin (ENPP2), eine sezernierte Lysophospholipase D, wurde ursprünglich aus Melanomzellen isoliert und stimuliert die Beweglichkeit von Tumorzellen [214, 215]. Lysophospholipasen katalysieren die Produktion des Phospholipids Lysophosphatidsäure (LPA), welche an vielen biologischen Prozessen wie dem Zellwachstum und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist [216]. LPA stimuliert die Migration von vielen Zelltypen, was auch auf eine mögliche pathophysiologische Rolle der zellulären Migration hindeutet. Durch die erhöhte Beweglichkeit kann die Metastasierung von Tumorzellen gefördert werden [217, 218]. Autotaxin wird verstärkt in verschiedenen Karzinomen exprimiert und fördert die Metastasierung sowie die Angiogenese [28, 214]. Es wurde dabei auch eine Erhöhung des invasiven Potentials von Melanomzellen durch eine induzierte Expression der Serinprotease uPA (*urokinase-type plasminogen*), die Komponenten der extrazellulären Matrix abbaut und entscheidend an der Tumorprogression beteiligt ist, festgestellt [219-221].

Versican gehört zu der Familie der Proteoglykane und wurde auch in verschiedenen Tumorarten beschrieben. Aufgrund der Fähigkeit mit Hyaluronsäure, Tenascin und anderen Proteinen interagieren zu können, könnte Versican an den malignen Eigenschaften von Tumorzellen involviert sein [222, 223]. Es wurde beschrieben, dass die Versican-reiche extrazelluläre Matrix einen antiadhäsiven Effekt auf die Zellen ausüben kann und auf diese Weise die Migration und Invasion von Tumorzellen erleichtern [222, 224]. Im Melanom wird Versican exprimiert und fördert über eine Beeinflussung des Zellwachstums sowie der Zelladhäsion die Ablösung der Tumorzellen aus dem Zellverbund und die Metastasierung [225].

Von den verbleibenden Genen wurde bislang noch keine Rolle bei der Entwicklung des Melanoms beschrieben. Es wurde jedoch eine Deregulation und Beteiligung in anderen Krebsarten beobachtet. Die Na₂K-ATPase ATP1B1, die für den Aufbau des elektrochemischen Gradienten an der Plasmamembran verantwortlich ist, ist an der Progression und Metastasierung im Prostatakrebs beteiligt [226]. Aktive Transporterproteine wie die Na⁺/K⁺-ATPasen sind für die Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts zuständig und stabilisieren das Zellvolumen [Review 227]. Na⁺/K⁺-ATPasen sind auch an der Signaltransduktion und der Zelladhäsion beteiligt, sodass eine Fehlregulation der Expression und Aktivität dieser Ionenporter die Entwicklung verschiedener Tumore zur Folge haben kann. Deshalb werden diese Proteine auch als mögliche Targets bei der Krebstherapie angesehen. Tumorzellen mit einer erhöhten Aktivität von Ionenportern entwickeln eine zunehmende Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Cis-Platin [228, Review 229].

Das fibrilläre Kollagen Typ I $\alpha 2$, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, sowie FUS (*Fusion*) sind im Magenkrebs dereguliert und haben einen Einfluss auf die Invasion und Metastasierung [230]. Kollagene sind als Hauptproteine der extrazellulären Matrix an der Zelladhäsion und somit auch bei der Tumorentwicklung von Bedeutung. Die Tumorentwicklung und die Invasion ins umliegende Gewebe wird oft von einer erhöhten Fehlordnung der extrazellulären Matrix und der zellulären Komponenten, besonders an der invasiven Front, begleitet [Review 231]. In der Haut wurde von Bindegewebszellen eine erhöhte Synthese der Typ I Kollagene dokumentiert [232]. Die Expression von Typ I Kollagen ist an der Angiogenese und am invasiven Wachstum des Melanoms

beteiligt [233]. Im Melanom liegt zudem eine erhöhte Expression von Typ IV Kollagen, das hauptsächlich in der Basalmembran vorkommt, vor und fördert die Zelladhäsion, Migration sowie die Invasion [Review 234, 235]. Das RNA-bindende Protein FUS kann als klassischer Transkriptionsfaktor agieren sowie das Spleißen von Zielgenen beeinflussen und so die Genexpression regulieren. Über eine Modulation von YB-1 (*Y-box binding protein 1*), ein durch Stress induzierter Transkriptionsfaktor, kann FUS unter anderen die Expression von MMP-1 aktivieren. FUS fungiert als transkriptioneller Regulator bei DNA-Schädigungen und hemmt die Aktivität von CBP (*CREB-binding protein*) und der Histonacetyltransferase p300, wodurch die Expression von Zielgenen wie Cyclin D1 unterdrückt werden kann [236, 237].

Claudin-11, eine Proteinkomponente der Tight Junctions, wird hauptsächlich im Zentralen Nervensystem exprimiert und spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion sowie dem Integrin-Signaling [238]. Veränderungen der Expression von Claudin-11, die zu einer Erhöhung des Migrationspotentials führen, wurden während der Progression von epithelialen Tumoren gezeigt [239]. Ein Einfluss von Proteinen der Claudin-Familie auf die Entwicklung des Melanoms wurde bereits mehrfach nachgewiesen. Als Transmembranproteine besitzen sie vor allem eine Funktion bei der Zelladhäsion. In Tumorzellen ist eine Fehlregulation der Tight Junction-Struktur mit der Entwicklung des Tumors verbunden. Über Claudin-1 wird die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) sekretiert und aktiviert. Dadurch kann die extrazelluläre Matrix für die Tumormetastasierung „geöffnet“ und so das Tumorstadium angeregt werden. Im Melanom wird Claudin-1 überexprimiert und ist an der Invasion der Melanomzellen beteiligt [240]. Im Lungen-Adenokarzinom agiert Claudin-1 als Suppressor der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen [241]. Claudin-2 kann das Migrationspotential und die Invasivität von Tumorzellen fördern. Durch NSAIDs (*Non-steroidal anti-inflammatory drugs*) kann die Expression von Claudin-2 und die Metastasierung gehemmt werden [242]. Eine Förderung der Migration, Invasion und des Tumorstadiums durch Claudin-3, das in etwa 90% der Ovarialtumoren überexprimiert wird, wurde in einer aktuellen Studie gezeigt. Durch Ausschalten von Claudin-3 mittels siRNA konnte das Tumorstadium *in vivo* reduziert werden [243]. Dagegen ist für Claudin-6 eine Rolle als Tumorsuppressor beschrieben worden. Eine Hemmung

der Expression von Claudin-6 fördert die Invasion von Brustkrebszellen, indem unter anderen die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen erhöht wird [244].

