

Rolle der TGF $\beta$  Familie und ihre Interaktion mit anderen  
Wachstumsfaktoren bei der Entstehung, Wachstum und Invasion des  
malignen Melanoms



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

vorgelegt von  
Tanja Rothhammer  
aus Regensburg  
Mai 2007

Promotionsgesuch eingereicht am 11. Mai 2005

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

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ralph Witzgall

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

2. Gutachterin: Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff

3. Prüfer: Prof. Dr. Ernst Tamm



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1 TUMORINZIDENZ IN DEUTSCHLAND	4
1.2 DAS MALIGNEN MELANOM	4
1.2.1 DEFINITION DES MALIGNEN MELANOMS	4
1.2.2 INZIDENZ UND MORTALITÄTSRATE	5
1.2.3 KLINISCHE EINTEILUNG DER VERSCHIEDENEN MELANOMTYPEN	5
1.3 MODELL DER MELANOM ENTSTEHUNG UND PROGRESSION	9
1.4 MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER MELANOMENTSTEHUNG UND PROGRESSION	11
1.4.1 ROLLE VON WACHSTUMSFAKTOREN	11
1.4.2 ROLLE VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	14
1.4.3 ROLLE DES ZELLZYKLUS	19
1.4.4 ROLLE DER RAS/RAF/MEK/ERK-SIGNALKASKADE	23
1.4.5 ROLLE VON MIA (MELANOMA INHIBITORY ACTIVITY)	25
1.5 BMP UND TGF-BETA SIGNALKASKADE	26
1.5.1 ROLLE DER TGF-BETA SIGNALKASKADE	29
1.5.2 BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMPs)	30
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>34</b>
2.1 MATERIALIEN	34
2.1.1 ALLGEMEINE MATERIALIEN	34
2.1.2 GERÄTE	37
2.1.3 BAKTERIEN	40
2.1.4 VIREN	40
2.1.5 SÄUGERZELLLINIEN	41
2.1.6 VEKTOREN	42
2.1.7 OLIGONUKLEOTIDE	45
2.1.8 SHORT INTERFERING RNAs (siRNA)	47
2.2 MEDIEN, ANTIBIOTIKA UND PUFFER	47
2.2.1 MEDIEN ZUR ANZUCHT VON E.COLI UND SÄUGERZELLKULTUREN	47

2.2.2	ANTIBIOTIKA	48
2.2.3	PUFFER UND LÖSUNGEN	48
<b>2.3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>51</b>
2.3.1	ARBEITEN MIT ESCHERICHIA COLI	51
2.3.2	ALLGEMEINE METHODEN	53
<b>2.4</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>53</b>
2.4.1	DNA TECHNIKEN	53
2.4.2	RNA-TECHNIKEN	59
2.4.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	59
<b>2.5</b>	<b>ZELLKULTURMETHODEN</b>	<b>62</b>
2.5.1	KULTIVIERUNG VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN	62
2.5.2	TRANSFEKTION VON ZELLKULTURZELLEN	63
2.5.3	LUCIFERASE-REPORTERGEN-ASSAY	63
2.5.4	MIGRATIONS- UND MATRIGEL INVASIONS-ASSAY (BOYDEN KAMMER)	64
2.5.5	MATRIGEL INVASIONS ASSAY (TRANSWELL- SYSTEM)	65
2.5.6	TUBEN-FORMATIONS ASSAY	65
2.5.7	CFSE- FLUORESCENZ FÄRBUNG FÜR PROLIFERATIONSANALYSE UND TUBEN-FORMATIONS ASSAY	66
2.5.8	PROLIFERATIONSANALYSE MIT DER CFSE METHODE	66
<b>2.6</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>66</b>
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>ANALYSE DER TGF-BETA SIGNALKASKADE</b>	<b>70</b>
4.1.1	EXPRESSION UND FUNKTION DES TRANSKRIPTIONELLEN KO-REPRESSORS SNO	70
4.1.2	EINFLUSS VON MIA AUF DIE TGF BETA VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION	75
<b>4.2</b>	<b>EXPRESSION UND FUNKTION VON <i>BONE MORPHOGENETIC PROTEINS</i> (BMPs) IM MALIGNEN MELANOM</b>	<b>79</b>
4.2.1	ANALYSE DER BMP EXPRESSION	80
4.2.2	REGULATION DER BMP EXPRESSION	81
4.2.3	FUNKTION VON BMPs IM MELANOM	84
<b>4.3</b>	<b>EINFLUSS VON FGF-2 AUF EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON BMPs</b>	<b>95</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>100</b>

<b>5.1</b>	<b>REGULATOREN DER TGF-BETA SIGNALTRANSDUKTION</b>	<b>100</b>
<b>5.2</b>	<b>ROLLE VON <i>BONE MORPHOGENETIC PROTEINS</i></b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>120</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>122</b>
	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>123</b>

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Funktion der BMP/ TGF $\beta$  Signalkaskade bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms weiter aufgeklärt werden, um zum besseren Verständnis dieser Erkrankung beizutragen.

In normalen Melanozyten fungiert TGF $\beta$  als negativer Regulator der Proliferation. Melanomzellen hingegen zeigen, in Abhängigkeit von der Tumorprogression, zunehmende Resistenz gegenüber anti-proliferativen Effekten. Sie produzieren und sezernieren sogar selbst TGF $\beta$  1, 2 und 3, welche zur Degradation der extrazellulären Matrix, verbessertem Überleben und einem aggressiveren Phänotyp beitragen. Es war lange unklar, wie Melanomzellen den anti-proliferativen Effekten durch TGF $\beta$  entgehen können, bis Reed und Kollegen die Funktion des Ko-Repressors Ski im Melanom aufklärten (Reed et al. 2001). Ski bindet und inhibiert die Signaltransduktionsmoleküle Smad 2, 3 und 4 und verhindert dadurch, zusammen mit zusätzlichen Faktoren, die Transkription von TGF $\beta$  Zielgenen. Expressionsanalysen unserer Melanomzelllinien ergaben jedoch, dass diese Zellen kein Ski exprimieren, obwohl sie resistent gegenüber der Proliferationskontrolle durch TGF $\beta$  sind. Dieses Ergebnis veranlasste uns die TGF $\beta$  Signalkaskade genauer zu untersuchen. Es sollten die Mechanismen und potentielle neue Faktoren, die an der Inhibition der Proliferation beteiligt sind, analysiert werden.

Inaktivierende Mutationen im TGF $\beta$  Rezeptor, die eine Rolle in anderen Krebsarten spielen, konnten durch Sequenzierung ausgeschlossen werden. Es zeigte sich jedoch, dass das Ski-homologe Protein Sno von allen analysierten Melanomzellen stark exprimiert wird. Analysen ergaben, dass Sno, ebenso wie Ski, vor anti-proliferativen Einflüssen durch TGF $\beta$  schützt und als Ko-Repressor des TGF $\beta$  Signalweges im Melanom fungiert. Die Expression der beiden Ko-Repressoren Ski und Sno wird unseren Analysen zufolge durch das Protein MIA aktiviert. MIA ist an der Metastasierung von Melanomzellen beteiligt indem es die Anhaftung der Zellen an extrazelluläre Matrixkomponenten verhindert. Des weiteren induziert MIA die Expression von Melanom-assoziierten Genen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass MIA auch an der Regulation der TGF $\beta$  Signalkaskade beteiligt ist. Durch Induktion der Expression von Ski und Sno wird die Transkription von TGF $\beta$  Zielgenen verhindert und ein Schutz vor anti-proliferativen Effekten erreicht.

Die Funktion von TGF $\beta$  als autokriner Stimulator ist seit langem bekannt. Die bislang unbekannte Rolle von BMPs, Mitgliedern der TGF $\beta$  Familie, bei der Melanomentstehung und Progression sollte im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht werden. Die Expressionanalyse von BMP-2- -15 zeigte, dass ein Großteil der BMPs von Melanomzellen exprimiert wird. Umfangreiche Analysen zur Regulation der BMP-4 Expression ergaben, dass der BMP-4 Promotor negativ durch AP-2 alpha und positiv durch Ets-1 reguliert wird. Für BMP-7 lässt sich ein ähnlicher Mechanismus vermuten, der jedoch noch weiter untersucht werden muss.

Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass BMPs sowohl als autokrine Stimulatoren für die Melanomzellen selbst, als auch als parakrine Stimulatoren für Zellen der Tumorumgebung fungieren. Sie induzieren autokrin die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen, sowie deren Fähigkeit zur „vasculogenic mimicry“. Die Analyse von parakrinen Effekten beschränkte sich in dieser Arbeit auf die Endothelzellen des Tumorstromas, der Einfluss auf andere Zelltypen (Fibroblasten, Keratinozyten, Immunzellen) muss in weiteren Studien analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass sezernierte BMPs zum einen als chemoattraktive Substanzen, aber auch als Aktivatoren der Tubenbildung *in vitro* für Endothelzellen fungieren. *In vivo* Daten aus Nacktmausversuchen konnten diese Ergebnisse bestätigen. Dazu wurden Melanomzellklone, die durch antisense BMP-4 Transfektion bzw. durch Überexpression des BMP Inhibitors Chordin eine verminderte BMP Expression und Aktivität aufweisen, subkutan in Nacktmäuse injiziert. Tumore, die aus Zellen mit verminderter BMP Aktivität entstanden sind, wiesen eine verringerte Anzahl an Gefäßstrukturen auf.

Zusätzlich zur Funktionsanalyse wurden einige BMPs auf ihre Eignung als molekulare Marker untersucht. Dabei wurde BMP-7 als potentieller, neuer prognostischer Marker für rezidivfreies Überleben bei Melanompatienten identifiziert. Neben der Analyse von Expression und Funktion sollte auch das Zusammenspiel von BMPs mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 untersucht werden. FGF-2 ist ein wichtiger Faktor, der zu einem transformierten Phänotyp bei Melanozyten, zum verbesserten Überleben und zur verstärkten Proliferation bei Melanomzellen beiträgt. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass FGF-2 über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ets-1, die Expression und Aktivität von BMPs induzieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit aufgeklärt werden, dass eine neue Molekülgruppe, die *bone morphogenetic proteins*, durch autokrine und parakrine



Effekte zur Tumorprogression beitragen und damit interessante Angriffspunkte für die Tumorthherapie darstellen könnten.

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorinzidenz in Deutschland

Als „Krebs“ werden umgangssprachlich, bösartige (maligne) Tumore bezeichnet. Diese unterscheiden sich von gutartigen (benignen) Tumoren durch destruktives Wachstum und die Fähigkeit zu metastasieren.

In Deutschland erkranken jährlich etwa 218.215 Männer und 206.000 Frauen bei einem mittleren Erkrankungsalter von 69 Jahren an Krebs. Die häufigste Krebsneuerkrankung bei Männern ist das Prostatakarzinom, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs, bei den Frauen steht an erster Stelle Brustkrebs, ebenfalls gefolgt von Darm- und Lungenkrebs. Das maligne Melanom liegt bei Männern an neunter und bei Frauen an siebter Stelle der Krebsneuerkrankungen (Bertz et al. 2006).

## 1.2 Das maligne Melanom

Das Melanom macht nur 4% aller dermatologischen Krebsarten aus, ist jedoch für 80% aller Todesfälle durch Hautkrebs verantwortlich. Der Grund dafür liegt in der frühen Metastasierung und dem Fehlen von erfolgreichen Behandlungsstrategien der fortgeschrittenen Erkrankung (Miller und Mihm, Jr. 2006). Eine genaue Aufklärung der Mechanismen die für die Entstehung und Progression des Melanoms verantwortlich sind, ist unumgänglich um in der Zukunft bessere Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln.

### 1.2.1 *Definition des malignen Melanoms*

Das maligne Melanom wird auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnet. Es handelt sich dabei um einen bösartigen, invasiv wachsenden Tumor, der sich in 90% der Fälle aus Melanozyten der Epidermis entwickelt und in der Haut manifestiert ist. In selteneren Fällen entstehen Melanome aus Pigmentzellen des Auges (Uvea und Retina), der Schleimhäute und der Hirnhäute. Beim malignen Melanom handelt es sich um einen hochmalignen Tumor der schon bei geringem Tumolvolumen zur Metastasierung neigt (Hein et al. 2000; Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007).

### **1.2.2 Inzidenz und Mortalitätsrate**

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 13.700 Menschen, davon 7.700 Frauen bzw. 6.000 Männer an einem malignen Melanom. Es lässt sich dabei von Jahr zu Jahr eine steigende Tendenz an Melanomfällen beobachten, wobei sich die Anzahl der Diagnosen ‚malignes Melanom‘ seit den 70er Jahren um ein Vielfaches erhöht hat. Bei der Sterblichkeit ist jedoch keine Veränderung zu beobachten was durch eine erhöhte Aufklärung der Bevölkerung als auch durch die Sensibilisierung der Ärzteschaft zu erklären ist (Bertz et al. 2006).

In Europa nimmt Deutschland damit eine Mittelstellung ein, die meisten Erkrankungen zeigen sich in Dänemark und Schweden (16,9 bzw. 19,9 Personen aus 100.000), die geringste Rate wurde in Griechenland (3,3 Personen aus 100.000) ermittelt. Aus dieser EU Statistik lässt sich schlussfolgern, dass die Pigmentierung der Haut bei der Melanomentstehung von entscheidender Bedeutung ist und die kumulative Belastung mit UV Licht nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Melanominzidenz führt. Auch Studien aus den USA deuten darauf hin, da Kaukasier häufiger am Melanom erkranken als Personen anderer ethnischer Herkunft (Bertz et al. 2006).

Die höchste Melanominzidenz sowie auch die höchsten Mortalitätsraten sind in Neuseeland und Australien zu beobachten. Es wird angenommen, dass dieses Phänomen durch die Einwanderung von Kaukasiern in diese sonnenreichen Gegenden zustande kommt (de Gruijl 1999; Hengge und Dummer 2006; Bertz et al. 2006). Australien hat jedoch als erstes Land eine groß angelegte Präventionskampagne gestartet um die Bevölkerung für das Thema ‚malignes Melanom‘ zu sensibilisieren. Dies führt dazu dass viele Melanome in einem sehr frühen Stadium erkannt werden und somit die Mortalitätsrate im Verhältnis zur Inzidenz sinkt (Baade und Coory 2005; Bertz et al. 2006).

### **1.2.3 Klinische Einteilung der verschiedenen Melanomtypen**

Maligne Melanome werden histopathologisch in vier Haupttypen eingeteilt: superfiziell spreitendes Melanom (SSM), noduläres Melanom (NM), lentigo-maligna Melanom (LMM) und akral-lentiginöses Melanom (ALM). Am häufigsten kommt dabei das superfiziell spreitende Melanom vor, dass etwa 60% aller Melanomfälle ausmacht und hauptsächlich am Rumpf zu finden ist (Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; Hengge und Dummer 2006; Hein et al. 2000). In der Frühphase

zeichnet sich das SSM durch radiales, horizontales Wachstum in der Epidermis (*melanoma in situ*) aus. Es handelt sich dabei um bis zu 5cm große, von der gesunden Haut scharf abgegrenzte, flache Male deren Farbe von grau über rötlich bis zu braun und schwarz variieren kann. In späteren Stadien erfolgt ein Durchbruch durch die Basalmembran begleitet von vertikalem, invasivem Wachstum. Wird das SSM frühzeitig, das bedeutet noch in der horizontalen Wachstumsphase, mit geringer Tumordicke diagnostiziert, bestehen gute Heilungschancen (Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; [www.melanom.net/ssm.html](http://www.melanom.net/ssm.html)). Das noduläre Melanom tritt in etwa 20% aller Melanomfälle auf. Dabei bilden sich braune, schwarze bis blauschwarze, glatte halbkugelige zum Teil auch unregelmäßige Knoten. Die radiale Wachstumsphase fehlt beim NM meist was mit einer ungünstigen Prognose einhergeht. Das NM zeichnet sich schon in sehr frühen Stadien durch ein vertikales, invasives Wachstum aus (Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; [www.melanom.net/nm.html](http://www.melanom.net/nm.html); [www.melresproj.com/clinic/pnm](http://www.melresproj.com/clinic/pnm)). Das lentigo maligna Melanom wird in ca. 10% der Melanomfälle diagnostiziert. LMM treten meist an lichtexponierten Stellen vor allem im Gesichts- und Kopfbereich bei älteren Menschen auf. Das LMM entwickelt sich dabei aus einer Vorläuferläsion, der „lentigo maligna“ die durch chronische Lichtschädigung entsteht und meist schon jahrelang besteht. LMM manifestieren sich als bis zu 5cm große, meist unregelmäßig geformte, braune bis schwarze Male mit knotigen Bereichen die sich in Farbe und Struktur von der lentigo maligna abgrenzen. Die Prognose ist bei diesem Melanotyp günstiger als bei anderen, da erst spät ein vertikales, invasives Wachstum auftritt (Hein et al. 2000; Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; [www.melanom.net/lmm.html](http://www.melanom.net/lmm.html)). Das akral-lentiginöse Melanom entwickelt sich primär auf Handinnenflächen, Fußsohlen bzw. unter Finger- und Fußnägeln (*periungual* bzw. *subungual*) und stellt 4-5% der gesamten Melanomfälle dar. Dieser Melanotyp tritt überdurchschnittlich oft bei dunkelhäutigen Personen auf. Das ALM ist, ähnlich dem SSM, gekennzeichnet durch braune bis schwarze unregelmäßige Hautläsionen die primär radiales, horizontales Wachstum aufweisen, dass in einem späteren Stadium in eine invasive, vertikale Wachstumsphase übergeht (Hengge und Dummer 2006; Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; [www.melanom.net/alm.html](http://www.melanom.net/alm.html)).