ENC1 (*Ectoderm-Neural Cortex 1*) gehört zur Familie der Kelchproteine und kann mit dem Aktinzytoskelett interagieren. ENC1 wird während der frühen Gastrulation in der neuroektodermalen Region des Epiblasten sowie später im Nervensystem exprimiert und ist vermutlich während der Entwicklung des Nervensystems für die Organisation des Aktinzytoskeletts verantwortlich [245]. In Hirntumoren liegt häufig eine erhöhte Expression des aktinbindenden Proteins ENC1 vor [246]. Die erhöhte Aktivität von ENC1 trägt zur kolorektalen Karzinogenese bei, wobei die Regulation der Expression von ENC1 durch LEF/TCF bereits beschrieben wurde [247]. FAT, ein Protein der Cadherin-Familie, und FSCN1, welches am Aufbau der Aktinfilamentbündel beteiligt ist, spielen bei generellen Migrationsprozessen der Zelle eine Rolle [248, 249]. Die Rolle von Cadherinen bei Migrationsprozessen und deren Beteiligung bei der Progression des malignen Melanoms wurde in dieser Arbeit schon diskutiert (siehe Kapitel 4.1). Die aktinbindenden Fascine werden in Hauttumoren exprimiert und sind bei der Zelladhäsion, der Zellbeweglichkeit und der Invasion von Bedeutung [250]. Im Melanom interagiert Fascin mit dem Neurotrophin-Rezeptor $p75^{\text{NTR}}$ und sorgt so für eine Verknüpfung von $p75^{\text{NTR}}$ mit dem Aktinzytoskelett. Diese durch Fascin verursachte Interaktion ist an der Migration von Melanomzellen beteiligt [251]. In urogenitalen Krebs wird eine verstärkte Expression von FSCN1 mit einer erhöhten Invasivität in Verbindung gebracht [249]. Die Aktivität von Fascine kann durch Expression des Tumorsuppressors BRMS1 (*breast cancer metastasis suppressor 1*) inhibiert werden, wodurch die Zellmotilität und die Metastasierung unterdrückt wird [252]. Von dem CtBP1-Zielgen TMED4 ist die genaue Funktion noch nicht geklärt ist, wobei im invasiven Adenokarzinom eine Induktion der Expression von TMED4 festgestellt worden ist [253].

Insgesamt deuten die zur Verfügung stehenden Daten auf eine funktionelle Rolle der CtBP1-regulierten Gene bei Migrations- und Invasionsprozessen hin. Es scheint daher, dass der Verlust der Ko-Repressorfunktion von CtBP1 ein kritisches Ereignis bei der Pathogenese des malignen Melanoms sein könnte. Dabei stellt die fehlende Repressorfunktion von CtBP1splice auf die Expression

von MIA ein wichtiges Ereignis dar. In Zukunft wäre es hoch interessant, diese Untersuchungen auszuweiten und *in vivo* Analysen durchzuführen.

4.3 Regulation der Aktivität von HIF-1 α im malignen Melanom

Im Rahmen des CtBP-Projektes wurde festgestellt, dass die Aktivität von CtBP1 und anderen Transkriptionsfaktoren auch über hypoxische Bedingungen reguliert werden kann. Bei den Effekten, die durch Hypoxie ausgelöst werden, spielt der Transkriptionsfaktor HIF-1 α eine entscheidende Rolle. HIF-1 α wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor beschrieben, der als Antwort auf Sauerstoffmangel für eine verbesserte Sauerstoffversorgung sorgt und unter Normoxie dagegen wieder abgebaut wird. Inzwischen wurde allerdings in vielen Studien beschrieben, dass das Protein HIF-1 α durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone auch bei normalen Sauerstoffbedingungen aktiviert werden kann [145, 188-190, 254]. Unsere Untersuchungen zeigten unter nicht-hypoxischen Bedingungen in Melanomzelllinien eine hohe Aktivität und Stabilität des Proteins HIF-1 α . Diese Aktivität konnte in Zelllinien aus anderen Geweben oder Tumoren nicht festgestellt werden, was auf ein melanomspezifisches Phänomen hinweist. Da eine Beteiligung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an der Regulation von HIF inzwischen mehrfach nachgewiesen wurde und ROS sowie HIF-1 α eine Bedeutung bei der Melanomentwicklung zu haben scheinen, haben wir einen möglichen Zusammenhang untersucht [Reviews 165, 187, 255].

In unseren Untersuchungen konnten wir im Melanom ebenfalls eine Beteiligung der ROS an der HIF-1 α Aktivität feststellen. Wir konnten durch die Behandlung von Melanomzellen mit Radikalfängern sowohl eine verminderte Aktivität als auch eine verringerte Proteinexpression von HIF-1 α nachweisen. Eine Induktion der ROS zeigte eine Steigerung der Aktivität und Proteinstabilität von HIF-1 α . Aufgrund einiger Faktoren, beispielsweise einer erhöhten Exposition mit UV-Strahlung sowie der Produktion von Melanin, kommt es im malignen Melanom zu einer erhöhten Bildung von ROS. UV-Licht kann zum einen über eine Induktion der Tyrosinase die Synthese von Melanin, das als Hauptquelle der ROS im Melanom dient, anregen. Das Melanin liegt normalerweise im antioxidativen Zustand vor und kann so die Haut vor den gefährlichen UV-Strahlen schützen. Zum anderen kann aber das Melanin durch eine stark erhöhte Exposition mit UV-Strahlung direkt beeinflusst werden, indem das UV-Licht Melanin in einen

prooxidativen Zustand versetzt und so für die Produktion von ROS sorgt. Diese erhöhte UV-Exposition kann somit den Gehalt an schädlichen ROS in Melanozyten fördern und ist dadurch schon an der frühen Tumorentwicklung beteiligt. Die ROS können die Transformation von Melanozyten initiieren, sie sind aber auch später in der Melanomentwicklung an der Progression von Melanomzellen beteiligt [Review 165]. Melanomzellen besitzen zusätzlich noch ein verändertes Antioxidantensystem, sodass sie schlechter vor den schädlichen ROS geschützt sind als andere Zelltypen [Review 165]. Der hohe intrazelluläre Anteil der ROS könnte im Melanom für die hohe Aktivität von HIF-1 α und damit für eine erhöhte Proliferation sowie ein verbessertes Überleben der Melanomzellen sorgen.

Eine Aktivierung von HIF-1 α durch die ROS kann über eine Regulation der Prolylhydroxylasen (PHDs) geschehen, wobei die PHD2 der Hauptregulator der Proteinstabilität von HIF- α ist. Wenn die PHDs inaktiviert werden, kann HIF-1 α nicht mehr abgebaut werden und es häuft sich infolge dessen in der Zelle an [256]. Es werden mehrere mögliche Mechanismen diskutiert, wie mitochondriale ROS die Aktivität der PHD2 regulieren können. Einerseits können ROS Signaltransduktionskaskaden auslösen, die in posttranslationalen Modifikationen der PHD2 resultieren oder sie können vielleicht über Strukturveränderungen der Disulfidbrückenbindungen der PHD2 ihre Aktivität inhibieren. Eine weitere Erklärung würde die Oxidation von Fe²⁺ liefern, wodurch die PHDs inaktiviert würden [Review 166]. Dagegen wurde auch eine negative Regulation beschrieben, in der HIF-1 α die PHDs induziert und somit die eigene Akkumulation von HIF-1 α unter einer lang andauernden Hypoxie limitiert. Diese Feedback-Schleife ermöglicht bei einer Sauerstoffzufuhr eine Limitierung und Feinregulierung der Aktivität von HIF-1 α [257].

Da in Studien neben einer Regulation der Proteinstabilität auch eine transkriptionelle Regulation von HIF-1 α gezeigt worden ist, haben wir eine Beteiligung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NF κ B an dieser Signalkaskade untersucht. Es wurde bereits nachgewiesen, dass ROS die Aktivität von NF κ B konstitutiv erhöhen können [258]. NF κ B kann unter Normoxie durch Bindung an den *HIF-1 α* Promotor die Aktivität von HIF-1 α als transkriptioneller Regulator induzieren [193]. Da im Melanom neben einem hohen ROS-Level auch eine hohe Aktivität von NF κ B, die die Melanomprogression

fördert, vorliegt [204, 259], haben wir vermutet, dass im Melanom eine ähnliche Signalkaskade für die hohe HIF-1 α Aktivität verantwortlich ist. In unseren Untersuchungen konnten wir durch Überexpression von stabilen I κ B, das die Aktivität von NF κ B hemmt, eine deutliche Reduktion HIF Aktivität feststellen. Außerdem konnte die Aktivität von HIF durch Kotransfektion von NF κ B-Untereinheiten weiter gesteigert werden. Durch weitere Versuche mit Radikalfängern konnte zudem die Aktivität von NF κ B inhibiert werden, was auf eine Induktion von NF κ B über die reaktiven Sauerstoffspezies hinweist.

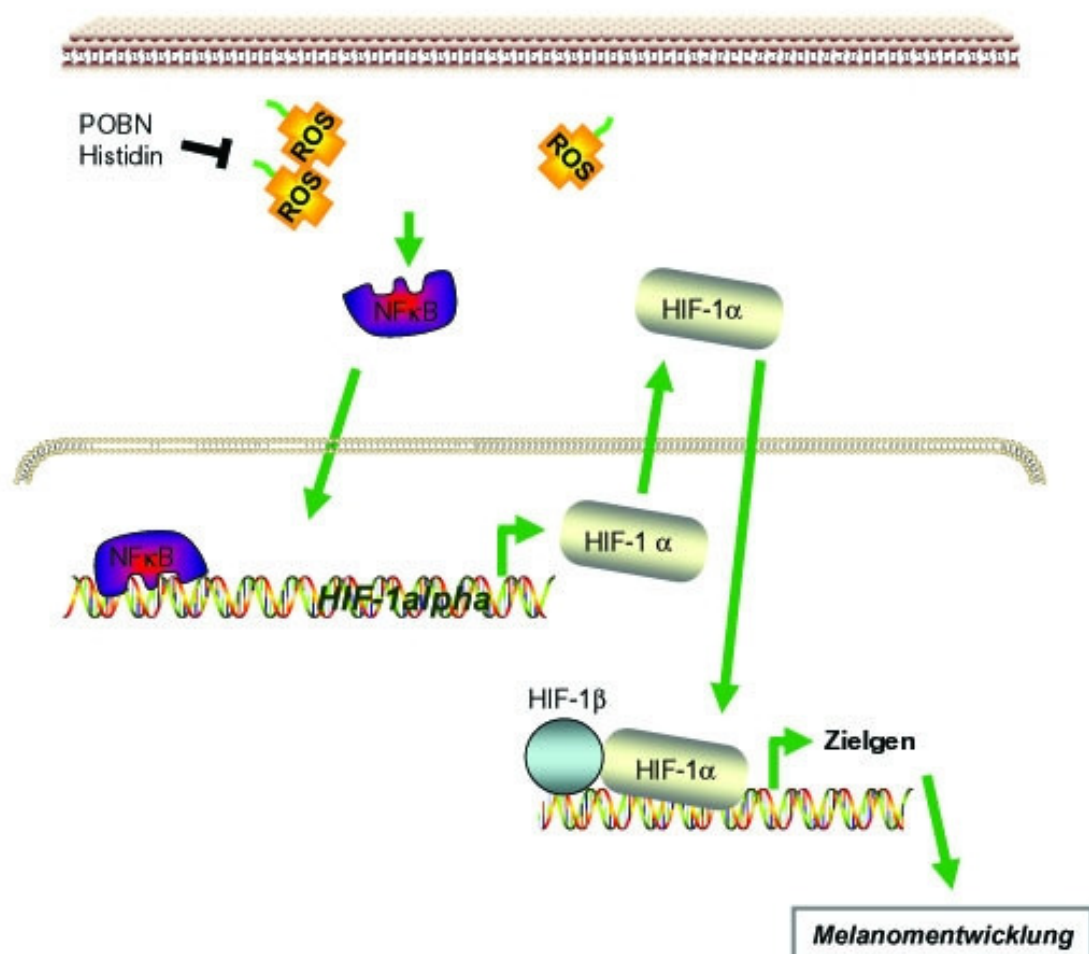


Abbildung 4-3: **Modell der Aktivierung von HIF-1 α im Melanom**

Im Melanom liegt ein hoher Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vor. Über Radikalfänger wie POBN und Histidin kann die Aktivität der ROS inhibiert werden. Die ROS können den Transkriptionsfaktor NF κ B induzieren, der in den Zellkern transloziert und an den Promotor von HIF-1 α bindet. Dadurch wird die mRNA und schließlich das Protein von HIF-1 α synthetisiert. Das Protein HIF-1 α gelangt wieder in den Zellkern und bindet gemeinsam mit HIF-1 β an den Promotor der Zielgene. Es werden Zielgene aktiviert, die die Entwicklung des Melanoms fördern können.

Diese Daten deuten darauf hin, dass NF κ B die mRNA-Synthese von HIF-1 α unter Normoxie aktiviert, wobei die ROS als Signalinduktoren dienen (Abb. 4-3). Damit wurde im Melanom mit NF κ B als transkriptionellen Regulator eine ähnliche Signalkaskade zur Aktivierung von HIF-1 α unter normalen Sauerstoffbedingungen gezeigt, wie sie schon in anderen Zelltypen nachgewiesen worden ist [193].

Es wurde in neueren Studien gezeigt, dass NF κ B auch an der Regulation des Proteins HIF-1 α beteiligt ist, ohne dabei die mRNA von HIF-1 α zu beeinflussen. Über den Tumornekrosefaktor α (TNF- α) wird das Protein HIF-1 α trotz einer intakten pVHL-HIF-1 α Interaktion nicht ubiquitiniert. Für diese Akkumulation von HIF-1 α über TNF- α ist NF κ B erforderlich und erfolgt vermutlich durch einen unbekannten Mechanismus, der anders als der hypoxieabhängige Mechanismus abläuft [260, 261]. Folglich könnte die transkriptionelle Regulation von HIF-1 α durch die ROS und NF κ B gemeinsam mit der Translation und Stabilisierung von HIF-1 α agieren. Vor kurzem ist in einer Studie festgestellt worden, dass das Melanoma Antigen-11 (MAGE-11) die PHD2 sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen hemmen und dadurch HIF-1 α stabilisieren kann [262]. Wir haben in ersten Versuchen eine hohe Expression von MAGE-11, das nicht ubiquitär exprimiert wird, im Melanom im Vergleich zu Melanozyten nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Daher wäre es denkbar, dass im Melanom zusätzlich die Proteinstabilität reguliert wird und so für die hohe und spezifische Aktivität von HIF-1 α sorgt. Diese translationelle Regulation von HIF-1 α müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

Es wurde von mehreren Kinasen wie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), und den MAP-Kinasen gezeigt, dass sie HIF-1 α beeinflussen können. In Zukunft könnte noch eine Beteiligung des PI3K und MAPK-Signalwegs an der Regulation von HIF-1 α im Melanom untersucht werden, wie sie schon in anderen Geweben gezeigt worden ist [119, 120, 190, 263, 264]. Eine Beteiligung von AKT bei der Transformation der Melanozyten über den HIF-Signalweg wurde bereits nachgewiesen [162]. So reguliert Akt über NF κ B die Expression von Notch1 und fördert so das Wachstum des Melanoms [163].