Zusätzlich zu der klinischen Einteilung in die vier Haupttypen, SSM, NM, LMM und ALM sind Sonderformen des Melanoms bekannt: amelanotische Melanome, okkulte Melanome, okuläre Melanome und Schleimhautmelanome. Bis zu 8% aller kutanen

Melanome sind amelanotisch, das heißt der Tumor weist keine sichtbare Pigmentierung auf und erscheint hautfarben bis rötlich. Amelanotische Melanome sind schwierig zu diagnostizieren, histologische Untersuchungen können jedoch zur korrekten Diagnose führen werden aber gelegentlich auch mit anderen Tumorarten verwechselt (Adler und White, Jr. 1997). Die schwierige Diagnose führt meist auch zu einer schlechteren Prognose als bei pigmentierten Melanomen (Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007). Beim okkulten Melanom handelt es sich um Melanome bei denen Melanommetastasen diagnostiziert werden, wobei der Primärtumor unbekannt ist. Es wird vermutet, dass immunologische Mechanismen zu einer Rückbildung des Primärtumors führen (Hengge und Dummer 2006). Okuläre Melanome betreffen meist die Aderhaut, den Ciliarkörper oder die Bindehaut des Auges, wobei das Aderhautmelanom am häufigsten vorkommt. Generell sind okuläre Melanome jedoch selten mit einer Inzidenz von 6 aus 1.000.000 Personen in den USA (Kincaid 1998). Schleimhautmelanome können in Mund- und Gaumenschleimhaut sowie in der analen oder vaginalen Schleimhaut, mit einer Inzidenz von 4 aus 10.000.000 Personen (USA) auftreten. Schleimhautmelanome werden oft sehr spät diagnostiziert und gehen somit mit einer schlechten Prognose einher (Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007).

Neben den klinischen Varianten des Melanoms wurden zusätzlich histologische Varianten beschrieben, die jedoch weder ein besonderes klinisches Bild noch einen speziellen Verlauf der Erkrankung aufweisen. Dazu gehören das naevoide, das desmoplastische, das Ballonzellenartige, das spitzoide und das polypoide Melanom (Hengge und Dummer 2006; Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007).

Die Einteilung in unterschiedliche Melanomtypen, ist jedoch nur durch histopathologische Untersuchungen möglich. Eine Unterscheidung aufgrund von molekularen Charakteristiken konnte bisher nicht etabliert werden.

Um die Prognose eines Melanoms einzuschätzen und die Durchführung einer stadiengerechten Therapie einzuleiten, werden verschiedene Kriterien zur Klassifikation herangezogen. Die wichtigsten Kriterien dabei sind die Tumordicke des Primärtumors (Einteilung der Tumordicke nach Breslow), Eindringtiefe des Tumors (Einteilung nach Clark- Level), metastatischer Befall der Lymphknoten und das Vorliegen von Fernmetastasen (Volkenandt et al. 2000). Die Tumordicke nach Breslow wird an histologischen Präparaten bestimmt, dabei wird vom Stratum granulosum bis zur tiefsten gelegenen Tumorzelle gemessen (siehe Abbildung 1-1)

(Sander et al. 2000). Eine Tumordicke des Primärtumors  $\leq 0,75\text{mm}$  geht mit einer guten Prognose einher, die 10 Jahres Überlebensrate liegt bei 97%. Mit zunehmendem Breslow- Index (0,76mm- 1,5mm, 1,51mm- 4,0mm,  $> 4,0\text{mm}$ ) nimmt die 10 Jahres Überlebensrate jedoch bis auf 43% (Tumordicke  $> 4,0\text{mm}$ ) ab (Orfanos et al. 1994). Zusätzlich zur Klassifizierung der Tumordicke wird die Eindringtiefe des Tumors in die Hautschichten nach der Einteilung von Clark (Level I- V; Tabelle 1-1) begutachtet. Der Clark-Level hat jedoch nur zusätzliche Funktion, die prognostische Bedeutung ist geringer als die des Breslow- Index (Hengge und Dummer 2006). Des weiteren wird der Status der umgebenden Lymphknoten (N), in die der Primärtumor drainiert, bestimmt. Die Klassifizierung erfolgt von N0- N4. N0 bedeutet es sind keine Lymphknotenmetastasen vorhanden, bei N1- N4 sind ein bis vier oder mehr Lymphknoten von Metastasen betroffen (Hengge und Dummer 2006). Als viertes Kriterium wird der Fernmetastasen (M) Status analysiert. Die Einteilung wird dabei wie folgt durchgeführt: M0: es liegen keine Fernmetastasen vor, M1a: es liegen Metastasen der Haut, Subkutis, Lymphknoten jenseits des primären Lymphknotens vor, M1b: es bestehen Lungenmetastasen, M1c: es treten Metastasen in den übrigen Organen auf (Hengge und Dummer 2006). Die Beurteilung aller Kriterien soll letztendlich zu einer möglichst genauen Diagnose mit entsprechender Prognose und Therapie führen.

Level I	Tumorzellen nur innerhalb der Epidermis
Level II	Einzelne Tumorzellen im oberen Stratum papillare
Level II	Tumorzellen füllen das Stratum papillare aus
Level IV	Tumorzellen reichen in das Stratum reticulare
Level V	Tumorzellen reichen in die Subkutis

Tabelle 1-1: Eindringtiefe des Tumors, Einteilung nach Clark [modifiziert nach (Sander et al. 2000)]

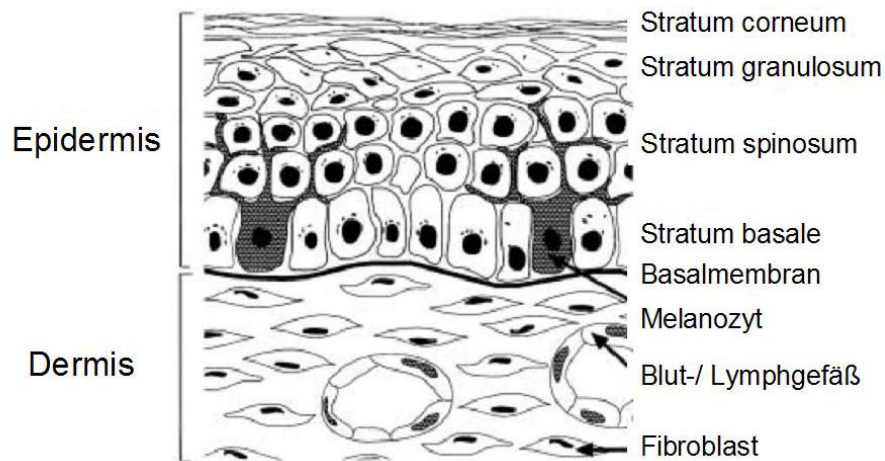


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau der Haut [modifiziert nach (Hsu et al. 2002)].

### 1.3 Modell der Melanom Entstehung und Progression

Das maligne Melanom entsteht durch die Entartung der pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten. Es wird angenommen, dass diese Entartung und Progression nach einem ähnlichen Schema abläuft, welches von Dr. Wallace Clark und Kollegen erstmals in einem fünfstufigen Modell beschrieben wurde (siehe Abbildung 1-2) (Clark, Jr. et al. 1984; Clark 1991).

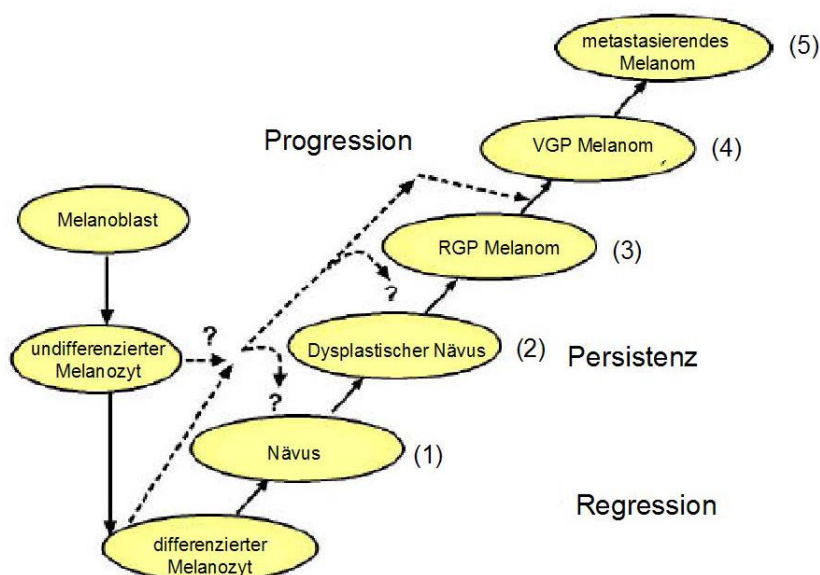


Abbildung 1-2: Modell der Melanomentstehung und Progression nach Clark et al. (Clark, Jr. et al. 1984; Meier et al. 1998) modifiziert. Die Entstehung des malignen Melanoms findet gewöhnlich in mehreren Stufen, ausgehend von differenzierten Melanozyten bzw.

verschiedenen Vorläuferläsionen, statt. RGP (radial growth phase): radiale Wachstumsphase (in der Epidermis), VGP (vertical growth phase): vertikale (invasive) Wachstumsphase

Als erste Stufe des Modells wird der gewöhnliche, angeborene (kongenitale) oder erworbene melanozytäre Nävus postuliert (1). Bei gewöhnlichen Nävi handelt es sich um benigne Läsionen die durch die Proliferation von Melanozyten entstehen. Personen mit einer großen Anzahl an gewöhnlichen Nävi (100-120) haben ein siebenfach höheres Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken als Individuen mit wenigen (0-15), obwohl es sich bei gewöhnlichen Nävi noch um benigne Hautveränderungen handelt, die nicht zwangsläufig in ein malignes Stadium übergehen. Dysplastische (atypische) Nävi (2) zeigen hingegen zytologische Atypien, unregelmäßig angeordnete Nester von Melanozyten und es wird angenommen, dass es sich bereits um Vorläuferläsionen des malignen Melanoms handelt. Atypische Nävi gelten als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Melanoms: fünf dysplastische Nävi erhöhen das Melanomrisiko um das sechsfache im Vergleich zu Personen die keine atypischen Nävi tragen. Die radiale Wachstumsphase (radial growth phase, RGP) (3) des Primärmelanoms stellt das erste maligne Stadium der Melanomentwicklung und Progression dar. Die Melanomzellen zeichnen sich durch eine geringe Differenzierung, jedoch auch durch Wachstum in der Epidermis bzw. geringe lokale Invasivität und Proliferation aus. In der vertikalen Wachstumsphase (vertical growth phase, VGP) (4) durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran, infiltrieren die Dermis und sind zum invasiven, metastatischen Wachstum befähigt. Das metastasierende Melanom (5) das sich über Blut- und Lymphgefäße im Körper ausbreiten kann, stellt die letzte Stufe dieses Progressionsmodells dar. Die Melanomentstehung erfolgt jedoch nicht zwangsläufig nach dem fünfstufigen Schema. Es ist möglich, dass einzelne Stufen der Melanomentwicklung übersprungen werden. Auch die direkte Melanomentstehung, durch maligne Transformation von normalen Melanozyten, wurde beschrieben (Miller und Mihm, Jr. 2006; Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; Xu und Koo 2006; Hsu et al. 2002; Clark, Jr. et al. 1984).



## 1.4 Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung und Progression

Tumore entstehen durch die Entartung von Normalzellen die im Laufe der Zeit multiple Gendefekte akquirieren. Bei diesen Defekten kann es sich zum einen um eine Inaktivierung von Tumor unterdrückenden Genen (Tumor-Suppressor) zum anderen um eine Aktivierung von Onkogenen handeln. An dieser Fehlregulation können verschiedenste Mechanismen beteiligt sein: Deletionen, inaktivierende Mutationen und Promotor- Hypermethylierung die zum Verlust von Tumor-Suppressoren führen, sowie aktivierende Mutationen, aktivierende Translokationen, eine verstärkte Transkription oder die Hypomethylierung von Promotorregionen die eine Überexpression von Onkogenen zur Folge haben (Polsky und Cordon-Cardo 2003). Onkogene bzw. Tumor-Suppressor Gene können zahlreiche Prozesse in der Zelle beeinflussen und dabei an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose, der Proliferation und der Motilität der Zellen beteiligt sein. Im folgenden werden Moleküle und die entsprechenden Signalwege, die eine wichtige Rolle in der Melanomentstehung und Progression spielen, kurz erörtert.

### 1.4.1 Rolle von Wachstumsfaktoren

Melanomzellen sezernieren viele Wachstumsfaktoren und Zytokine und exprimieren deren Rezeptoren in Abhängigkeit des Tumorstadiums. Diese Faktoren gewährleisten durch autokrine und parakrine Effekte das autonome Wachstum der Melanomzellen. Sowohl das Spektrum, als auch die Wirkungsweise der sezernierten Wachstumsfaktoren ist dabei stark von der Tumorprogression abhängig. Bei der Kultivierung von normalen Melanozyten wurde aufgedeckt, dass es absolut notwendig ist, Insulin oder IGF-1 (insulin-like **g**rowth **f**actor **1**),  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -**m**elanocyte **s**timulator **h**ormone), bFGF/ FGF-2 (**b**asic **f**ibroblast **g**rowth **f**actor/ **f**ibroblast **g**rowth **f**actor **2**) und TPA (12-O-tetradecanoyl-**p**horbol-13-**a**ccetat) zum Kulturmedium zuzufügen. Zellen die aus Primärmelanomen isoliert wurden benötigen nur noch Insulin oder IGF-1 als Wachstumszusatz und Zellen aus Melanommetastasen sind in der Lage alle nötigen Wachstumsfaktoren selbst zu produzieren und sind nicht mehr auf Zusätze angewiesen (Lazar-Molnar et al. 2000). Es ist auch in einigen Fällen bekannt, dass sich die Wirkungsweise eines Faktors in Abhängigkeit des Tumorstadiums ändert. Autokrine oder parakrine Inhibitoren können sich im weiter fortgeschrittenen Stadium zu autokrinen Stimulatoren wandeln, die von den Tumorzellen selbst produziert werden (z.B. Interleukin 6, transforming

growth factor  $\beta$ ) (Lazar-Molnar et al. 2000). Die wichtigsten Wachstumsfaktoren die von den Melanomzellen und der Tumorumgebung produziert werden sind in Abbildung 1-3 dargestellt.

Der wohl am besten charakterisierte Wachstumsfaktor im Melanom ist der Fibroblasten Wachstumsfaktor, **FGF-2**. Normale Melanozyten sind von exogenem FGF-2 abhängig, welcher von den umgebenden Keratinozyten sezerniert wird. Melanomzellen hingegen können FGF-2 selbst produzieren und sezernieren. Sie exprimieren dazu auch die benötigten FGF Rezeptoren auf der Zelloberfläche, so dass eine durch FGF aktivierte Ras- abhängige MAP- Kinase Signalkaskade in der Zelle ablaufen kann (siehe Kapitel 1.4.4) (Hengge und Dummer 2006; Polsky und Cordon-Cardo 2003). FGF-2 ist ein essentieller autokriner Wachstumsfaktor der unabdingbar für die autonome Proliferation von Melanomzellen ist. Halaban und Becker konnten zeigen, dass die Proliferation der Melanomzellen durch Zugabe von FGF-2 Antagonisten, inhibitorischen Antikörpern oder antisense FGF-2 mRNA *in vitro* gehemmt werden kann (Halaban et al. 1988; Becker et al. 1989). Des weiteren wurde nach Transduktion von normalen Melanozyten mit FGF-2 exprimierenden Adenoviren ein veränderter Phänotyp beschrieben. Die transduzierten Melanozyten wiesen verstärkte Proliferation und Migration, Clusterbildung und die Expression von Typ IV Kollagen auf. Dies sind alles Merkmale von Melanomen in der radialen Wachstumsphase. (Meier et al. 2003). Injiziert man FGF-2 exprimierende Melanozyten in immun-defiziente Mäuse lässt sich jedoch kein Tumorwachstum feststellen. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von FGF-2 zu einem Wachstumsvorteil führt, nicht aber zu einem komplett transformierten Phänotyp (Lazar-Molnar et al. 2000; Halaban et al. 1988; Li et al. 2003). Zusätzlich zu den autokrinen Effekten sind für FGF-2 parakrine Wirkungen auf das umgebende Tumorstroma bekannt. FGF-2 induziert die Angiogenese, Stromabildung, aktiviert die proteolytischen Enzyme, Gewebe-Typ und Urokinase Typ des Plasminogenaktivators sowie Kollagenasen (Sauter und Herlyn 1998).

Ein weiterer Wachstumsfaktor der im Melanom eine Rolle spielt ist der Platelet-derived growth factor, **PDGF**. In Melanomzellen wird sowohl PDGF A als auch PDGF B exprimiert, wohingegen normale Melanozyten kaum PDGF A und kein PDGF B produzieren. PDGF stimuliert die Proliferation der Melanomzellen, fördert die Tumorangiogenese, die Stromabildung und aktiviert Fibroblasten zur Produktion von IGF-1 (insulin-like growth factor 1) (Li et al. 2003; Lazar-Molnar et al. 2000). IGF-1

wiederum fördert das Wachstum, das Überleben und die Migrationsfähigkeit von Melanomzellen (Satyamoorthy et al. 2002).

**TGF- $\alpha$**  (transforming **g**rowth **f**actor  $\alpha$ ) wird, wie FGF-2 und PDGF, von Melanomzellen konstitutiv exprimiert, nicht jedoch von Melanozyten außer nach Stimulation mit UV-Licht. TGF- $\alpha$  weist eine hohe Homologie mit EGF (**e**pidermal **g**rowth **f**actor) auf, konkurriert um die Bindung an den EGF Rezeptor und fördert dabei die Proliferation. Weiterhin ist bekannt, dass die Expression des EGF-Rezeptors mit der Tumorprogression zunimmt. Etwa 20% der dysplastischen Nävi im Vergleich zu 80% der Melanome in der vertikalen Wachstumsphase exprimieren den EGF- Rezeptor auf der Zelloberfläche (Sauter und Herlyn 1998; Lazar-Molnar et al. 2000).

Der Wachstumsfaktor **TGF $\beta$**  (transforming **g**rowth **f**actor **beta**) spielt eine erhebliche Rolle bei der Melanomprogression und dem Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und Tumorumgebung. Es handelt sich dabei um einen Faktor der anti- proliferativ als parakriner Inhibitor auf normale Melanozyten, jedoch als autokriner Stimulator auf Melanomzellen wirkt. Die genaue Wirkungsweise in Abhängigkeit von Tumorstadium und Tumorumgebung und die Auswirkung auf andere Prozesse in der Zelle wird in Kapitel 1.5.1 ausführlich thematisiert.

Neben den Wachstumsfaktoren sind auch noch eine Reihe von Zytokinen an dem komplexen Zusammenspiel zwischen Melanomzellen und Tumorumgebung beteiligt, vor allem Interleukine spielen eine wichtige Rolle.

**Interleukin 6** (IL-6) ist ein Zytokin mit zweifacher Funktionsweise. Interleukin 6 wird von Fibroblasten sezerniert und wirkt anti- proliferativ auf normale Melanozyten und Melanomzellen im frühen Stadium. Melanomzellen die aus späteren Stadien oder aus Metastasen isoliert wurden sind nicht nur resistent gegenüber den anti-proliferativen Effekten von IL-6, sondern es wirkt nun als autokriner Wachstumsstimulator (Lazar-Molnar et al. 2000).

**Interleukin 10** (IL-10) wirkt als autokriner Wachstumsfaktor und stimuliert die Proliferation von Melanomzellen. Zusätzlich kann von Melanomzellen produziertes IL-10 die T- Zellantwort supprimieren und somit den Tumor vor Angriffen des Immunsystems schützen (Lazar-Molnar et al. 2000).

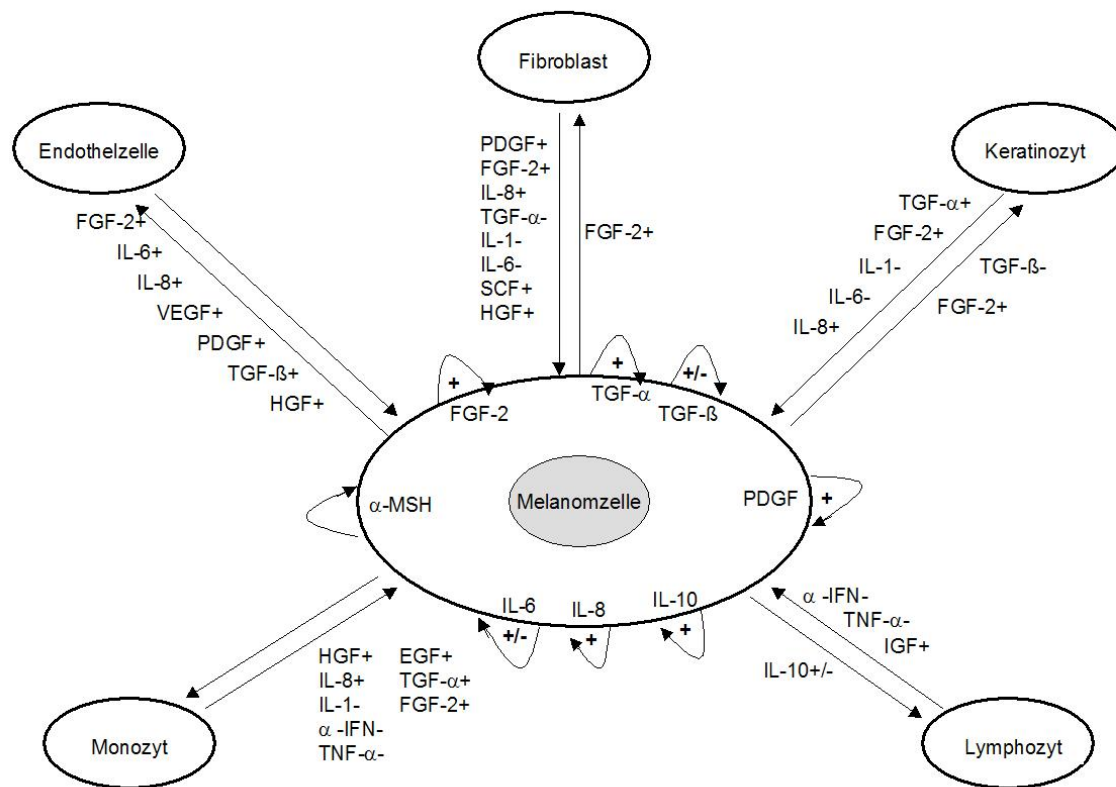


Abbildung 1-3: Autokrine und parakrine Effekte von Wachstumsfaktoren auf die Melanomzellen selbst und die Tumorumgebung (Abbildung modifiziert aus (Lazar-Molnar et al. 2000))

#### 1.4.2 Rolle von Transkriptionsfaktoren

Die Kontrolle der Genexpression auf Ebene der Transkription, stellt ein wesentliches Element dar, um Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose zu regulieren. In der Krebsentstehung und Progression kommt den Transkriptionsfaktoren dabei eine wichtige Rolle zu. Eine anormale Transkriptionsaktivität führt zu einer modifizierten Genexpression, die letztendlich die Ausprägung eines veränderten, möglicherweise malignen Zelltyps zur Folge hat. Im Melanom wurden dabei verschiedenste Transkriptionsfaktoren identifiziert, deren Fehlregulation eine Rolle in der Tumorentstehung und Progression spielt. Einige dieser Faktoren werden nun näher charakterisiert.

Die Familie der **AP-2** (activating enhancer binding protein 2) Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf verschiedenen Mitgliedern: AP-2 alpha, beta, gamma, delta und epsilon, im Melanom wurde dabei bisher fast ausschließlich die Funktion von AP-2

alpha analysiert. AP-2 bindet als Dimer an die DNA Bindesequenz 5'-GCCNNNGGC-3' und kann dort die Transkription von Zielgenen aktivieren oder reprimieren. AP-2 ist an der Steuerung der Genexpression, sowohl während der embryonalen Morphogenese als auch bei der Differenzierung von adulten Zellen beteiligt. Während der Embryogenese spielt AP-2 vor allem eine Rolle bei der Entstehung von Neuralleistenzellen, von welchen auch Melanozyten abstammen (Huang et al. 1998; Bar-Eli 2001).

Die Expression von AP-2 geht im Laufe der Melanomprogression verloren und Versuche im Nacktmausmodell lassen eine Tumor suppressierende Funktion vermuten. Zellen aus Melanommetastasen exprimieren kein AP-2. Injiziert man diese Zellen subkutan in Nacktmäuse, entwickeln sich nach wenigen Wochen Tumore. Zellen in denen AP-2 re-exprimiert wurde, konnten hingegen keine oder nur sehr viel kleinere Tumore bilden (Huang et al. 1998). Injiziert man die Melanomzellen intravenös, lassen sich bei der parentalen Zelllinie Lungenmetastasen in den Mäusen nachweisen. Die AP-2 re-exprimierenden Zellen zeigten im Vergleich dazu keine bzw. nur vereinzelte Metastasen (Jean et al. 1998).

Diese Tumor-Suppressorfunktion zeigt sich auch in der Regulation von AP-2 Zielgenen. AP-2 fungiert als positiver Regulator von c-KIT (stem cell factor receptor) und wirkt dabei als Transaktivator. Es wurde gezeigt, dass die AP-2 Expression im fortgeschrittenen Stadium des Melanoms verloren geht und dass dieser AP-2 Verlust zu einer verminderten Expression von c-KIT führt. Melanomzellen verlieren dadurch ihre Sensitivität gegenüber KIT Ligand/ SCF (stem cell factor) induzierter Apoptose und es entsteht ein Zelltyp der eine verstärkte Malignität aufweist (Huang et al. 1998). Im Gegensatz dazu wurde AP-2 als negativer Regulator für MCAM (melanoma cell adhesion molecule) identifiziert. Der Verlust von AP-2 ist für eine verstärkte MCAM Expression in fortgeschrittenen Primärmelanomen und Melanommetastasen verantwortlich (Jean et al. 1998). Neben der Regulation von c-KIT und MCAM ist AP-2 an der Transkription von vielen anderen Genen beteiligt, die in unterschiedliche zelluläre Prozesse eingreifen und die eine Rolle in der Melanomprogression spielen. Weitere Zielgene von AP-2 sind das Zell- Zell- Adhäsionsmolekül E-Cadherin, die Matrixmetalloproteinase 2, der Zellzyklusregulator p21<sup>WAF1</sup>, Bcl-2 (B-cell CLL/ Lymphoma 2) beteiligt an der Apoptose, der IGF (insulin growth factor) Rezeptor 1, VEGF (vascular endothelial growth factor) und der Thrombin Rezeptor PAR-1 (protease-activated receptor 1) (Bar-Eli 2001).

Die Familie der **Ets** Transkriptionsfaktoren enthält etwa 30 Mitglieder, zum Beispiel Ets-1, Ets-2, Erg, Elf-1, Elk-1, Fli-1 und PEA3, die alle eine hoch homologe Ets-Domäne enthalten, die spezifisch an die DNA Sequenz 5'-GGAA/T-3' bindet. Die meisten Ets Faktoren werden durch Ras- MAP Kinase abhängige Phosphorylierung aktiviert (Oikawa 2004). Im malignen Melanom spielt vor allem der Faktor Ets-1 eine wichtige Rolle. Wir konnten zeigen, dass in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten eine verstärkte Ets-1 Expression und Aktivität vorliegt. Ets-1 aktiviert dabei die Transkription einer Reihe von Genen die an der Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt sind, wie Matrixmetalloproteinase (MMP) 1, 3, 7 und 9, Integrin beta 3 und den Urokinase-Typ des Plasminogenaktivators (uPA) (Oikawa 2004; Rothhammer et al. 2004). Weiterhin spielt Ets-1 eine wichtige Rolle in der Tumorigenese. Die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2, die von Melanomen sezerniert werden können, induzieren die Ets-1 Expression in Endothelien was zu einer vermehrten Degradation der umgebenden extrazellulären Matrix durch MMPs und uPA führt und somit die Migration der Endothelzellen in Richtung des Tumors erleichtert (Oikawa 2004).

Bei **MITF** (**m**icrophthalmia-associated **t**ranscription **f**actor) handelt es sich um „basic helix-loop-helix Leucin Zipper“ Transkriptionsfaktoren, die als Dimer an die Sequenz 5'-CATGTG-3' binden. Die Familie der **MITF** Transkriptionsfaktoren ist notwendig für das Überleben und die Differenzierung von ausgereiften Pigmentzellen, den Melanozyten. Es sind verschiedene Isoformen von MITF bekannt (MITF-A, MITF-B, MITF-D, MITF-H, MITF-M), wobei vor allem MITF-M eine Rolle in der Melanozytenentwicklung spielt (Levy et al. 2006; Steingrimsson et al. 2004). Gezielte Mutationen von MITF in Mäusen haben Taubheit und fehlende Pigmentierung von Augen und Haut zur Folge (Levy et al. 2006). Beim Menschen führen Mutationen im MITF Genlokus zum Waardenburg Syndrom. Dieses Syndrom wird durch ein Defizit an funktionsfähigen Melanozyten hervorgerufen, was zu Pigmentierungsstörungen und Gehörschädigungen führt. Das Waardenburg Syndrom kann jedoch auch durch Mutationen in Genen hervorgerufen werden, die an der Transkription von MITF beteiligt sind. Dabei wurden Mutationen im PAX 3 (**p**aired **b**ox **g**ene **3**) und SOX10 (**s**ex-determining region **Y**-**b**ox **10**) Gen beschrieben. Neben PAX3 und SOX10 sind CREB (**c**AMP-responsive **e**lement **b**inding protein), LEF1 (**l**ymphoid **e**nhancer-binding **f**actor **1**), ONECUT-2 (**o**ne **c**ut domain **2**) und MITF selbst an der Regulation der MITF Transkription beteiligt (Vance und Goding 2004; Levy et al. 2006). Die

Wichtigkeit von MITF für das Überleben und die Differenzierung von Melanozyten ist unumstritten. Die Rolle von MITF in der Melanomentstehung und –progression, konnte hingegen noch nicht klar definiert werden. Einige Studien deuten darauf hin, dass MITF als Onkogen im Melanom fungiert. MITF Amplifikationen wurden in 10-20% der Melanome, mit einem erhöhten Vorkommen in späteren Stadien, festgestellt. Die Überexpression von MITF, zusammen mit zusätzlichen Onkogenen, ermöglichte es normalen Melanozyten Kolonien in Agar auszubilden was in Versuchen ohne MITF nicht möglich war (Levy et al. 2006). Weiterhin reguliert MITF die Expression von Bcl-2 (**B**-cell CLL/ lymphoma **2**), was zu einem verbesserten Überleben von Melanomzellen führt (McGill et al. 2002). Andere Studien hingegen zeigen, dass die MITF Expression in weiter fortgeschrittenen Melanomstadien verloren geht. Es wird spekuliert, dass die daraus folgende verminderte Pigmentierung einen Wachstumsvorteil für die Melanomzellen darstellt. Eine Erklärung für die unterschiedlichen MITF Effekte könnte sein, dass MITF unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Melanom-Subtypen hat (Levy et al. 2006).