Bei der Haut handelt es sich aufgrund der Entfernung zu den Blutadern um ein leicht-hypoxisches Gewebe. Diese hypoxischen Bedingungen fördern über eine

steigende Expression von HIF-1 α und dessen Zielgene die Entwicklung des Melanoms [Review 187]. Die hohe Aktivität von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen, die wir in unseren Untersuchungen entdeckt haben, könnte für die weitere Metastasierung des Melanoms von hoher Bedeutung sein. So wäre in den Melanommetastasen HIF-1 α trotz der nicht-hypoxischen Bedingungen im Blut weiter aktiv. Dadurch könnte die Metastasierung von Melanomzellen im Vergleich zu anderen Zelltypen, in denen HIF-1 α nicht mehr aktiv ist, weiter gefördert werden. Über HIF-1 α werden Gene wie MMP2, AMF und c-Met aktiviert, die die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen fördern können [Review 114]. Über Zielgene wie VEGF kann die Angiogenese und somit die Versorgung der Tumorzellen sichergestellt werden [114, 265]. Ebenso wurde über HIF-1 α eine Aktivierung des ABC-Transporters MDR1 festgestellt, die zu einer erhöhten Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika führt [114, 266]. Über diese Faktoren könnte die erhöhte Aktivität von HIF-1 α ein weiterer Grund dafür sein, dass das maligne Melanom zu den gefährlichsten Tumorarten gehört.

Zusammenfassend konnten wir in unseren Untersuchungen im Melanom eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 α unter normalen Sauerstoffbedingungen feststellen, die auf den hohen Gehalt an ROS und die hohe Aktivität von NF κ B zurückzuführen ist. NF κ B kann dabei als transkriptioneller Regulator von HIF-1 α agieren. Durch die hohe Aktivität von HIF-1 α kann das Überleben der Melanomzellen und die Tumorprogression gefördert werden. Diese Eigenschaften tragen womöglich zu der hohen Resistenz gegenüber Therapieansätzen und der Gefährlichkeit des malignen Melanoms bei. Damit wurde eine neue Rolle von HIF-1 α in der Pathogenese des Melanoms festgestellt, die unabhängig von der Verfügbarkeit von Sauerstoff ist.

5 Literaturverzeichnis

1. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 2003; **121**(2): 231-241.
2. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008; **17**(12): 1063-1072.
3. Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 2002; **70**(9-10): 522-536.
4. Dupin E, Le Douarin NM. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene* 2003; **22**(20): 3016-3023.
5. Altmeyer P, Bacharas-Buhles M. *Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Umweltmedizin*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.
6. Hein R, Gummer M, Messer G, Plewig G. *Klinische Typen des malignen Melanoms*. Tumorzentrum München, 2000.
7. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; **355**(1): 51-65.
8. Panizzon RG, Guggisberg D. [Clinical aspects and pathology of melanoma]. *Ther Umsch* 1999; **56**(6): 302-308.
9. Hengge UR, Dummer R. *Malignes Melanom*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, 2006.
10. Dietlin C. Melanom.net - Informationen zum Hautkrebs. Liestal (CH): <http://www.melanom.net/>; 2008.
11. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A *et al*. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2007; **82**(3): 364-380.
12. Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 1991; **64**(4): 631-644.
13. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van HM. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; **15**(12): 1147-1165.
14. Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, Hsu MY, Schitteck B, Garbe C *et al*. Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci* 1998; **3**: D1005-D1010.
15. Xu LY, Koo J. Predictive value of phenotypic variables for skin cancer: risk assessment beyond skin typing. *Int J Dermatol* 2006; **45**(11): 1275-1283.
16. Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C. [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; **45**(5): 285-291.
17. La Porta CA. Drug resistance in melanoma: new perspectives. *Curr Med Chem* 2007; **14**(4): 387-391.
18. Rockmann H, Schadendorf D. Drug resistance in human melanoma: mechanisms and therapeutic opportunities. *Onkologie* 2003; **26**(6): 581-587.

19. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000; **12**(6): 547-554.
20. Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K *et al.* The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* 2005; **10**: 2986-3001.
21. Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 2003; **199**(3): 275-288.
22. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; **1**(2): 188-194.
23. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; **115**(3): 337-344.
24. Oikawa T. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004; **95**(8): 626-633.
25. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**(9): 1317-1327.
26. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 141-179.
27. Amiri KI, Richmond A. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; **24**(2): 301-313.
28. Kehlen A, Englert N, Seifert A, Klonisch T, Dralle H, Langner J *et al.* Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 2004; **109**(6): 833-838.
29. Kuphal S, Bosserhoff AK. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene* 2006; **25**(2): 248-259.
30. Poser I, Bosserhoff AK. Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histol Histopathol* 2004; **19**(1): 173-188.
31. Baxevas AD, Landsman D. The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**(9): 1604-1613.
32. Poser I, Golob M, Buettner R, Bosserhoff AK. Upregulation of HMG1 leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype. *Mol Cell Biol* 2003; **23**(8): 2991-2998.
33. van de Wetering M, Oosterwegel M, Dooijes D, Clevers H. Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J* 1991; **10**(1): 123-132.
34. Brantjes H, Barker N, van EJ, Clevers H. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol Chem* 2002; **383**(2): 255-261.
35. Schaeper U, Boyd JM, Verma S, Uhlmann E, Subramanian T, Chinnadurai G. Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(23): 10467-10471.

36. Chinnadurai G. CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol Cell* 2002; **9**(2): 213-224.
37. Corda D, Colanzi A, Luini A. The multiple activities of CtBP/BARS proteins: the Golgi view. *Trends Cell Biol* 2006; **16**(3): 167-173.
38. Nardini M, Spano S, Cericola C, Pesce A, Massaro A, Millo E *et al.* CtBP/BARS: a dual-function protein involved in transcription co-repression and Golgi membrane fission. *EMBO J* 2003; **22**(12): 3122-3130.
39. Kumar V, Carlson JE, Ohgi KA, Edwards TA, Rose DW, Escalante CR *et al.* Transcription corepressor CtBP is an NAD(+)-regulated dehydrogenase. *Mol Cell* 2002; **10**(4): 857-869.
40. Sewalt RG, Gunster MJ, van d, V, Satiijn DP, Otte AP. C-Terminal binding protein is a transcriptional repressor that interacts with a specific class of vertebrate Polycomb proteins. *Mol Cell Biol* 1999; **19**(1): 777-787.
41. Turner J, Crossley M. The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors. *Bioessays* 2001; **23**(8): 683-690.
42. Quinlan KG, Nardini M, Verger A, Francescato P, Yaswen P, Corda D *et al.* Specific recognition of ZNF217 and other zinc finger proteins at a surface groove of C-terminal binding proteins. *Mol Cell Biol* 2006; **26**(21): 8159-8172.
43. Bergman LM, Blaydes JP. C-terminal binding proteins: emerging roles in cell survival and tumorigenesis. *Apoptosis* 2006; **11**(6): 879-888.
44. Tripathi MK, Misra S, Khedkar SV, Hamilton N, Irvin-Wilson C, Sharan C *et al.* Regulation of BRCA2 gene expression by the SLUG repressor protein in human breast cells. *J Biol Chem* 2005; **280**(17): 17163-17171.
45. Poser I, Golob M, Weidner M, Buettner R, Bosserhoff AK. Down-regulation of COOH-terminal binding protein expression in malignant melanomas leads to induction of MIA expression. *Cancer Res* 2002; **62**(20): 5962-5966.
46. Chinnadurai G. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**(9): 1593-1607.
47. Mirnezami AH, Campbell SJ, Darley M, Primrose JN, Johnson PW, Blaydes JP. Hdm2 recruits a hypoxia-sensitive corepressor to negatively regulate p53-dependent transcription. *Curr Biol* 2003; **13**(14): 1234-1239.
48. Zhang Q, Wang SY, Nottke AC, Rocheleau JV, Piston DW, Goodman RH. Redox sensor CtBP mediates hypoxia-induced tumor cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(24): 9029-9033.
49. Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 1999; **18**(1): 15-30.
50. Handschuh G, Candidus S, Luber B, Reich U, Schott C, Oswald S *et al.* Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 1999; **18**(30): 4301-4312.
51. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; **84**(3): 345-357.
52. Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 2000; **148**(3): 399-404.
53. Nollet F, Kools P, van RF. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 2000; **299**(3): 551-572.