Ein Transkriptionsfaktor der sehr viele Gene und Funktionen im Melanom regulieren kann ist **NFkB** (nuclear factor of **kappa** light chain gene enhancer in **B**-cells). NFkB ist ubiquitär exprimiert und kann sehr schnell durch verschiedenste Stimuli aktiviert werden. Diese Stimuli reichen von der Aktivierung durch Bakterien, Viren und deren Stoffwechselprodukte, über inflammatorische Zytokine (TNF alpha, Interleukine), oxidativen Stress, physikalischen Stress (UV-Licht) bis zum Stimulus durch Medikamente (Baeuerle und Henkel 1994). Es existieren fünf NFkB Untereinheiten, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 und p52/p100. Diese Untereinheiten besitzen alle N-terminal eine 300 Aminosäuren lange Rel- Homologie Domäne, die für die DNA Bindung, die Bindung des NFkB Inhibitors IkappaB und die Dimerisierung der Untereinheiten zuständig ist. Der aktive Transkriptionsfaktor liegt als Homo- oder Heterodimer vor, wobei die Kombination aus p50/p65 in Säugetieren am häufigsten ist. Das p50/p65 Heterodimer bindet mit hoher Affinität an die DNA-Bindesequenz 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' (Pu: Purin, Py: Pyrimidin) und aktiviert die Transkription von einer Fülle von Zielgenen die im Schutz vor Apoptose, bei der Angiogenese und Proliferation eine Rolle spielen (Amiri und Richmond 2005; Baeuerle und Henkel 1994; Karin et al. 2002). Im malignen Melanom liegt eine konstitutive Aktivierung von NFkB vor, die zum Beispiel zu einer Expressionssteigerung von anti-apoptotischen

Proteinen wie TRAF 1 und 2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor), IAP 1 und 2 (inhibitor of apoptosis), ML-IAP (melanoma IAP), Survivin und Bcl-2 ähnlichen Proteinen führt. Für Survivin und ML-IAP wurde gezeigt, dass die Expression mit der Melanomprogression zunimmt. NFkB kann auch die Expression von Cyclin D1 modulieren, ein wichtiges Molekül in der Regulation des Zellzyklus (siehe auch Kapitel 1.4.3) und somit die Proliferation initiieren. Weiterhin wirkt NFkB als Mediator zwischen Melanomzellen und dem Tumorgefäßsystem, da es die Expression von pro-angiogenetischen Genen wie VEGF (vascular endothelial growth factor), Interleukin 1, CXCL 1 (chemokine, CXC motif ligand 1) und 8 (chemokine, CXC motif ligand 8, Interleukin 8) und TNF (tumor necrosis factor) aktiviert. Auch Mediatoren der Invasivität und Metastasierung des Melanoms werden durch NFkB aktiviert. Es wurde gezeigt, dass N-Cadherin (neuronal cadherin), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1) und Matrixmetalloproteinasen Zielgene von NFkB sind (Amiri und Richmond 2005; Kuphal und Bosserhoff 2006).

**Snail** ist ein Transkriptionsfaktor der am epithelialen zum mesenchymalen Übergang während der Embryogenese beteiligt ist. Dieser Vorgang kann auch bei der Entwicklung von Normalzellen zu Krebszellen eine Rolle spielen und geht mit der Ausbildung eines invasiven Tumortyps einher. Snail besitzt fünf Zinkfinger Motive, über die er spezifisch an die DNA Sequenz 5'-CANNTG-3' bindet (Cano et al. 2000; Poser und Bosserhoff 2004). Im malignen Melanom wurde eine starke Snail Expression im Vergleich zu normalen Melanozyten beschrieben, die kein Snail exprimieren. Snail bindet und reprimiert dabei den E-Cadherin Promotor, wodurch das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin im Melanom verloren geht. Transfektion von Melanomzellen mit anti-sense Snail Konstrukten induzierte eine Re-expression von E-Cadherin (Poser et al. 2001). Neben E-Cadherin kann Snail noch weitere Gene wie die Matrixmetalloproteinase 2, EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteins), TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1), Gewebe-Typ des Plasminogenaktivators, RhoA (Rho GTPase) und Notch 4, alles Gene die am epithelialen zum mesenchymalen Übergang beteiligt sind, im Melanom regulieren (Kuphal et al. 2005).



### 1.4.3 Rolle des Zellzyklus

Als Zellzyklus wird der zyklische Ablauf von Interphase und Mitose während der Zellteilung bezeichnet. Dieser Zyklus ist in mehrere Stufen aufgegliedert: die Mitose (M) und die Interphase, welche sich in drei Abschnitte [(G1- (Gap) Phase, S- (Synthese) Phase, G2- (Gap) Phase] aufteilt. Neben der aktiven Proliferation und dem damit verbundenen Durchlaufen des Zellzyklus können Zellen ausgehend von der G1-Phase in eine ruhende Phase, die G0-Phase eintreten. Aus diesem Stadium kehren die Zellen bei geeigneten externen regulatorischen Stimuli wieder in die G1-Phase zurück und der Zellzyklus wird erneut durchlaufen oder sie gehen in eine terminale Differenzierungsphase über, in der eine Zellteilung nicht mehr möglich ist (Abbildung 1-4) (Royer et al. 1999; Wagener 1999).

Die Transition der Zellen durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (**cyclin dependent kinases**, CDK) gesteuert. CDKs können in Assoziation mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, aktiv in den Verlauf des Zellzyklus eingreifen. Zusätzlich existieren Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus unterbrochen werden kann. Am G1/S Kontrollpunkt muss gewährleistet sein, dass die DNA intakt ist und sämtliche Faktoren für die fehlerfreie Synthese vorhanden sind um in die S-Phase einzutreten. Der zweite Kontrollpunkt am Übergang von G2 in die M-Phase soll verhindern, dass die Mitose beginnt bevor die DNA Synthese abgeschlossen ist bzw. dass nach erfolgreicher DNA Synthese der Zellzyklus zur M-Phase fortschreitet. Der Spindel-Kontrollpunkt kontrolliert letztendlich die korrekte Anordnung der Chromosomen im Spindelapparat. Die jeweiligen Cycline, CDKs und die Kontrollpunkte in den einzelnen Abschnitten des Zyklus sind in Abbildung 1-4 dargestellt (Wagener 1999).

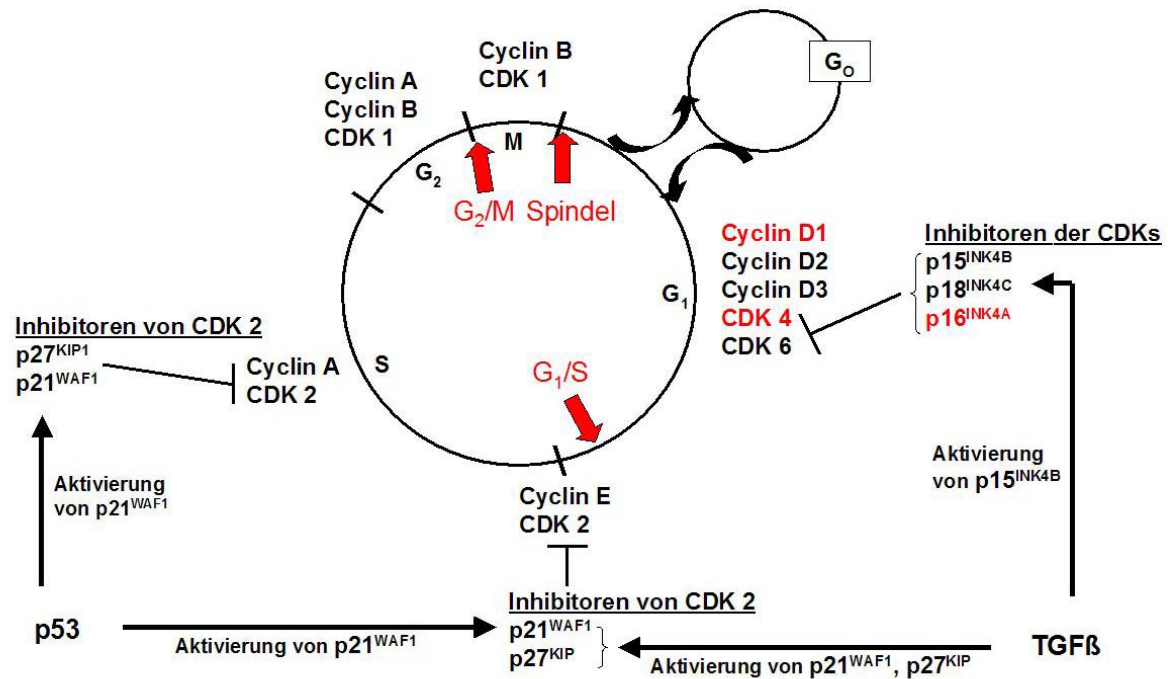


Abbildung 1-4: Aktivität von Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (CDK Inhibitoren) während des Zellzyklus [Zusammenstellung aus (Wagener 1999; Li et al. 2006; Royer et al. 1999; Pardali et al. 2000)]

Um die Aktivität der CDK- Cyclin- Komplexe zu modulieren werden zusätzlich Inhibitoren der CDK-Cyclin Komplexe benötigt, die durch externe oder interne Stimuli aktiviert werden und den Zellzyklus regulieren. Die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 und deren Komplexe mit Cyclinen werden durch die Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (cyclin-dependent kinase inhibitors) p15<sup>INK4B</sup> (p15 inhibitor of CDK4B), p16<sup>INK4A</sup> (p16 inhibitor of CDK4A) und p18<sup>INK4C</sup> (p18 inhibitor of CDK4C) inhibiert (Royer et al. 1999). Die Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren p21<sup>WAF1</sup> (p21 wildtype p53 activated fragment) und p27<sup>KIP1</sup> hingegen inhibieren hauptsächlich CDK2 bzw. CDK2- Cyclin Komplexe, können aber auch andere Cyclin-abhängige Kinasen regulieren (Giono und Manfredi 2006).

In normalen Zellen wird der Ablauf des Zellzyklus durch äußere Faktoren bestimmt. Abhängig von den vorhandenen Nährstoffen, Wachstumsfaktoren oder auch dem Kontakt zu Nachbarzellen wird der Übergang von der G<sub>1</sub> in die S-Phase initiiert oder verhindert. Sobald die Zelle in die S-Phase eingetreten ist, kann der Ablauf nicht mehr gestoppt werden. In Tumorzellen kann diese strenge Kontrolle des Zellzyklus jedoch verloren gehen. Dies führt letztendlich zu einer Zunahme der Zellzahl durch unkontrollierte Proliferation.

Nicht entartete Zellen unterliegen der Zellzykluskontrolle ausgehend von einem extrazellulären Stimulus durch TGF $\beta$  (**T**ransforming **g**rowth **f**actor  **$\beta$** ), gefolgt von der Aktivierung des CDK Inhibitors p21<sup>WAF1</sup>. Die TGF $\beta$  Liganden binden dabei an Serin-Threonin- Kinase Rezeptoren welche die Signale ins Zellinnere an Smad (zusammengesetzt aus sma: **s**mall **b**ody **s**ize und Mad: **m**others **a**gainst **d**ecapentaplegic) Moleküle weiterleiten. Diese Smad Moleküle binden zusammen mit Sp-1 (**s**pecificity **p**rotein **1**, transcription factor Sp-1) als Ko-faktor an den p21<sup>WAF1</sup> Promoter und aktivieren damit dessen Expression. Des weiteren können auch die Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren p15<sup>INK4B</sup> und p27<sup>KIP1</sup> durch extrazelluläre Stimuli mit TGF $\beta$  reguliert werden (Pardali et al. 2000). Im malignen Melanom jedoch konnte gezeigt werden, dass ein TGF $\beta$  Stimulus nicht zu einem Arrest des Zellzyklus führt. Melanome exprimieren den spezifischen Smad- Inhibitor Ski, welcher an die Smad Moleküle bindet, die Transkription von p21<sup>WAF1</sup> verhindert und somit einer Zellzykluskontrolle durch p21<sup>WAF1</sup> entgegen wirkt (siehe auch Kapitel 1.5.1) (Medrano 2003).

Des weiteren kann p21<sup>WAF1</sup> direkt von dem Tumorsuppressor p53 aktiviert werden, welcher nach DNA Schäden einen Stop des Zellzyklus im G1/S-Phase Kontrollpunkt initiiert, um der Zelle Zeit für die Reparatur von DNA Schäden zu schaffen und die genomische Stabilität zu erhalten (Giono und Manfredi 2006).

Viele Tumore weisen Mutationen im Tumor-Suppressor-Gen p53 auf, welche zu einem Funktionsverlust führen. Dies hat zur Folge, dass der Zellzyklus auch bei geschädigter DNA nicht an dem Übertritt in die S- Phase blockiert wird (Wagener 1999). Im Melanom scheint die Fehlregulation von p53 jedoch kein häufiges Ereignis zu sein, einige Studien beschreiben Mutationen in 1% bis 30% der Primärmelanome und Metastasen, wohingegen andere Forschergruppen keine Mutationen finden konnten (Li et al. 2006). Mutationen im p53 Gen sind jedoch nicht die einzigen Auslöser für eine fehlregulierte p53-Signalkaskade. Mutationen, Deletionen und Inaktivierung des CDK Inhibitors p14<sup>ARF</sup> durch Promotor-Methylierung können ebenfalls einen Verlust der Zellzykluskontrolle nach sich ziehen. Es ist bekannt, dass nach DNA Schäden der CDK Inhibitor p14<sup>ARF</sup> den negativen Regulator von p53, HDM2 (**h**uman **d**ouble **m**inute **2**) bindet, wodurch eine Assoziation von HDM2 mit p53 verhindert wird, die zu einem proteasomalen Abbau von p53 führen würde. P53 wird dabei stabilisiert und ein p53 abhängiger Arrest des Zellzyklus findet statt (Miller und Mihm, Jr. 2006). Bei Personen mit einer familiären Häufung von Melanomfällen

konnten Mutationen im p14<sup>ARF</sup> Gen gefunden werden die zu einem Funktionsverlust führen. Dies bedeutet, dass p14<sup>ARF</sup> nicht mehr an HDM2 bindet und in Folge dessen p53 ständig dem proteasomalen Abbau unterliegt, was letztendlich zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle führt. Mutationen bei denen nur das p14<sup>ARF</sup> Gen unabhängig von p16<sup>INK4</sup> betroffen ist sind jedoch im Melanom sehr selten (Harland et al. 2005).

Eine weitere Möglichkeit den G1/ S-Übergang des Zellzyklus zu verhindern ist durch die Inhibitoren des „Retinoblastom- Weges“ (p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup> und p18<sup>INK4C</sup>) gegeben (Shapiro 2006; Wagener 1999). Das Retinoblastom-Protein (RB) kann abhängig von seinem Phosphorylierungs- Status den Übergang in die S- Phase verhindern oder ermöglichen. RB bindet im unter-phosphorylierten Zustand an die Transaktivierungsdomäne des E2F Transkriptionsfaktors und inhibiert dabei die Transkription von E2F Zielgenen die für das Fortschreiten in die S- Phase benötigt werden. Aufgrund von extrazellulären physiologischen Signalen wird die Phosphorylierung von RB über CDK4- Cyclin D und CDK2- Cyclin E Komplexe aktiviert. Das phosphorylierte RB Protein bindet nicht mehr an die Transaktivierungsdomäne von E2F, der Transkriptionsfaktor wird freigesetzt und kann die Transkription von Genen aktivieren, die für die S-Phase benötigt werden (Shapiro 2006; Giacinti und Giordano 2006). Wird jedoch zum Beispiel der CDK Inhibitor p16<sup>INK4A</sup> exprimiert, findet keine CDK- abhängige Phosphorylierung des RB Proteins statt und der Zellzyklus wird in der G1- Phase arretiert (Sharpless und Chin 2003). p16<sup>INK4A</sup>, sowie das alternative Splice- Produkt des gleichen Genlokus p14<sup>ARF</sup> liegen auf dem chromosomalen Abschnitt 9p21, welcher in verschiedenen Krebsarten, einschließlich dem malignen Melanom oft deletiert ist (Sharpless und Chin 2003). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Expression von p16<sup>INK4A</sup> in etwa 20% der analysierten kutanen Melanome in der vertikalen Wachstumsphase durch Promotor- Methylierung inaktiviert wurde (Straume et al. 2002; Bogenrieder et al. 1998). Mutationen im p16<sup>INK4A</sup> Gen wurden auch in 20-40% der familiär auftretenden Melanome identifiziert (Pho et al. 2006). Der Verlust von p16<sup>INK4A</sup> führt letztendlich dazu, dass der Zellzyklus am Kontrollpunkt des G1/ S- Phase Überganges nicht mehr reguliert werden kann. (Pho et al. 2006; Polsky und Cordon-Cardo 2003). Ein zusätzlicher Mechanismus der zum Verlust der Zellzykluskontrolle beiträgt wurde in Akral-lentiginösen Melanomen (ALM, siehe Kapitel 1.2.3) beschrieben. Dabei zeigte sich eine Amplifikation des Cyclin D1 Genes in 44% der

ALM wodurch das RB Protein verstärkt phosphoryliert wird und der Zellzyklus fortschreitet (Polsky und Cordon-Cardo 2003).