54. Blaschuk OW, Rowlands TM. Cadherins as modulators of angiogenesis and the structural integrity of blood vessels. *Cancer Metastasis Rev* 2000; **19**(1-2): 1-5.
55. Taneyhill LA. To adhere, or not to adhere: The role of Cadherins in neural crest development. *Cell Adh Migr* 2008; **2**(4): 1-8.
56. O'Day D. Advanced Cell Biology - BIO315F. University of Toronto - <http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio315/index.html>; 2009.
57. Silye R, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Poole S, van NS, Batchelor W *et al.* E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 1998; **186**(4): 350-355.
58. Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 2001; **276**(27): 24661-24666.
59. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001; **61**(9): 3819-3825.
60. Bauer R, Hein R, Bosserhoff AK. A secreted form of P-cadherin is expressed in malignant melanoma. *Exp Cell Res* 2005; **305**(2): 418-426.
61. Bauer R, Bosserhoff AK. Functional implication of truncated P-cadherin expression in malignant melanoma. *Exp Mol Pathol* 2006; **81**(3): 224-230.
62. Bosserhoff AK, Hein R, Bogdahn U, Buettner R. Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J Biol Chem* 1996; **271**(1): 490-495.
63. van Groningen JJ, Bloemers HP, Swart GW. 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* 1995; **55**(24): 6237-6243.
64. Blesch A, Bosserhoff AK, Apfel R, Behl C, Hessdoerfer B, Schmitt A *et al.* Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res* 1994; **54**(21): 5695-5701.
65. Bosserhoff AK, Echtenacher B, Hein R, Buettner R. Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Res* 2001; **11**(4): 417-421.
66. Bosserhoff AK, Stoll R, Sleeman JP, Bataille F, Buettner R, Holak TA. Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Lab Invest* 2003; **83**(11): 1583-1594.
67. Bosserhoff AK. Melanoma inhibitory activity (MIA): an important molecule in melanoma development and progression. *Pigment Cell Res* 2005; **18**(6): 411-416.
68. Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R *et al.* Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res* 1997; **57**(15): 3149-3153.
69. Poser I, Tatzel J, Kuphal S, Bosserhoff AK. Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene* 2004; **23**(36): 6115-6124.
70. Rothhammer T, Bosserhoff AK. Influence of melanoma inhibitory activity on transforming growth factor-beta signaling in malignant melanoma. *Melanoma Res* 2006; **16**(4): 309-316.

71. Tatzel J, Poser I, Schroeder J, Bosserhoff AK. Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment Cell Res* 2005; **18**(2): 92-101.
72. Bauer R, Humphries M, Fassler R, Winklmeier A, Craig SE, Bosserhoff AK. Regulation of integrin activity by MIA. *J Biol Chem* 2006; **281**(17): 11669-11677.
73. Golob M, Buettner R, Bosserhoff AK. Characterization of a transcription factor binding site, specifically activating MIA transcription in melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; **115**(1): 42-47.
74. Cohen-Salmon M, Frenz D, Liu W, Verpy E, Voegelings S, Petit C. Fdp, a new fibrocyte-derived protein related to MIA/CD-RAP, has an in vitro effect on the early differentiation of the inner ear mesenchyme. *J Biol Chem* 2000; **275**(51): 40036-40041.
75. Rendtorff ND, Frodin M, Attie-Bitach T, Vekemans M, Tommerup N. Identification and characterization of an inner ear-expressed human melanoma inhibitory activity (MIA)-like gene (MIAL) with a frequent polymorphism that abolishes translation. *Genomics* 2001; **71**(1): 40-52.
76. Robertson NG, Heller S, Lin JS, Resendes BL, Weremowicz S, Denis CS *et al.* A novel conserved cochlear gene, OTOR: identification, expression analysis, and chromosomal mapping. *Genomics* 2000; **66**(3): 242-248.
77. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific expression and regulation of the new melanoma inhibitory activity-related gene MIA2 in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003; **278**(17): 15225-15231.
78. Hellerbrand C, Amann T, Schlegel J, Wild P, Bataille F, Spruss T *et al.* The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2008; **57**(2): 243-251.
79. Arndt S, Bosserhoff AK. TANGO is a tumor suppressor of malignant melanoma. *Int J Cancer* 2006; **119**(12): 2812-2820.
80. Arndt S, Bosserhoff AK. Reduced expression of TANGO in colon and hepatocellular carcinomas. *Oncol Rep* 2007; **18**(4): 885-891.
81. Loughheed JC, Holton JM, Alber T, Bazan JF, Handel TM. Structure of melanoma inhibitory activity protein, a member of a recently identified family of secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**(10): 5515-5520.
82. Stoll R, Renner C, Zweckstetter M, Bruggert M, Ambrosius D, Palme S *et al.* The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J* 2001; **20**(3): 340-349.
83. Stoll R, Renner C, Buettner R, Voelter W, Bosserhoff AK, Holak TA. Backbone dynamics of the human MIA protein studied by (15)N NMR relaxation: implications for extended interactions of SH3 domains. *Protein Sci* 2003; **12**(3): 510-519.
84. Guba M, Bosserhoff AK, Steinbauer M, Abels C, Anthuber M, Buettner R *et al.* Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Br J Cancer* 2000; **83**(9): 1216-1222.
85. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**(2): 167-171.
86. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000; **203**(Pt 8): 1253-1263.
87. Heinike K, Hofer R, Wenger H, Gassmann M. Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 2002; **10**.

88. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* 2005;(94): 209-231.
89. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; **270**(3): 1230-1237.
90. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001; **294**(5545): 1337-1340.
91. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR *et al.* C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; **107**(1): 43-54.
92. Soitamo AJ, Rabergh CM, Gassmann M, Sistonen L, Nikinmaa M. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *J Biol Chem* 2001; **276**(23): 19699-19705.
93. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001; **15**(7): 1312-1314.
94. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH *et al.* Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998; **12**(2): 149-162.
95. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; **11**(1): 72-82.
96. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003; **23**(24): 9361-9374.
97. Sowter HM, Raval RR, Moore JW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res* 2003; **63**(19): 6130-6134.
98. Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL *et al.* Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 1998; **92**(7): 2260-2268.
99. Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, Jurgensen JS, Rosenberger C, Morgan NV *et al.* Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma. *Blood* 2002; **99**(10): 3562-3565.
100. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 1998; **7**(3): 205-213.
101. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **287**(4): 808-813.
102. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H *et al.* Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001; **414**(6863): 550-554.
103. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem* 2002; **277**(36): 32405-32408.

104. Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 1999; **209**(2): 254-267.
105. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998; **17**(11): 3005-3015.
106. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**(9): 4273-4278.
107. Haddad JJ. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res* 2002; **3**: 26.
108. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M *et al.* HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 2001; **292**(5516): 464-468.
109. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ *et al.* Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; **292**(5516): 468-472.
110. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; **399**(6733): 271-275.
111. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 2000; **19**(16): 4298-4309.
112. Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G *et al.* Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(8): 5367-5372.
113. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002; **16**(12): 1466-1471.
114. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**(10): 721-732.
115. Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1alpha. *J Cell Sci* 1999; **112** (Pt 8): 1203-1212.
116. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(12): 5510-5514.
117. Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 1997; **378**(7): 609-616.
118. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; **271**(30): 17771-17778.
119. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999; **274**(46): 32631-32637.

120. Sodhi A, Montaner S, Miyazaki H, Gutkind JS. MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **287**(1): 292-300.
121. Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 2002; **512**(1-3): 157-162.
122. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E *et al.* Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000; **14**(4): 391-396.
123. Carroll VA, Ashcroft M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med* 2005; **7**(6): 1-16.
124. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; **16**(9): 4604-4613.
125. Jubb AM, Pham TQ, Hanby AM, Frantz GD, Peale FV, Wu TD *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1alpha, and carbonic anhydrase IX in human tumours. *J Clin Pathol* 2004; **57**(5): 504-512.
126. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993; **82**(12): 3610-3615.
127. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1997; **272**(32): 20055-20062.
128. Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1999; **274**(34): 24142-24146.
129. Ebert BL, Gleadle JM, O'Rourke JF, Bartlett SM, Poulton J, Ratcliffe PJ. Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. *Biochem J* 1996; **313** (Pt 3): 809-814.
130. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994; **269**(38): 23757-23763.
131. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P *et al.* Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; **271**(51): 32529-32537.
132. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006; **3**(3): 187-197.
133. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; **3**(3): 177-185.
134. Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 1995; **270**(36): 21021-21027.
135. Jeong HJ, Chung HS, Lee BR, Kim SJ, Yoo SJ, Hong SH *et al.* Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1alpha and NF-kappaB activation on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **306**(4): 805-811.

136. Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P *et al.* Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha -deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(4): 2170-2174.
137. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N *et al.* HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003; **112**(5): 645-657.
138. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2008; **15**(4): 678-685.
139. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 2008; **15**(4): 621-627.
140. Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T, Neckers L. p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem* 1998; **273**(20): 11995-11998.
141. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; **276**(12): 9519-9525.
142. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 1997; **57**(23): 5328-5335.
143. Liu LZ, Hu XW, Xia C, He J, Zhou Q, Shi X *et al.* Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2006; **41**(10): 1521-1533.
144. Vleugel MM, Shvarts D, van der Wall E, van Diest PJ. p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 2006; **37**(8): 1085-1092.
145. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J* 1998; **17**(17): 5085-5094.
146. Blagosklonny MV. Do VHL and HIF-1 mirror p53 and Mdm-2? Degradation-transactivation loops of oncoproteins and tumor suppressors. *Oncogene* 2001; **20**(3): 395-398.
147. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 1998; **58**(7): 1408-1416.
148. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; **49**(23): 6449-6465.
149. Kunz M, Ibrahim SM. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol Cancer* 2003; **2**: 23.
150. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR *et al.* Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1996; **56**(5): 941-943.
151. Hockel M, Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* 2001; **28**(2 Suppl 8): 36-41.
152. Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY *et al.* Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* 2005; **8**(2): 99-110.

153. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E *et al.* The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003; **22**(21): 3213-3220.
154. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001; **61**(7): 2911-2916.
155. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000; **60**(17): 4693-4696.
156. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000; **60**(15): 4010-4015.
157. Gort EH, Groot AJ, Derks van de Ven TL, van der Groep P, Verlaan I, van LT *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha expression requires PI 3-kinase activity and correlates with Akt1 phosphorylation in invasive breast carcinomas. *Oncogene* 2006; **25**(45): 6123-6127.
158. Krieg M, Haas R, Brauch H, Acker T, Flamme I, Plate KH. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 2000; **19**(48): 5435-5443.
159. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ *et al.* The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; **157**(2): 411-421.
160. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; **59**(22): 5830-5835.
161. Kumar SM, Yu H, Edwards R, Chen L, Kazianis S, Brafford P *et al.* Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. *Cancer Res* 2007; **67**(7): 3177-3184.
162. Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* 2005; **8**(6): 443-454.
163. Bedogni B, Warneke JA, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development. *J Clin Invest* 2008; **118**(11): 3660-3670.
164. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 1999; **11**(1): 1-14.
165. Wittgen HG, van Kempen LC. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res* 2007; **17**(6): 400-409.
166. Cash TP, Pan Y, Simon MC. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med* 2007; **43**(9): 1219-1225.
167. Klimova T, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ* 2008; **15**(4): 660-666.
168. Pouyssegur J, Mechta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem* 2006; **387**(10-11): 1337-1346.

169. Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J* 2008; **409**(1): 19-26.
170. Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 1991; **65**(7): 1255-1266.
171. Schuierer M, Hilger-Eversheim K, Dobner T, Bosserhoff AK, Moser M, Turner J *et al.* Induction of AP-2alpha expression by adenoviral infection involves inactivation of the AP-2rep transcriptional corepressor CtBP1. *J Biol Chem* 2001; **276**(30): 27944-27949.
172. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M *et al.* Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 2004; **18**(12): 1462-1464.
173. Hellerbrand C, Jobin C, Iimuro Y, Licato L, Sartor RB, Brenner DA. Inhibition of NFkappaB in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor. *Hepatology* 1998; **27**(5): 1285-1295.
174. Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns KE, Schoonhoven R, Grisham JW *et al.* NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 1998; **101**(4): 802-811.
175. Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fassler R. Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 2006; **125**(4): 665-677.
176. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; **150**(1): 76-85.
177. Melle C, Osterloh D, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, von EF. Identification of proteins from colorectal cancer tissue by two-dimensional gel electrophoresis and SELDI mass spectrometry. *Int J Mol Med* 2005; **16**(1): 11-17.
178. Nakagawa S, Takeichi M. Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* 1998; **125**(15): 2963-2971.
179. Winklmeier A, Poser I, Hoek KS, Bosserhoff AK. Loss of full length CtBP1 expression enhances the invasive potential of human melanoma. *BMC Cancer* 2009; **9**(1): 52.
180. Winklmeier A, Contreras-Shannon V, Arndt S, Melle C, Bosserhoff AK. Cadherin-7 interacts with melanoma inhibitory activity protein and negatively modulates melanoma cell migration. *Cancer Sci* 2009; **100**(2): 261-268.
181. Bosserhoff AK, Moser M, Buettner R. Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO. *Gene Expr Patterns* 2004; **4**(4): 473-479.
182. Moore R, Champeval D, Denat L, Tan SS, Faure F, Julien-Grille S *et al.* Involvement of cadherins 7 and 20 in mouse embryogenesis and melanocyte transformation. *Oncogene* 2004; **23**(40): 6726-6735.
183. Nibu Y, Zhang H, Levine M. Interaction of short-range repressors with Drosophila CtBP in the embryo. *Science* 1998; **280**(5360): 101-104.
184. Pena C, Garcia JM, Garcia V, Silva J, Dominguez G, Rodriguez R *et al.* The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int J Cancer* 2006; **119**(9): 2098-2104.