#### 1.4.4 Rolle der Ras/Raf/Mek/Erk-Signalkaskade

Der MAPK Signalweg (mitogen-activated protein kinase) ist einer der bedeutendsten Signalwege in der Zelle und reguliert Prozesse wie Proliferation, Zellüberleben, Wachstum und Invasivität. Die Signaltransduktion läuft wie in Abbildung 1-5 dargestellt ab.

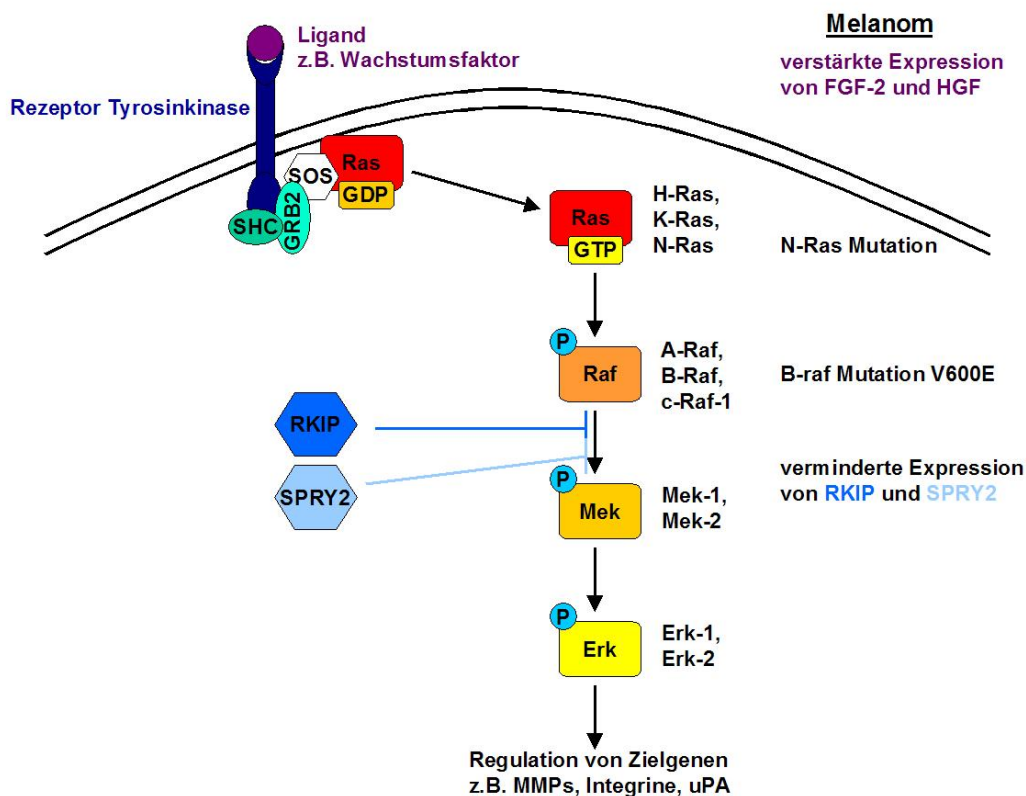


Abbildung 1-5: **Ras, Raf, Mek, Erk Signalweg im Melanom nach Panka et al., 2006.** SHC: **S**rc **h**omology 2 containing transforming protein, SOS: **s**on of **s**evenless, GRB2: **g**rowth factor receptor-**b**ound protein 2, RKIP: **R**af **k**inase inhibitor **p**rotein, SPRY2: **S**prouty 2

Die Bindung eines Liganden an die Rezeptor Tyrosinkinase führt zu einer Änderung der Aktivität der Ras-GTPasen (H-Ras, K-Ras, N-Ras). Dabei wird die inaktive Ras-GDP Form zur aktiven Ras-GTP Form umgewandelt, die jetzt die nachfolgende Raf-Kinase (A-Raf, B-Raf, c-Raf-1) durch Phosphorylierung aktivieren kann. Die Raf-Kinase phosphoryliert und aktiviert wiederum die Mek-Kinasen (Mek 1 und 2) und

diese dann die Erk-Kinasen (Erk 1 und 2), bis letztendlich die Aktivierung von Zielgenen erfolgt (Smalley 2003).

In ruhenden Melanozyten läßt sich keine aktive MAPK Signalkaskade nachweisen, sie kann jedoch durch extrazelluläre Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren) aktiviert werden und Prozesse der Differenzierung und des Wachstums in Gang setzen (Tada et al. 2002). Im malignen Melanom hingegen ist dieser Signalweg durch verschiedenste Mutationen oder Expressionsveränderungen konstitutiv aktiv (Panka et al. 2006). 60-66% aller kutanen Melanome weisen eine Mutation im B-Raf Gen auf. Es handelt sich dabei um die Transition einer einzelnen Base (T→A) in der Kinase Domäne von B-Raf was einen Aminosäureaustausch zur Folge hat (Glutamat statt Valin, V600E) und zu einer konstitutiv aktiven B-Raf Kinase führt. Diese Mutation wurde jedoch auch in einer Vielzahl von benignen Nävi detektiert und es wird angenommen, dass diese Mutation alleine nicht zu einer malignen Entartung der Zellen führen kann (Panka et al. 2006; Smalley 2003). Nicht alle Melanome besitzen eine B-Raf Mutation, 10-15% weisen hingegen eine N-Ras Mutation auf, die ebenfalls einen konstitutiv aktiven MAPK Signalweg zur Folge hat. Neben den aktivierenden Mutationen werden noch andere Möglichkeiten zur konstitutiven Aktivierung dieser Signalkaskade diskutiert. Eine ständige Produktion und Sekretion von Wachstumsfaktoren wie FGF-2 (**f**ibroblast **g**rowth **f**actor **2**) und HGF (**h**epatocyte **g**rowth **f**actor) führt zu einer stetigen Aktivierung der Rezeptor Tyrosinkinasen und somit des gesamten MAPK Signalweges. Zusätzlich zu dieser stetigen Aktivierung ist die Expression von negativen Regulatoren des MAPK Signalweges, wie RKIP (**R**af-1 **k**inase **i**nhibitory **p**rotein) und SPRY2 (**S**prouty **2**), im Melanom vermindert, wodurch ein weiterer negativer Kontrollmechanismus in dieser Signalkaskade fehlt (Panka et al. 2006).

Eine konstitutiv aktive MAPK Signalkaskade führt zur ständigen Aktivierung von z.B. Ets Transkriptionsfaktoren. Ets Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Genen die an Proliferation und Zellzyklusregulation (c-Myc, JunB, Cyclin abhängige Kinase 1, Cyclin D1), Invasion und Metastasierung (Matrixmetalloproteinase 1, 3, 7, 9, Urokinase Typ des Plasminogenaktivators) beteiligt sind (siehe auch Kapitel 1.4.2) (Oikawa 2004). Eine dauernde Aktivierung von Ets führt zu einer Überexpression dieser Gene und hat einen hoch proliferativen und invasiven Phänotyp der Melanomzellen zur Folge. Des weiteren wurde gezeigt, dass Zellen mit einer konstitutiv aktiven MAPK Signalkaskade, einen Schutz vor Apoptose erlangen. Bad

(Bcl-2 antagonist of cell death), ein pro-apoptotisches Protein wird durch RSK (ribosomal protein S6 kinase, 90kDa), einem Zielmolekül der MAPK Signalkaskade, phosphoryliert und inaktiviert. Die Inaktivierung von Bad führt dazu, dass in Melanomzellen die Apoptose-Kaskade nicht mehr ausgelöst werden kann und die Zellen somit einen Überlebensvorteil erlangen. Inhibiert man den MAPK Signalweg und damit die Phosphorylierung von Bad durch RSK, werden die Zellen sensitiv gegenüber Apoptose induzierenden Reagenzien (Eisenmann et al. 2003).

#### **1.4.5 Rolle von MIA (melanoma inhibitory activity)**

Melanoma inhibitory activity (MIA) ist ein 11 kDa großes Protein, dass als 131 Aminosäuren Vorläufermolekül synthetisiert und als reifes 107 Aminosäuren langes Protein in den extrazellulären Raum sezerniert wird. NMR (nuclear magnetic resonance) Analysen konnten zeigen, dass die dreidimensionale Struktur von MIA eine SH3- Domäne ähnliche Faltung, mit zwei zusätzlichen Disulfidbrücken zur Stabilisierung, aufweist. In vielen intrazellulären Signalmolekülen ist die SH3-Domäne ein bekanntes Strukturmotiv, MIA ist jedoch das erste extrazelluläre Protein das diese Struktur besitzt (Bosserhoff 2005). Erste Untersuchungen der Funktion von MIA ergaben, dass es die Proliferation von Melanomzellen *in vitro* hemmt. Spätere Analysen hingegen zeigten, dass MIA keine Melanom-inhibierende Funktion besitzt, sondern im Gegenteil dazu die Anhaftung von Zellen an extrazelluläre Matrixkomponenten verhindert. Diese verminderte Anhaftung führt zu einer verstärkten Invasivität und Metastasierung *in vivo*. Die Beobachtung der wachstumshemmenden Wirkung *in vitro* stammt daher, dass MIA die Zellanhaftung in den Zellkulturgefäßen und damit auch das Zellwachstum verhindert (Bosserhoff 2005).

Normale Melanozyten exprimieren kein MIA. Im malignen Melanom erfolgt jedoch eine Induktion der Expression in Korrelation mit der Tumorprogression. Weiterhin dient die Expressionsstärke von MIA im Serum von Melanompatienten als verlässlicher Marker um die Metastasierung zu detektieren und zu überwachen (Bosserhoff et al. 1997).

*In vitro* Analysen von Melanomzellen ergaben, dass MIA nicht nur einen Einfluss auf die Anhaftung an die extrazelluläre Matrix, sondern auch auf die Zellmorphologie und die Regulation von Melanom-assoziierten Genen hat. Zellen die durch antisense Transfektion kein MIA mehr exprimieren weisen wieder Zell-Zell Kontakte,

dendritische Zellausläufer, verstärkte E-Cadherin und Verlust der N-Cadherin Expression, ähnlich den normalen Melanozyten auf (Tatzel et al. 2005). Die Analyse von Melanom-assoziierten Genen in MIA defizienten Zellklonen im Vergleich zur parentalen Zelllinie ergab eine reduzierte Expression von MT1-MMP (**m**embrane-**t**ype **m**atrix **m**etalloproteinase 1), Integrin  $\beta 3$ , t-PA (**t**issue-type **p**lasminogen **a**ctivator) und SPARC (**s**ecreted **p**rotein **a**cidic and **r**ich in **c**ystein) (Poser et al. 2004). Diese Veränderungen in Abhängigkeit der MIA Expression deuten auf eine wichtige Rolle von MIA in der Entstehung und Progression eines malignen Zelltyps hin.

### 1.5 BMP und TGF-beta Signalkaskade

BMPs (**b**one **m**orphogenetic **p**roteins) und TGF $\beta$  (**t**ransforming **g**rowth **f**actor **b**eta) werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit der TGF $\beta$  Superfamilie zugeordnet. Mitglieder der TGF $\beta$  Superfamilie binden an transmembrane Serin/ Threonin Kinase Rezeptoren, wobei jeweils ein Typ I und ein Typ II Rezeptor einen Komplex bilden. Bisher wurden in Säugetieren sieben Typ I und fünf Typ II Rezeptoren identifiziert. Die einzelnen Rezeptortypen und die Liganden die spezifisch an den jeweiligen Rezeptor binden sind in Tabelle 1-2 aufgelistet (Balemans und Van Hul 2002). Nach Bindung des Liganden kommt es zu einer Transphosphorylierung des Typ I Rezeptors durch die Kinasedomäne des Typ II Rezeptors. Der aktivierte Typ I Rezeptor phosphoryliert und aktiviert daraufhin intrazelluläre, signalweiterleitende Rezeptor-regulierte Smad [zusammengesetzt aus Sma (**s**mall **b**ody **s**ize) und Mad (**m**others **a**gainst **d**ecapentaplegic)] Proteine (R-Smads). Erfolgte die Rezeptoraktivierung durch TGF $\beta$  findet eine Signalweiterleitung über Smad 2 und 3 statt. Bei der Aktivierung durch BMPs werden Smad 1, 5 oder 8 zur Signaltransduktion herangezogen. Die phosphorylierten R-Smads heterodimerisieren mit Smad 4, welches auch als „common partner“ oder Co-Smad bezeichnet wird, translozieren in den Zellkern und aktivieren dort, zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription von TGF $\beta$  bzw. BMP Zielgenen (Abbildung 1-6) (Balemans und Van Hul 2002).



Typ I Rezeptoren	Liganden
ALK 1	BMPs
ALK 2 (Activin A Rezeptor Typ I)	BMPs, Activin
ALK 3 (BMP Rezeptor Typ IA)	BMPs
ALK 4 (Activin A Rezeptor Typ IB)	TGF $\beta$ , Activin
ALK 5 (TGF $\beta$ Rezeptor Typ I)	TGF $\beta$ , Activin
ALK 6 (BMP Rezeptor Typ IB)	BMPs, AMH
ALK 7	Activin
Typ II Rezeptoren	Liganden
Activin A Rezeptor Typ II	Activin, BMPs
Activin A Rezeptor Typ IIB	Activin, BMPs
TGF $\beta$ Typ II Rezeptor	TGF $\beta$
BMP Typ II Rezeptor	BMPs
AMH Typ II Rezeptor	AMH

Tabelle 1-2: Auflistung der Typ I und Typ II Serin/ Threoninkinase Rezeptoren und ihrer Liganden. (ALK: **a**ctivin **r**eceptor-**l**ike **k**inase; AMH: **a**nti-**m**ullerian **h**ormone; BMP: **b**one **m**orphogenetic **p**rotein; TGF $\beta$ : **t**ransforming **g**rowth **f**actor  **$\beta$** ) [Zusammenstellung aus (Balemans und Van Hul 2002; Bernard et al. 2006)]

Die BMP/ TGF $\beta$  Signalkaskade weist zusätzliche Regulationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen auf: intrazellulär durch inhibitorische Smad Moleküle und Ko-Repressoren und in der Zellmembran durch einen Pseudorezeptor. Im Zytoplasma liegen inhibitorische Smad (I-Smad, Smad 6 und 7) Proteine vor, die durch zwei Mechanismen die Signalweiterleitung unterbrechen können. Sie interagieren einerseits mit dem phosphorylierten Typ I Rezeptor und verhindern dadurch die Bindung und Aktivierung der R-Smads, andererseits konkurrieren sie mit den R-Smads um die Bindung an das Co-Smad und verhindern damit die R-Smad/ Co-Smad Komplexbildung. Beide Mechanismen verhindern letztlich die Transkription von BMP bzw. TGF $\beta$  Zielgenen. Die Expression von I-Smads wird durch verschiedene Stimuli aktiviert, darunter auch Mitglieder der TGF $\beta$  Superfamilie selbst. Es lässt sich daher vermuten, dass I-Smads Teil einer negativen Rückkopplungsreaktion sind um die Signalweiterleitung, nach einer gewissen Zeitdauer, zu beenden. Eine weitere Möglichkeit der intrazellulären Inhibition ist durch die Ko-Repressoren Ski (homolog of v-Ski avian sarcoma viral oncogene) und Sno (**S**ki-related **n**ovel gene/ Ski-like) gegeben. Durch Interaktion mit den Smad Molekülen (Ski: Smad 2, 3 und 4, Sno:

Smad 2 und 4) verhindern sie die Transkription von TGF $\beta$  Zielgenen (Arndt et al. 2005; Stroschein et al. 1999). Durch die Interaktion mit Smad 4, welches sowohl bei der TGF $\beta$  als auch bei der BMP aktivierten Signaltransduktion beteiligt ist, können Ski und Sno auch die BMP Signalkaskade inhibieren. Die Inhibition ist jedoch schwächer als bei der TGF $\beta$  Signalkaskade (Takeda et al. 2004).

Ein zweiter Regulationsmechanismus ist in der Zellmembran zu finden. Es handelt sich dabei um den Pseudorezeptor BAMBI (**B**MP and **a**ctivin **m**embrane-**b**ound **i**nhibitor). Dieser Pseudorezeptor besitzt eine extrazelluläre Domäne mit struktureller Ähnlichkeit zu Typ I Rezeptoren, es fehlt jedoch die intrazelluläre Serin/ Threonin Kinase Domäne. BAMBI bildet stabile Komplexe mit Typ II Rezeptoren und verhindert die Formation von aktiven Typ I/ Typ II Rezeptorkomplexen und dadurch die Aktivierung von R-Smad Molekülen.

Einen weiteren Mechanismus zur Regulation der BMP Signaltransduktion stellen sezernierte extrazelluläre BMP Inhibitoren dar. In Vertebraten sind mehr als sieben Inhibitoren bekannt, die mit unterschiedlicher Affinität verschiedene BMPs inhibieren. Die am besten charakterisierten Proteine dieser Gruppe sind Noggin und Chordin. Beide Inhibitoren binden direkt an BMP-2, -4 und -7 und verhindern deren Bindung an die entsprechenden BMP Rezeptoren (Balemans und Van Hul 2002). Die BMP Signaltransduktionskaskade mit Inhibitoren ist schematisch in Abbildung 1-6 dargestellt.

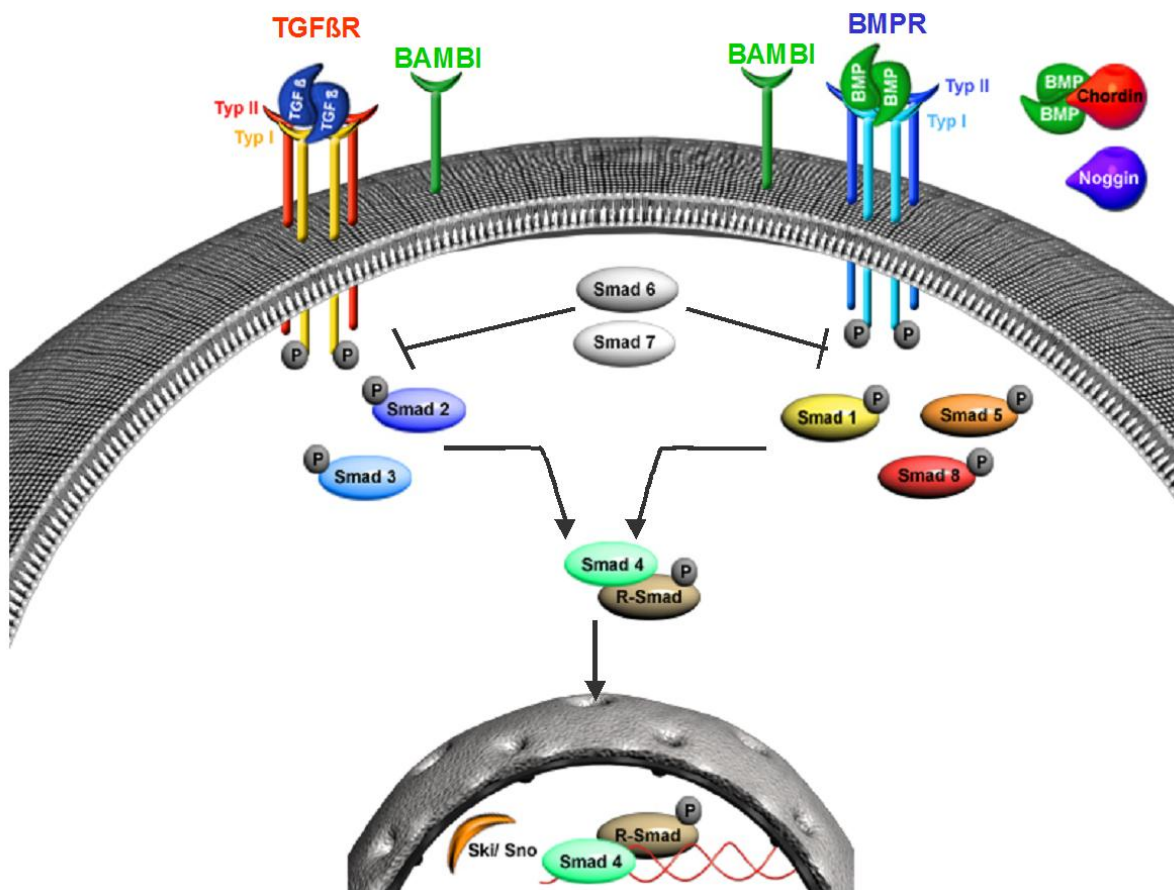


Abbildung 1-6: **Schematische Darstellung der BMP und TGFβ Signalkaskade.** Die linke Seite zeigt die Signalkaskade nach Aktivierung durch TGFβ. TGFβ Dimere binden an Typ I und Typ II TGFβ Rezeptoren. Daraufhin erfolgt eine Transphosphorylierung des Typ I Rezeptors durch Rezeptor Typ II. Der aktivierte Typ I Rezeptor phosphoryliert Smad 2 oder 3, welche mit Smad 4 heterodimerisieren in den Zellkern translozieren und dort die Transkription von Zielgenen aktivieren. Die TGFβ Signalkaskade kann durch den Pseudorezeptor BAMBI, die inhibitorischen Smads (Smad 6 und 7) im Zellkern durch die Ko-Repressoren Ski und Sno, inhibiert werden. Analog zur TGFβ Signalkaskade ist der BMP Signalweg auf der rechten Seite dargestellt. Inhibiert wird dieser Signalweg durch den Pseudorezeptor BAMBI, extrazelluläre Inhibitoren (Noggin, Chordin) und teilweise durch Ski und Sno, da diese beiden Moleküle auch die Aktivität von Smad 4 inhibieren welches am BMP Signalweg beteiligt ist (Takeda et al. 2004).

### 1.5.1 Rolle der TGF-beta Signalkaskade

Die Rolle von TGFβ (transforming **growth factor beta**) ist jeweils abhängig vom Zelltyp und reicht vom Tumor-Suppressor bis zum Onkogen. In normalen Melanozyten wirkt TGFβ als negativer Regulator der Proliferation. Die anti-proliferative Wirkung von TGFβ in Melanozyten wird vorrangig durch die verstärkte

Expression der Zellzyklus-Inhibitoren p21<sup>WAF</sup> und p15<sup>INK4B</sup>, beides Zielgene der TGF $\beta$  Signalkaskade erreicht (siehe auch Kapitel 1.4.3) (Hengge und Dummer 2006). Melanomzellen zeigen im Gegensatz dazu eine zunehmende Resistenz gegenüber den anti-proliferativen Effekten von TGF $\beta$  in Abhängigkeit von der Tumorprogression (Medrano 2003). Sie produzieren und sezernieren sogar selbst erhebliche Mengen an TGF $\beta$  1, 2 und 3 in die Tumorumgebung, welches zur Matrixdegradation, verstärkter Angiogenese, verbessertem Überleben und dem Übergang zu einem aggressiveren Phänotyp beiträgt (Medrano 2003). Im Laufe der Melanomprogression ändert sich die Funktion von TGF $\beta$  vom parakrinen Inhibitor (Melanozyten) zu einem autokrinen Stimulator (Melanomzellen). Analysen der TGF $\beta$  Signalkaskade im Melanom zeigten, dass keine Defekte auf Rezeptor- Ebene vorliegen, jedoch die Expression von Inhibitoren (Ski/ Sno) induziert wird, um antiproliferative Effekte von TGF $\beta$  zu blockieren. Ski (homolog of v-Ski avian sarcoma viral oncogene) ist ein transkriptioneller Ko-Repressor der an Smad 2, 3 und 4 bindet. Die Bindung von Ski führt dazu, dass die Histon-acetyltransferase p300 von den Smad Komplexen dissoziiert und stattdessen eine Histon-deacetylase (HDAC) bindet. Diese HDAC reprimiert die Transkription durch Deacetylierung von Histonresten und führt dazu, dass TGF $\beta$  Zielgene nicht mehr transkribiert werden (Takeda et al. 2004). Zusätzlich kann zytoplasmatisches Ski an Smad 3 binden und dessen Translokation in den Zellkern und wiederum die Transkription von Zielgenen verhindern. Ski ist im malignen Melanom überexprimiert und reprimiert dort die Smad abhängige Expression von p21<sup>WAF</sup> sowie die Aktivität des Retinoblastom Proteins. Diese beiden Mechanismen führen zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle und des antiproliferativen Effektes von TGF $\beta$  in Melanomzellen (Medrano 2003). Die Rolle von Sno (Ski-related novel gene/ Ski-like) im malignen Melanom wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

### **1.5.2 Bone morphogenetic proteins (BMPs)**

Bone morphogenetic proteins (BMPs) wurden erstmals in den sechziger Jahren von Dr. Marshall Urist aus demineralisierten Knochenextrakten isoliert. Urist beschrieb die Fähigkeit dieser Proteine die Bildung von Knorpel und Knochen im Bindegewebe von Nagetieren zu induzieren und nannte sie im Hinblick auf ihre Knochen induzierende Funktion, *bone morphogenetic proteins* (Henrik und Olle 2001; Yamamoto und Oelgeschlager 2004). BMPs werden als große Vorläuferproteine,

bestehend aus einer Signalsequenz, einer Prodomäne und einer carboxyterminalen Domäne, synthetisiert. Diese Vorläufermoleküle dimerisieren und werden in der Zelle proteolytisch an der Sequenz Arginin- X-X- Arginin gespalten. Die abgespaltene carboxyterminale Domäne stellt dabei das reife Protein dar (Granjeiro et al. 2005; Ruppert et al. 1996). Die Analyse der dreidimensionalen Struktur von z.B. BMP-7 ergab, dass das reife monomere BMP-7 eine Kernstruktur besitzt, die von einem Cysteinknoten gebildet wird. Dieser Cysteinknoten entsteht durch die Ausbildung von drei Disulfidbrücken zwischen je zwei Cysteinresten im Protein. Von dieser Kernstruktur entspringen vier Stränge von anti-parallelen  $\beta$ -Faltblättern die zwei Finger-ähnliche Strukturen erzeugen. Reife BMPs werden von der Zelle als Dimere sezerniert, wobei die Dimerisierung der BMPs über eine Disulfidbrücke eine notwendige Voraussetzung für ihre biologische Aktivität darstellt (Granjeiro et al. 2005).

Wozney und Kollegen beschrieben Ende der achtziger Jahre, die Zugehörigkeit der BMPs zur TGF $\beta$  Superfamilie aufgrund ihrer Sequenzhomologie. Diese Homologie ist durch sieben konservierte Cysteinreste am N-terminalen Ende gekennzeichnet (Wozney et al. 1988). Mittlerweile wurden über 30 Mitglieder der BMP/ TGF $\beta$  Superfamilie in den verschiedensten Spezies identifiziert und charakterisiert, davon 14 BMPs (BMP-2 – BMP -15). BMP 1 (Typ I Prokollagen C Proteinase) gehört nicht zur TGF $\beta$  Superfamilie, sondern zur Familie der Metalloproteinasen. BMPs spielen in einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle: sie können Zellproliferation, Differenzierung, Motilität, Adhäsion, Zelltod und verschiedenste Prozesse während der Embryogenese regulieren. Dabei sind sie an Bildung und Gestalt von verschiedenen Geweben, wie dem zentralen Nervensystem, dem Skelett, dem Herz, der Niere, Lunge und Leber, sowie den Zähnen und Augen beteiligt. In der frühen Embryogenese kommt den BMPs eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der dorsoventralen Körperachse zu (Yamamoto und Oelgeschlager 2004; Hogan 1996; Balemans und Van Hul 2002).

BMPs sind wohl die wichtigsten therapeutischen Wachstumsfaktoren zur Induktion der Knochen-Neubildung, zum Beispiel nach Knochenbrüchen. Studien an Patienten mit Fraktur der Tibia (Schienbeinknochen) zeigten, dass eine Behandlung mit rekombinatem BMP-2 zu einer signifikant schnelleren Knochenheilung führte, als bei einer nicht behandelten Kontrollgruppe. Weiterhin wurde gezeigt, dass BMP-7 die Knochenbildung bei schwer verheilenden Frakturen verbessert (De Biase und

Capanna 2005). Auch neue Anwendungen von BMPs, zum Beispiel zur Prävention vor Osteoporose oder zur Behandlung von Defekten des Parodontium (Zahnhalteapparat), wurden untersucht und zeigten im Tiermodell erfolgsversprechende Ergebnisse (Phillips et al. 2006).

Neben der wichtigen Rolle die BMPs bei der Knochenbildung spielen, deuten immer mehr Studien darauf hin, dass sie auch an der Entstehung und Progression verschiedenster Krebsarten beteiligt sind.

Untersuchungen des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms ergaben eine Überexpression von BMP-2 im Krebsgewebe im Vergleich zu gesundem Lungengewebe. Funktionelle Studien *in vitro* zeigten, dass die Behandlung von Lungenkarzinomzelllinien mit rekombinantem BMP-2 die Migrations- und Invasionsfähigkeit dieser Zellen fördert. In *in vivo* Analysen der Lungenkarzinomzellen im Nacktmausmodell, induzierte BMP-2 das Tumorwachstum, welches durch den BMP Inhibitor Noggin oder einen anti-BMP-2 Antikörper wieder gehemmt werden konnte (Langenfeld et al. 2003). Weitere Untersuchungen zeigten, dass BMP-2 behandelte Tumore eine verstärkte Bildung von Blutgefäßen aufwiesen, was darauf hindeutet, dass BMP-2 auch als pro-angiogenetischer Faktor wirken kann (Langenfeld und Langenfeld 2004).

Studien zur Funktion der BMPs bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen identifizierten BMP-4 als einen wichtigen Faktor der Krebsentstehung. Immunhistochemische Analysen ergaben eine verstärkte BMP-4 Expression in Adenokarzinomen im Vergleich zu normaler Kolonschleimhaut und benignen Adenomen. Die Überexpression von BMP-4 in Kolonkarzinomzellen führte zu einer veränderten Zellmorphologie, förderte die Migration und Invasion und induzierte die Expression und Aktivität des urokinase Typ des Plasminogenaktivators. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BMP-4 zu einem invasiven Phänotyp bei der Progression des kolorektalen Karzinoms beiträgt (Deng et al. 2007).

In Prostatakarzinomen wurde BMP-7 als wichtiger Faktor bei der Tumorprogression identifiziert. Allerdings zeigten sich hier, jeweils in Abhängigkeit von der Art der behandelten Zellen, unterschiedliche Effekte. In Zellen aus benignen Hyperplasien induzierte BMP-7 einen Zellzyklusstop in der G1-Phase. In Prostatakarzinomzellen hingegen führte die Behandlung mit BMP-7 zur epithelialen- mesenchymalen Transdifferenzierung (EMT) der Zellen, mit Veränderungen in der Zellmorphologie, Migrations- und Invasionsfähigkeit und den entsprechenden Markern für die EMT.

Zusätzlich dazu wurde ein anti-apoptotischer Effekt von BMP-7 nachgewiesen. In dieser Studie wurde gezeigt, dass BMP-7 auf verschiedene Zelltypen, analog zu TGF $\beta$ , sowohl eine anti-proliferative als auch eine tumorfördernde Wirkung haben kann (Yang et al. 2005).

Diese Studien zeigen, dass unterschiedliche BMPs an der Entstehung und Progression verschiedener Krebsarten beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit soll nun die Rolle und Funktion der BMPs im malignen Melanom analysiert werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Allgemeine Materialien

Amara GmbH, Köln	Cell line Nucleofector Kit R
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 Gibco, Carlsbad, USA	MCDB-131 Medium
Invitrogen Molecular Probes, Eugene, USA	CFSE (5-(and 6-)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester)
Merck, Darmstadt	alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität, Hemacolor Fixierlösung, Farbereagenz rot, Farbreagenz blau
Millipore, Eschborn	Einmal-Sterilfilter
New England Biolabs GmbH, Frankfurt	Restriktionsendonukleasen, NEBuffer für Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase
Novocastra Laboratories Ltd. Newcastle, UK	Anti-BMP4 Antikörper
Nunc GmbH & Co., Wiesbaden	Lab-Tek™ Chambered Coverglass
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Dulbeccos Modified Eagle Medium, Fötales Kälberserum, Trypsin, PBS (phosphate buffered saline), Penicillin/ Streptomycin
Pierce, München	BCA Protein Assay Kit
Promega, Heidelberg	Dual-Luciferase® Reporter Assay System, DeadEnd™ Fluorometric

	TUNEL 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, siRNAs
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
R&D Systems	Anti-Chordin Antikörper
Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg	Anti-BMP7 Antikörper, Anti-FGF-2 Antikörper, Anti-Ski Antikörper, Anti-Smad 1/2/3 Antikörper
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
Transduction Laboratories, Lexington, England	Anti- ETS-1 Antikörper
Upstate, Lake Placid, USA	Anti-Sno Antikörper, Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit
Vector Laboratories, Burlingame, USA	Ziegenserum, Pferdeserum; Vectashield Mounting Medium with DAPI
Whatman International Ltd, Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier, Nucleopore® Track- Etch Membrane
Zymed Laboratories Inc, San Francisco, USA	BCIP/NBT Substrate Kit

### **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 CO2-Auto-Zero,  
Begasungsbrutschrank BB6220, CO2-  
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

Hereaeus, 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

Bachofar, Reutlingen

UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm

Bandelin, Berlin

SONOPULS                      Ultraschall-  
Homogenisator    HD2070,    MS    72  
Mikrospitze aus Titan

BD Biosciences, San Jose, USA

FACSCalibur, CellQuest Software

Berthold, München	Lumat LB 9507
Bühler, Edmund, Tübingen	Schüttler SM 25
Heidolph, Kehlheim	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 Viren**

Replikationsdefiziente Adenoviren:

Ad-BMP-7	Bone morphogenetic protein 7, CMV-Promotor
Ad-FGF-2	Fibroblast growth factor 2, CMV-Promoter
Ad-EGFP	Green fluorescent protein, CMV-Promoter

Der Ad-BMP-7 Virus wurde zur Verfügung gestellt von Dr. B. Schnabl, Innere Medizin I, Klinikum der Universität Regensburg. Die Ad-FGF-2 und Ad-EGFP Viren wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Meenhard Herlyn, The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania

### 2.1.5 Säugerzelllinien

HMB2	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
HMB2 –5	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit antisense MIA
HMB2 -8	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit antisense MIA
HMB2 LacZ	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit LacZ
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
HMEC-1	Immortalisierte Mikrovaskuläre Endothelzelllinie (Ades et al.