185. Smith AP, Hoek K, Becker D. Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas. *Cancer Biol Ther* 2005; **4**(9): 1018-1029.
186. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L *et al.* In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 2008; **68**(3): 650-656.
187. Michaylira CZ, Nakagawa H. Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression. *Cancer Biol Ther* 2006; **5**(5): 476-479.
188. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; **277**(41): 38205-38211.
189. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; **94**(5): 1561-1567.
190. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; **275**(35): 26765-26771.
191. Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A *et al.* Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 2005; **65**(19): 9047-9055.
192. Sun HL, Liu YN, Huang YT, Pan SL, Huang DY, Guh JH *et al.* YC-1 inhibits HIF-1 expression in prostate cancer cells: contribution of Akt/NF-kappaB signaling to HIF-1alpha accumulation during hypoxia. *Oncogene* 2007; **26**(27): 3941-3951.
193. Bonello S, Zahringer C, Belaiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C *et al.* Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**(4): 755-761.
194. Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal* 2005; **7**(3-4): 395-403.
195. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**(5): 619-627.
196. Feltes CM, Kudo A, Blaschuk O, Byers SW. An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion. *Cancer Res* 2002; **62**(22): 6688-6697.
197. Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **34**(3): 255-268.
198. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000; **148**(4): 779-790.
199. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A *et al.* E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; **113**(1): 173-185.
200. Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van RF. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991; **66**(1): 107-119.

201. Nobumoto A, Nagahara K, Oomizu S, Katoh S, Nishi N, Takeshita K *et al.* Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. *Glycobiology* 2008; **18**(9): 735-744.
202. Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E *et al.* SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 2006; **66**(15): 7516-7523.
203. Sangaletti S, Di CE, Gariboldi S, Miotti S, Cappetti B, Parenza M *et al.* Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* 2008; **68**(21): 9050-9059.
204. Kuphal S, Poser I, Jobin C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* 2004; **23**(52): 8509-8519.
205. Li H, Alizadeh H, Niederkorn JY. Differential expression of chemokine receptors on uveal melanoma cells and their metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**(2): 636-643.
206. Mani-Telang P, Arnosti DN. Developmental expression and phylogenetic conservation of alternatively spliced forms of the C-terminal binding protein corepressor. *Dev Genes Evol* 2007; **217**(2): 127-135.
207. Barnes CJ, Vadlamudi RK, Mishra SK, Jacobson RH, Li F, Kumar R. Functional inactivation of a transcriptional corepressor by a signaling kinase. *Nat Struct Biol* 2003; **10**(8): 622-628.
208. Kuppuswamy M, Vijayalingam S, Zhao LJ, Zhou Y, Subramanian T, Ryerse J *et al.* Role of the PLDLS-binding cleft region of CtBP1 in recruitment of core and auxiliary components of the corepressor complex. *Mol Cell Biol* 2008; **28**(1): 269-281.
209. Quinlan KG, Verger A, Kwok A, Lee SH, Perdomo J, Nardini M *et al.* Role of the C-terminal binding protein PXDLS motif binding cleft in protein interactions and transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 2006; **26**(21): 8202-8213.
210. Spyer M, Allday MJ. The transcriptional co-repressor C-terminal binding protein (CtBP) associates with centrosomes during mitosis. *Cell Cycle* 2006; **5**(5): 530-537.
211. Jin W, Scotto KW, Hait WN, Yang JM. Involvement of CtBP1 in the transcriptional activation of the MDR1 gene in human multidrug resistant cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2007; **74**(6): 851-859.
212. Fang M, Li J, Blauwkamp T, Bhambhani C, Campbell N, Cadigan KM. C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in Drosophila. *EMBO J* 2006; **25**(12): 2735-2745.
213. Meloni AR, Smith EJ, Nevins JR. A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(17): 9574-9579.
214. Clair T, Aoki J, Koh E, Bandle RW, Nam SW, Ptaszynska MM *et al.* Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res* 2003; **63**(17): 5446-5453.
215. Murata J, Lee HY, Clair T, Krutzsch HC, Arestad AA, Sobel ME *et al.* cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 1994; **269**(48): 30479-30484.
216. Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K *et al.* Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 2002; **158**(2): 227-233.

217. Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, Suzuki R *et al.* Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem* 2004; **279**(17): 17634-17639.
218. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**(8): 582-591.
219. Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: its role in regulation of cell motility and nuclear factor kappa B-mediated urokinase type plasminogen activator expression. *IUBMB Life* 2005; **57**(6): 441-447.
220. Lee J, Duk J, I, Gyo PC, Han JW, Young LH. Autotaxin stimulates urokinase-type plasminogen activator expression through phosphoinositide 3-kinase-Akt-nuclear [corrected] factor kappa B signaling cascade in human melanoma cells. *Melanoma Res* 2006; **16**(5): 445-452.
221. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP *et al.* Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 2006; **26**(13): 5015-5022.
222. Touab M, Villena J, Barranco C, Arumi-Uria M, Bassols A. Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol* 2002; **160**(2): 549-557.
223. LeBaron RG, Zimmermann DR, Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem* 1992; **267**(14): 10003-10010.
224. Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem* 1989; **264**(14): 8012-8018.
225. Miquel-Serra L, Serra M, Hernandez D, Domenzain C, Docampo MJ, Rabanal RM *et al.* V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumor growth and metastasis. *Lab Invest* 2006; **86**(9): 889-901.
226. Chen Q, Watson JT, Marengo SR, Decker KS, Coleman I, Nelson PS *et al.* Gene expression in the LNCaP human prostate cancer progression model: progression associated expression in vitro corresponds to expression changes associated with prostate cancer progression in vivo. *Cancer Lett* 2006; **244**(2): 274-288.
227. Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Biol Chem* 1994; **269**(31): 19659-19662.
228. Leonhardt K, Gebhardt R, Mossner J, Lutsenko S, Huster D. Functional interactions of CU-atpase ATP7B with cisplatin and the role of ATP7B in cells resistance to the drug. *J Biol Chem* 2009.
229. Mijatovic T, Ingrassia L, Facchini V, Kiss R. Na⁺/K⁺-ATPase alpha subunits as new targets in anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2008; **12**(11): 1403-1417.
230. Oue N, Hamai Y, Mitani Y, Matsumura S, Oshimo Y, Aung PP *et al.* Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Res* 2004; **64**(7): 2397-2405.
231. van Kempen LC, Rhee JS, Dehne K, Lee J, Edwards DR, Coussens LM. Epithelial carcinogenesis: dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment. *Differentiation* 2002; **70**(9-10): 610-623.
232. Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003; **12**(2): 109-125.