1992)

### 2.1.6 Vektoren

#### pcDNA3

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

#### pGL3 basic

Der pGL3 basic Vektor (Promega, Heidelberg) enthält eine modifizierte kodierende Region für das Glühwürmchen Luciferase Gen (*Photinus pyralis*) nach einer multiplen Klonierungsstelle zur Analyse von putativen Promoterregionen.

#### 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.

#### AP-2 alpha

Für das AP-2 alpha Expressionskonstrukt wurde die gesamte kodierende Sequenz des humanen AP-2 alpha über EcoRI Schnittstellen in den pcMX-PL2 Vektor unter Kontrolle eines CMV-Promotors einkloniert.

#### BMP- RE

Das BMP responsive Luciferases Reportergen Konstrukt wurde von Korchynskyi und ten Dijke nach dem unten aufgeführten Schema generiert (Korchynskyi und ten Dijke 2002). Dazu wurden zwei Fragmente des Id-1 (inhibitor of DNA binding 1) Promotors [(Smad-binde Elemente 2 und 3 (-1052/-1032), Sequenzen –GC'–5, –CAGC-2, -CAGC-1, -GC'–3,4 (-1105/-1080)] fusioniert und zweimal vor ein Luciferase Gen kloniert.

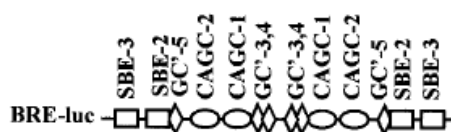




Abbildung 2-1: Klonierungsschema des BMP-RE Konstruktes aus (Korchynskyi und ten Dijke 2002)

Das BMP-RE Konstrukt wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Peter ten Dijke, Division of Cellular Biochemistry, National Cancer Institute, Amsterdam / Niederlande

### **BMP-2- Luc**

Für das BMP-2 Luc Konstrukt wurden 2225bp des murinen BMP-2 Promotors vor das Luciferase Gen in den pGL3 basic Vektor kloniert.

### **BMP-4- Luc**

Für das BMP-4 Luc Konstrukt wurde ein 1618bp langes Fragment des murinen BMP-4 Promotors vor das Luciferase Gen in den pGL3 basic Vektor kloniert.

### **BMP-4 mut 1-Luc**

Für das BMP-4 mut 1-Luc Konstrukt wurde die Ets-1/ AP-2 alpha Bindestelle im BMP-4 Luc Konstrukt an der Stelle –236 bis –227 durch die Sequenz der EcoRI Schnittstelle (GAA TTC) ausgetauscht.

### **BMP-4 mut 2-Luc**

Für das BMP-4 mut 2-Luc Konstrukt wurde die Ets-1/ AP-2 alpha Bindestelle im BMP-4 Luc Konstrukt an der Stelle –152 bis –144 durch die Sequenz der EcoRI Schnittstelle (GAA TTC) ausgetauscht.

### **BMP7- Luc**

Für das BMP-7 Luc Konstrukt wurden 2255bp des murinen BMP-7 Promotors vor das Luciferase Gen in den pGL3 basic Vektor kloniert.

Das AP-2 alpha, die BMP-2, -4, -7 Luc Konstrukte und die BMP-4 mut 1 und 2 Luc Konstrukte wurden von Herrn Dr. Markus Moser, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried zur Verfügung gestellt.

### **Antisense BMP4 (asBMP4)**

Für das antisense BMP4 Konstrukt wurden 670bp des humanen BMP4 Genes mittels RT-PCR amplifiziert (Primer: hBMP4 Eco for410, hBMP4 Eco rev1080) und

revers über Eco RI Schnittstellen in das pCMX-PL-1 Plasmid unter Kontrolle eines CMV Promotors einkloniert.

### **(CAGA)<sub>9</sub>-Luc**

Für das (CACA)<sub>9</sub>-Luc Konstrukt wurde neun mal die Sequenz –AGCCAGACA- vor eine Luciferasegen kloniert.

Das Konstrukt wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Steven Dooley, Medizinische Universitätsklinik, Universitätsklinikum Mannheim, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim

### **Chordin Expressionsplasmid**

Für das Chordin Expressionskonstrukt wurde die gesamte murine Chordin cDNA mittels RT-PCR generiert und in das Expressionsplasmid pCS2 unter Kontrolle eines CMV Promotors einkloniert.

Zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Sue O'Shea, Department of Cell and Developmental Biology, University of Michigan Medical School.

### **ETS-1 Luciferase (ETS-1 Luc)**

Für das ETS-1 Luciferase Plasmid (Luciferase Assay) wurde drei mal die Sequenz 5'-GATCTCGAGGAAGTGACTAACTGAGCACAGTCGA-3', mit der ETS-1 Binding Site (unterstrichen) bei PvuII und HindIII in den PTKFLUC Vektor, der das Luciferase- Gen enthält, einkloniert.

Zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. F. Soncin, Institut de Biologie de Lille.

### **FGF-2**

Für das FGF-2 Expressionsplasmid wurden die kodierende Sequenz des humanen FGF-2 (18 kDa Isoform) in den pcDNA3.1 Vektor der Firma Invitrogen über HindIII und XhoI Schnittstellen unter Kontrolle eines CMV-Promotors einkloniert.

Zur Verfügung gestellt von Dr. Henning Madry, Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes.

**Antisense Sno (asSno)**

Für das antisense Sno Konstrukt wurden 488bp des humanen Sno Genes mittels RT-PCR amplifiziert und revers über Eco RI Schnittstellen in das pCMX-PL-1 Plasmid unter Kontrolle eines CMV-Promotors einkloniert.

**Ski Expressionskonstrukt**

Für das Ski Expressionskonstrukt wurden 2,2 kb der humanen kodierenden Sequenz in den pcDNA3 Vektor der Firma Invitrogen unter Kontrolle eines CMV Promotors einkloniert.

Zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. K. Miyazono, Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

**Antisense MIA (asMIA für stabil transfizierte asMIA Zelllinien HMB2-5 und HMB2-8)**

Für das asMIA Plasmid wurde die gesamte kodierende Sequenz von MIA reverse in den pCMX-PL1 Vektor einkloniert. Da der pCMX-PL1 Vektor keine eukariontischen Resistenzgene für Antibiotika enthält wurden die Zelllinien HMB2-5 und HMB2-8 mit pcDNA3 kotransfiziert.

Zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. A.-K. Boßerhoff, Institut für Pathologie, Klinikum der Universität Regensburg.

**2.1.7 Oligonukleotide****Primer für RT-PCR, quantitative PCR und PCR für Chromatin Immunopräzipitation**

Die Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA Genosys, Steinheim synthetisiert. Es wurde eine 100µM Stammlösung der Oligonukleotide durch lösen in H<sub>2</sub>O hergestellt und bei –20°C gelagert.

hBMP2 for	GCACTGAGACGCTGTTCC
hBMP2 rev	CCATGGTCGACCTTTAGG
hBMP3 for	GCAGATATTGGCTGGAGTGAATGGATTATCTC
hBMP3 rev	AGCGCAAGACTCTACTGTTCATGTTAGGGTATA
hBMP4 for	GATTCCCGTCCAAGCTATC

hBMP4 rev	TCCATGATTCTTGACAGCC
hBMP4 Eco for410	GACGAATTCGTTTGTTCAGATTGGCTGTC
hBMP4 Eco rev1080	GACGAATTC GTCCAGTAGTCGTGTGATGA
hBMP4prom for	ACAAAGGTCAGATGAGCGGC
hBMP4prom rev	GTATTTGCCCAGAGCGCTG
hBMP4 1.site mut for	AATCATCAGTTTGGGCAGCAG
hBMP4 1.site mut rev	CGCCACATCCTCCCATC
hBMP4 2.site mut for	GGAGGCGATTAAGGGAGGAG
hBMP4 2.site mut rev	GGATGCCGAACCTCACCTAGC
hBMP5 for	TAAATCCAGCTCTCATCAGGACTCCTC
hBMP5 rev	GAGATGGCATTTAATTTGGTTGGAGCAC
hBMP6 for	AAGGCTGGCTGGAATTTGACATCACG
hBMP6 rev	GGTAGAGCGATTACGACTCTGTTGTC
hBMP7 for	GCCAGCCTGCAAGATAGCCATTTCC
hBMP7 rev	GAGCACCTGATAAACGCTGATCCGG
hBMP8B for	CATCAGGCAGTGTTCTACCC
hBMP8B rev	CCTCTCAGGTCATTCCACATC
hBMP9 for	CTGAGCACACCTTCAACCT
hBMP9 rev	TGGCAGTTATGGAGATGGC
hBMP10 for	CCAGTGCCCAGAATAAGCA
hBMP10 rev	CCACCCAATCTCCTTGAAGT
hBMP11 for	CCGAGACCGTCATTAGCAT
hBMP11 rev	CAATCTTCAGTGAGCGGATAC
hBMP12 for	GCACGCAGAGGAAAGAGA
hBMP12 rev	AACGCAAAGGGAAGTCGC
hBMP13 for	CACCGTTGACGCATCTTGA
hBMP13 rev	CAATGAAGGCAGAGACCTGG
hBMP14 for	CCCACCATTCTCCTCACCT
hBMP14 rev	AGCCTCACACTCCTCAACTC
hBMP15 for	CGCCATCATCTCCAATAAC
hBMP15 rev	GCTCAAGACCACCACTATCT
mChordin for	CGCAGCAATCTAGATCCACA
mChordin rev	GCACCCTGCCAAATGAGA
hEphA2 for	CACCCGTATGGCAAAGGGTGGGAC
hEphA2 rev	CCGACTCGGCATAGTAGAGGTTGAA
hEts-1 for	CGATCTCAAGCCGACTCTCA
hEts-1 rev	CGAGGTATAGCGGGATTCTG
FGF-2 for	AGCCTAGCAACTCTGCTGGTGATGG
FGF-2 rev	ACGTAGGAGACACAGCGGTTTCGAG

Id-1 for	TGTTACTCACGCCTCAAGGAG
Id-1 rev	TTCAGCGACACAAGATGCG
JunB for	CCCCATCAACATGGAAGACCAAGAG
JunB rev	CAAGCAGCAGCTGACAGCCGTTGC
Laminin 5 gamma 2 for	CAGAAGCCCAGAAGGTTGATA
Laminin 5 gamma 2 rev	GCCAGAATCCCATCTATGCT
hSno for	GAGAGCATGTTAAGCGAACC
hSno rev	CTGGAGTGTAAATTCTCGGAG
hSki for	CTACATCCTGCTGAGCCAG
hSki rev	GTAGAAGCTGTCTCGGATGAG
TIE-2 for	TTAGCTTAGGAGGCACACCCTACTGCGG
TIE-2 rev	GCAGTTGTCAAGGGTCTCCCATGCCAGT
VE-Cadherin for	CAAGTATGGGCAGTTTGACC
VE-Cadherin rev	AGGAAGATGAGCAGGGTGAT

### 2.1.8 Short Interfering RNAs (siRNA)

Die siRNA wurde von der Firma Qiagen, Hilden synthetisiert.

FGF-2 siRNA

Sequenz vom Hersteller nicht angegeben

## 2.2 Medien, Antibiotika und Puffer

### 2.2.1 Medien zur Anzucht von E.coli und Säugerzellkulturen

Alle Zutaten des LB Mediums wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert, für Agarplatten wurde noch zusätzlich Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

Luria Bertani Medium

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

Für Platten: + 15g/l Agar

Zur Selektion: + 100µg/ml Ampicillin

bzw. + 25µg/ml Kanamycin

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach Zusätze: 10% (v/v) FKS 0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin
NHEM Medium	PromoCell, Heidelberg
MCDB-131	Invitrogen Gibco, Carlsbad, USA Zusätze: 15% (v/v) FKS 0,1% (w/v) Penicillin/ Streptomycin 8mM L-Glutamin 10ng/ ml Epidermal growth factor 1µg/ ml Hydrocortison
Einfriermedium	Pro 100 ml: 50 ml DMEM (mit 10 % FKS) 30 ml FKS 20 ml DMSO

### **2.2.2 Antibiotika**

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

60ml 5 M NaOAc  
11,5ml Eisessig  
28,5ml H<sub>2</sub>O

## **Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung)**

TAE (50x)

2 M Tris/Acetat pH 8,0  
50 mM EDTA

DNA-Agarosegel

1-2% (w/v) Agarose  
gelöst in TAE (1x)

DNA-Gel-Ladepuffer (10x)

0,25% (w/v) Bromphenolblau  
0,25% (w/v) Xylencyanol  
40% (v/v) Saccharose

Ethidiumbromidlösung

0,04% in H<sub>2</sub>O bidest

## **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 (10x)	80g/l NaCl 2,0g/l KCl 14,4g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit HCl auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren
Blockierungslösung	3% BSA in PBS



## 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
	Protease Inhibitoren

## Lösung für Immunhistochemie

Citrat-Puffer (10mM) pH = 6,2	2,1g Citronensäuremonohydrat
	1L H <sub>2</sub> O

## 2.3 Methoden

Experimente, bei denen keine anderen Reaktionstemperaturen angegeben werden, fanden bei Raumtemperatur statt.

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

### 2.3.1 *Arbeiten mit Escherichia Coli*

#### 2.3.1.1 Kultivierung

*E.coli* Kulturen wurden auf festen Nährboden oder in flüssiger Schüttelkultur angezogen. Als Selektionsantibiotikum wurden Kanamycin oder Ampicillin zum Nährmedium zugesetzt. Die Antibiotikaresistenz wurde dabei vom eingeführten Plasmid codiert. Für 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 der flüssigen Kulturen bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm.

### 2.3.1.2 Transformation von *E.coli*

Zur Transformation kompetenter *E.coli* wurden je 100ng Plasmid- DNA bzw. der gesamte Ligationsansatz einer Klonierung (siehe Kapitel 2.4.1.5) zu 100µl chemisch-kompetenten Zellen zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien eine Minute auf Eis abgekühlt, 500µl LB Medium zugesetzt und die Kultur 60 Minuten bei 37°C geschüttelt. Die transformierten *E.coli* wurden dann bei 4000 U/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Luria Bertani Agar Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und 16h bei 37°C inkubiert.

### 2.3.1.3 Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Kleinere Mengen Plasmid DNA bis 5µg (Mini Präparation) wurden nach der folgenden Methode präpariert. Es wurden 3ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und bei 37°C und 250 rpm 16h auf dem Schüttelinkubator herangezogen. 1,5ml der Schüttelkultur wurden pelletiert und das Bakterienpellet in 100µl der Lösung I (siehe Kapitel 2.2.3, Lösungen für Plasmidisolierung) resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis werden 200µl 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, folgte die Zugabe von 150µl der Lösung III und eine 3- 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 Minuten. Der Überstand der Zentrifugation wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 900µl 100%igem Ethanol gefällt. Dazu wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und 10 Minuten bei 13000 U/ min abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird verworfen

und das Plasmid- DNA Pellet in der Speedvac Zentrifuge 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wird das Pellet in 10µl eines H<sub>2</sub>O und RNase Mixes (120µl H<sub>2</sub>O + 5µl RNase A) resuspendiert und bei 37°C etwa 20 Minuten geschüttelt, um störende RNA aus dem Präparat zu entfernen.