233. van Kempen LC, Rijntjes J, Mamor-Cornelissen I, Vincent-Naulleau S, Gerritsen MJ, Ruiter DJ *et al.* Type I collagen expression contributes to angiogenesis and the development of deeply invasive cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2008; **122**(5): 1019-1029.
234. Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. [Biological effects of collagen I and IV peptides]. *J Soc Biol* 2003; **197**(1): 31-39.
235. Quatresooz P, Pierard GE. Immunohistochemical investigation of alpha1 (IV) and alpha5 (IV) collagen chains in a broad spectrum of melanocytic tumours. *Melanoma Res* 2005; **15**(3): 161-168.
236. Law WJ, Cann KL, Hicks GG. TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006; **5**(1): 8-14.
237. Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G *et al.* Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 2008; **454**(7200): 126-130.
238. Tiwari-Woodruff SK, Buznikov AG, Vu TQ, Micevych PE, Chen K, Kornblum HI *et al.* OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *J Cell Biol* 2001; **153**(2): 295-305.
239. Arabzadeh A, Troy TC, Turksen K. Changes in the distribution pattern of Claudin tight junction proteins during the progression of mouse skin tumorigenesis. *BMC Cancer* 2007; **7**: 196.
240. Leotlela PD, Wade MS, Duray PH, Rhode MJ, Brown HF, Rosenthal DT *et al.* Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene* 2007; **26**(26): 3846-3856.
241. Chao YC, Pan SH, Yang SC, Yu SL, Che TF, Lin CW *et al.* Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; **179**(2): 123-133.
242. Mima S, Takehara M, Takada H, Nishimura T, Hoshino T, Mizushima T. NSAIDs suppress the expression of claudin-2 to promote invasion activity of cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; **29**(10): 1994-2000.
243. Huang YH, Bao Y, Peng W, Goldberg M, Love K, Bumcrot DA *et al.* Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009.
244. Osanai M, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Epigenetic silencing of claudin-6 promotes anchorage-independent growth of breast carcinoma cells. *Cancer Sci* 2007; **98**(10): 1557-1562.
245. Hernandez MC, Andres-Barquin PJ, Martinez S, Bulfone A, Rubenstein JL, Israel MA. ENC-1: a novel mammalian kelch-related gene specifically expressed in the nervous system encodes an actin-binding protein. *J Neurosci* 1997; **17**(9): 3038-3051.
246. Kim TA, Ota S, Jiang S, Pasztor LM, White RA, Avraham S. Genomic organization, chromosomal localization and regulation of expression of the neuronal nuclear matrix protein NRP/B in human brain tumors. *Gene* 2000; **255**(1): 105-116.
247. Fujita M, Furukawa Y, Tsunoda T, Tanaka T, Ogawa M, Nakamura Y. Up-regulation of the ectodermal-neural cortex 1 (ENC1) gene, a downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex, in colorectal carcinomas. *Cancer Res* 2001; **61**(21): 7722-7726.

248. Moeller MJ, Soofi A, Braun GS, Li X, Watzl C, Kriz W *et al.* Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. *EMBO J* 2004; **23**(19): 3769-3779.
249. Tong GX, Yee H, Chiriboga L, Hernandez O, Waisman J. Fascin-1 expression in papillary and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Hum Pathol* 2005; **36**(7): 741-746.
250. Goncharuk VN, Ross JS, Carlson JA. Actin-binding protein fascin expression in skin neoplasia. *J Cutan Pathol* 2002; **29**(7): 430-438.
251. Shonukan O, Bagayogo I, McCrea P, Chao M, Hempstead B. Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene* 2003; **22**(23): 3616-3623.
252. Zhang S, Lin QD, DI W. Suppression of human ovarian carcinoma metastasis by the metastasis-suppressor gene, BRMS1. *Int J Gynecol Cancer* 2006; **16**(2): 522-531.
253. Ishiyama T, Kano J, Anami Y, Onuki T, Iijima T, Morisita Y *et al.* OCIA domain containing 2 is highly expressed in adenocarcinoma mixed subtype with bronchioloalveolar carcinoma component and is associated with better prognosis. *Cancer Sci* 2007; **98**(1): 50-57.
254. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 2002; **277**(50): 48403-48409.
255. Galanis A, Pappa A, Giannakakis A, Lanitis E, Dangaj D, Sandaltzopoulos R. Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. *Cancer Lett* 2008; **266**(1): 12-20.
256. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 2003; **22**(16): 4082-4090.
257. Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J* 2004; **381**(Pt 3): 761-767.
258. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; **441**(7092): 431-436.
259. Ueda Y, Richmond A. NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res* 2006; **19**(2): 112-124.
260. Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J* 2003; **370**(Pt 3): 1011-1017.
261. Zhou J, Schmid T, Brune B. Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 2003; **14**(6): 2216-2225.
262. Aprelikova O, Pandolfi S, Tackett S, Ferreira M, Salnikow K, Ward Y *et al.* Melanoma antigen-11 inhibits the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 and activates hypoxic response. *Cancer Res* 2009; **69**(2): 616-624.
263. BelAiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T *et al.* Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 2007; **18**(12): 4691-4697.

264. Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 1997; **90**(9): 3322-3331.
265. Giatromanolaki A, Sivridis E, Kouskoukis C, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin. *Melanoma Res* 2003; **13**(5): 493-501.
266. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002; **62**(12): 3387-3394.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
As ₂ O ₃	Arsen(III)-oxid
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
Cu	Kupfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMOG	Dimethyloxallylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ERK	extracellular signal-related kinase
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> : und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HBS	HIF-Bindungsstelle
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	<i>hypoxia response element</i>

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KoIP	Ko-Immunpräzipitation
l	Liter
LEF/TCF	<i>lymphoid enhancer factor/ T cell factor</i>
M	Mol; molar
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
min	Minute
MIA	<i>melanoma inhibitory activity</i>
mRNA	messenger RNA
NFκB	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells
NHEM	Normal humane epidermale Melanozyten
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHD	Prolyl-4-hydroxylase
POBN	α-(4-Pyridyl N-oxide)-N-tert-butylnitron
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	<i>RadioImmuno Precipitation Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
siRNA	Short-interfering RNA
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N., N.-Tetramethylethyldiamin
U	Unit

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von Hippel-Lindau-Faktor
w/v	Masse pro Volumen

7 Danksagung

Bedanken möchte ich mich sehr bei Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit, hier promovieren zu können. Zusätzlich bedanke ich mich für die engagierte Betreuung, die Geduld und die kritischen Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater PD Dr. Werner Kremer bedanke ich mich für die Betreuung und Vertretung an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Regensburg.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter, dass ich meine Dissertation an seinem Institut anfertigen konnte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, für das gute Arbeitsklima und für die tolle Unterstützung meiner Arbeit.

Bei meinen ehemaligen Laborkolleginnen Anne, Jacqueline und Simone K. sowie der aktuellen Laborcrew Barbara, Rainer und natürlich Susi bedanke ich mich sehr für die große Hilfe, die mir während der Doktorarbeit zugekommen ist.

Den fleißigen technischen Mitarbeiterinnen danke ich für die viele Hilfe, wenn ich mal wieder was gebraucht habe. Eva, Lisa und Lena für die zuverlässige Unterstützung. Sibylla für die RNAs, RIPAs usw., Susanne für die vielen Bestellungen...

Barbara, Jenny und Steffi danke ich sehr, dass sie mir für die Labmeetings immer ihren Laptop zur Verfügung gestellt haben.

Zusätzlich möchte ich mich noch bei meinen Mitstreitern Alex, Daniel, Johanna, Simone B., Tanja, Tom und Uli bedanken, mit denen ich immer biologische Fragestellungen (und andere Sachen) diskutieren konnte.

Vielen Dank auch an Silke für das eifrige Korrekturlesen meiner Arbeit und für die hilfreichen Anregungen sowie an Steffi, für das offene Ohr bei Problemen.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die mir diese Ausbildung ermöglicht und mich immer dabei unterstützt hat.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Andreas Winklmeier, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

.....
Ort, Datum

.....
Andreas Winklmeier