#### 2.3.1.4 Isolierung von Plasmid DNA im größeren Maßstab (Midi und Maxi Präparation)

Für die Midi bzw. Maxi Präparation wurden 50ml bzw. 200ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit 50µl bzw. 200µl Bakteriensuspension aus der Minipräparation angeimpft und 16h bei 37°C auf dem Schüttelinkubator herangezogen. Die eigentliche Plasmidisolierung erfolgte mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit bzw. dem Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach der beiliegenden Isolationsanleitung. Die Plasmid –DNA wurde mit 500µl H<sub>2</sub>O eluiert und bei –20 °C gelagert. Die Ausbeuten lagen etwa bei 150 bis 250µg Plasmid DNA pro 50ml Baktierienkultur.

### 2.3.2 *Allgemeine Methoden*

#### 2.3.2.1 Gelatine Filter

Die Filter für die Migrations Assays im Boydenkammer Modell wurden mit Gelatine beschichtet um den Zellen die Adhäsion zu erleichtern. Dazu wurden die Filter 20min in 0,5%iger Essigsäure bei 50°C auf dem Rührer langsam gerührt, in einem Faltenfilter abfiltriert und zweimal mit aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Filter eine Stunde in einer Gelatine-Lösung (5mg/ l) gekocht, wieder abfiltriert, einzeln auf Papier ausgelegt und eine Stunde bei 100°C getrocknet.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 *DNA Techniken*

#### 2.4.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen zu analytischen Zwecken erfolgte in einem Volumen von 10µl mit etwa 0,5µg Plasmid-DNA, 5U des

entsprechenden Enzyms und 1µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden für 1-2h bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

#### 2.4.1.2 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,8-2% Agarose in TAE). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 10V/cm durchgeführt. Das Anfärben der DNA erfolgte mit Ethidiumbromidlösung (0,04%) für 10-30min. Die aufgetrennte DNA wurde durch UV-Licht visualisiert und die Größe der Fragmente wurde durch einen ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA-Längenstandards abgeschätzt.

#### 2.4.1.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

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

#### 2.4.1.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

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

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} \text{ Einheit} = 50\mu\text{g/ ml dsDNA, Plasmide} \\ 40\mu\text{g/ ml RNA}$$

#### 2.4.1.5 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 Ziel-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 16h bei 16°C in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

2µl 10x Ligase Puffer  
0,3- 0,5µg Ziel-Vektor  
3-5 facher Überschuss der Insert DNA  
400 U T4 DNA Ligase  
xµl H<sub>2</sub>O für einen 20µl Ansatz

Die Ligationsreaktion wurde für 10min bei 65°C hitzeinaktiviert und anschließend in Epicurian Coli® XL2- Blue MRF' Ultracompetent *Escherichia Coli* nach der in 2.3.1.2 beschriebenen Methode transformiert.

#### 2.4.1.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerasekettenreaktion genutzt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50µl.

Reaktionsansatz:

5µl 10x PCR-Puffer  
0,5µl dNTPs (je 10 mM)  
je 1,0µl der Primer (20 mM)  
10ng Template-DNA  
0,5µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)

Um Verdunstung zu vermeiden, wurde die Reaktion in einem PCR Gerät mit beheizbarem Deckel durchgeführt und nach einem ersten Denaturierungsschritt für 5min bei 94°C folgendem Protokoll unterzogen:

Denaturierung bei	94°C, 45 s	
Annealing bei	x°C, 45 s	(x°C: optimierte Temperatur für jedes Primerpaar)
Extension bei	72°C, 45 s	

35 Zyklen gefolgt von einem abschließenden Extension Schritt bei 72°C für 5 min.

#### 2.4.1.7 RT- PCR

##### **Reverse Transkription**

Pro Reaktionsansatz wurde 1µg Gesamt- RNA, die aus Zelllinien bzw. Gewebe mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen extrahiert wurde, eingesetzt.

Die Reaktion wurde in einem 20µl Ansatz durchgeführt:

4µl First Strand buffer (5x)

2µl DTT (0,1M)

1µl dNTPs (10mM)

1µl dN<sub>6</sub> Primer (random, 2mg/ ml)

11µl RNA + H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Nach der Denaturation wurden 200U Superscript II zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 60 Minuten, gefolgt von einer zehnminütigen Denaturierung des Enzyms bei 70°C. Eine anschließende Inkubation mit RNase (1µl RNase A Mix) für 30 Minuten bei 37°C entfernte die störende RNA. Die fertige cDNA wurde bei –20°C weggefroren.

##### **PCR**

Die an die Reverse Transkription anschließende PCR wurde wie unter 2.4.1.6 beschrieben durchgeführt.

#### 2.4.1.8 Quantitative RT- PCR

Die Quantifizierung der Expressionsstärke von mRNA wurde in einer quantitativen RT- PCR Reaktion, mit Hilfe des LightCycler II Systems, von Roche Diagnostics, Mannheim durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem, in 2.4.1.7 beschriebenen Protokoll.

Die quantitative RT- PCR Reaktion wurde in einem 20µl Ansatz durchgeführt:

10ng cDNA Template

2µl LightCycler DNA Master SYBR Green I (10x)

1,5µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)

je 0,5µl der Primer (20mM)

H<sub>2</sub>O

Der Versuchsansatz wurde dabei folgendem Programm im LightCycler II unterzogen:

Denaturierung:	1 Zyklus:	20°C/ s auf 95°C, 30 s
Amplifikation:	40 Zyklen:	20°C/ s auf 95°C, 15 s
		20°C/ s auf x°C, 5 s
		(x°C: optimierte Temperatur für jedes Primerpaar)
		20°C/ s auf 72°C, 10 s
Analyse der Schmelzkurve:	1 Zyklus:	20°C/ s auf 95°C, 15 s
		20°C/ s auf 65°C, 15 s
		20°C/ s auf 95°C, 15 s
		0,1°C/ s auf 40°C

Als Standard zur Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde das Haushaltsgen  $\beta$ - Aktin benutzt. Die Analyse der LightCycler Ergebnisse, das heißt die Quantifizierung der mRNA Expression, erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers.

#### 2.4.1.9 Sequenzierung

Sequenziert wurden RT-PCR Produkte nach der Isolierung und Aufreinigung aus Agarosegelen (siehe 2.4.1.3).

Für die Sequenzier- PCR Reaktion wurden 1-2 $\mu$ g DNA eingesetzt. Die Sequenziertemperatur wurde in Abhängigkeit vom GC Gehalt der Primer gewählt. Dabei wurde zwischen ‚low‘, einem GC Gehalt unter 50% und ‚high‘ dem GC Anteil im Primer über 50% unterschieden.

Sequenzierprogramme:

	‚high‘	‚low‘
25 Cyclen mit je:		
15 Sekunden:	96°C	96°C
1°C/ sec.	auf 60°C	auf 55°C
15 Sekunden:	60°C	55°C
1°C/ sec.	auf 62°C	auf 60°C
4 Minuten:	62°C	60°C
forever:	8°C	8°C

Pro Sequenzieransatz wurden 1-2 $\mu$ g DNA, 2 $\mu$ l Primer (3,2 $\mu$ M), je 1 $\mu$ l Premix (Applied Biosystems, USA) pro 100bp, des zu sequenzierenden PCR Produktes,

verwendet und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20µl aufgefüllt. Der Premix enthielt dabei die fluoreszenzmarkierten Nukleotide, spezielle Reaktionspuffer und die Taq-Polymerase.

Nach der Sequenzier- PCR Reaktion wurde eine Ethanol-fällung mit 10µl 3M NaAc (pH 4,6) und 250µl Ethanol (100%) in einem Endvolumen von 350µl durchgeführt. Die Mischung wurde durch vortexen gemischt, 10 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und 20min bei 13.000 U/ min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 250µl 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in der Vakuumzentrifuge für 2 Minuten getrocknet. Das getrocknete Produkt wurde in 25µl des Template Suppression Reagents (Applied Biosystems, USA) gelöst, bei 90° für 2 Minuten denaturiert und nach der Denaturierung auf Eis abgekühlt. Dieser Reaktionsansatz wurde im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA) analysiert.

#### 2.4.1.10 TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)

Die Methode der TUNEL Färbung wird benutzt um apoptotische Zellen einer Zellpopulation nachzuweisen. Dabei werden freie DNA Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und visualisiert. Während der Apoptose werden Endonukleasen aktiviert die die DNA zwischen den Nukleosomen zerschneiden und damit viele DNA Enden freisetzen. Dieses Merkmal der späten Apoptose lässt sich nutzen indem man die DNA Enden durch die TUNEL Färbung nachweist (Hubert Hug, 2000). Die TUNEL Färbung wurde mit dem DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System von Promega (Promega, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Apoptose Nachweis wurde an paraffin-konservierten Geweben durchgeführt. Die Gewebeschnitte (2µm) wurden durch zwei Waschschrte in Xylol (je 5min) entparaffiniert und anschließend rehydriert. Dies erfolgte für jeweils 3min in der folgenden Ethanolreihe: 100%, 95%, 85%, 70% und 50% Ethanol. Die Gewebeschnitte wurden je 5min in 0,85% NaCl und PBS gewaschen und anschließend 15min in 4% Formaldehyd-Lösung fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gewebe mit Proteinase K (20µg/ ml) permeabilisiert, gewaschen (2x PBS, je 5min) und nochmals 5min in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Nach zweimaligem Waschen (2x PBS, je 5min) wurden die Schnitte mit Äquibrierungs-Puffer für 8min



bei RT äquibriert gefolgt von der Markierungsreaktion. Die Markierungsreaktion enthielt pro Ansatz:

45µl Äquibrierungs-Puffer

5µl Nukleotid-Mix

1µl Terminale deoxynukleotidyl

Transferase

Die Inkubation der Gewebe erfolgte bei 37°C, im Dunkeln für 60min. Nach mehreren Waschschritten (1x in 2x SSC, 15min, 3x in PBS, je 5min) wurden die Gewebeschnitte mit Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckt und die Fluoreszenz bei 520 nm (Grün-Fluoreszenz) detektiert.

## **2.4.2 RNA-Techniken**

### **2.4.2.1 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 350µl RNA Lysispuffer resuspendiert und lysiert. Zur RNA Isolation aus Geweben wurde etwa 1mg Gewebe mit einem Stab-Homogenisator (Xenox, Niersbach) in Lysispuffer aufgeschlossen und über eine QIAshredder Säule aufgereinigt. Aus dem Eluat der QIAshredder Säule wurde analog zu den in Lysispuffer aufgeschlossenen Zellen nach Protokoll des Herstellers die RNA Isolation durchgeführt. Die in 30µl H<sub>2</sub>O eluierte, extrahierte RNA wurde bei –20°C weggefroren.

## **2.4.3 Proteinchemische Methoden**

### **2.4.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten**

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurden konfluent wachsende Säugerzellen mit PBS gewaschen, geerntet und bei 3000 U/ min für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200µl RIPA Puffer (siehe Kapitel 2.2.3) lysiert. Gewebe wurden mit einem Stab-Homogenisator (Xenox, Niersbach) in RIPA Lysispuffer aufgeschlossen. Die Präparationen wurden jeweils 15 min bei 4°C geschüttelt und

die lysierten Zellbestandteile durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 13000 U/min bei 4°C von den Proteinen abgetrennt. Der Proteinextrakt wurde in neue Gefäße überführt und bei –20°C weggefroren.

#### 2.4.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach der Methode von Smith et al. (Smith et al. 1985) unter Verwendung des BCA-Protein-Assay Kits der Firma Pierce, München durchgeführt. Diese basiert auf der alkalischen Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine (Biuret Reaktion), welches mit Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet, der durch photometrische Messung bei 562nm quantifiziert werden kann.

Zu 5µl Proteinlösung wurden 200µl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in eine 96-Well Platte gegeben und 20min bis zur Entwicklung der violetten Färbung bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messung bei 562nm in einem ELISA-Reader konnte die Absorption bestimmt werden, die durch parallele Quantifizierung von BSA (bovine serum albumin) Standards über 3 Zehnerpotenzen in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden konnte.

#### 2.4.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Proteinproben (Zelllysate siehe Kapitel 2.4.3.1) wurden jeweils in 1x Roti-Load 10min bei 70°C denaturiert und anschließend bei 0,8mA/cm<sup>2</sup> durch SDS-PAGE auf PAA Gelen aufgetrennt.

#### 2.4.3.4 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 10min in 1x Western-Blot Puffer getränkt und danach die Proteine mittels elektrophoretischem Transfer (Whatman Biometra, Fastblot B34 Unit, 1h bei 1,5mA/cm<sup>2</sup>) auf die Membran übertragen.

Die Western Blot-Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h 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 (3x 5 min mit PBS) wurde die Membran mit einem gegen den konstanten Teil des Primär- Antikörpers gerichteten (speziesspezifischen) Sekundär- Antikörper (1:4000) für 1h bei RT inkubiert. Die Sekundär-Antikörper sind mit einer Alkalischen Phosphatase zur Detektion einer Farbreaktion konjugiert. Nach dreimaligem Waschen (3x 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.

#### 2.4.3.5 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Bei der ChIP werden Transkriptionsfaktoren zuerst durch Quervernetzung an die DNA gebunden und das Zielprotein mit der quervernetzten DNA durch eine Immunpräzipitation isoliert. Die Quervernetzung wird anschließend revertiert, die DNA isoliert und in einer PCR Reaktion mit spezifischen Primern detektiert.

Die ChIP wurde mit dem Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit (Upstate, Lake Placid, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Quervernetzung erfolgte mit 1% Formaldehyd ( $1 \times 10^6$  Zellen in einer Zellkulturschale) für 10min bei 37°C. Die Zellen wurden anschließend lysiert, die DNA mit einem Ultraschall- Homogenisator zerkleinert und die Protein-DNA Komplexe durch abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 13.000rpm, 4°C für 10min isoliert. Um unspezifische Bindungen zu vermindern wurden die DNA-Proteinlysate mit Lachssperma-DNA/ Protein A Agarose bei 4°C für 30min inkubiert. Die Lachssperma-DNA/ Protein A Agarose Kügelchen wurden durch Zentrifugation entfernt und anschließend die DNA-Proteinlysate mit anti-Ets-1 Antikörper (2µg/ ml) 16h bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Die Antikörper-Protein-DNA Komplexe wurden durch Lachssperma-DNA/ Protein A Agarose Kügelchen gebunden (1h, 4°C), gewaschen und in Elutionspuffer eluiert. Durch Umkehrung der Quervernetzung von Proteinen und DNA (5M NaCl, 4h, 65°C) wurde die DNA freigesetzt, durch Phenol/Chloroform Extraktion von den Proteinen abgetrennt gefällt und in der Analyse-PCR (Primer siehe Kapitel 2.1.7) eingesetzt.

#### 2.4.3.6 Immunhistologie

Gewebeschnitte (2µm) von paraffin-konservierten Geweben wurden zuerst entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden die Gewebeschnitte 1h bei 65°C auf den Objektträgern fixiert und das überschüssige Paraffin entfernt. Anschließend wurde das restliche Paraffin durch zweimalige Spülung mit Xylol (jeweils 10min) entfernt und die Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (jeweils zweimalige fünfminütige Inkubation in 100%, 95% und 70% Ethanol). Die rehydrierten Gewebe wurden in Citrat-Puffer (siehe 2.2.3) 30min bei 100°C im Wasserbad und durch fünfminütige Inkubation mit 3% Wasserstoffperoxid denaturiert um im Gewebe befindliche Epitope für die Antikörperbindung zugänglich zu machen. Um unspezifische Bindestellen abzusättigen wurden die Gewebeschnitte zuerst 20min in 20%igem Ziegen- bzw. Pferdeserum in PBS inkubiert, anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper für 16h bei 4°C (1:20- 1:100 Verdünnung in 20% Ziegenserum in PBS). Nach dreimaligem Spülen in PBS (je 10 min.) wurden die Gewebe in einer Lösung aus Biotin markiertem Anti-Maus und Anti-Kaninchen Sekundär- Antikörper (Dako, Hamburg, LSAB2 Kit) 30min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Spülen in PBS (je 10 min) wurden die Gewebeschnitte mit einem Konjugat aus Streptavidin mit der Meerrettich-Peroxidase für 30 min inkubiert. Das Streptavidin bindet dabei an das Biotin am Sekundär-Antikörper. Die Gewebe-Epitop, Primär- und Sekundär-Antikörper Komplexe wurden durch die Umsetzung des AEC Reagenz (3-amino-9-ethylcarbazole, Dako, Hamburg, LSAB2 Kit) durch die Peroxidase in ein rotes Präzipitat detektiert. Die Reaktion wurde nach 10 min durch spülen der Schnitte in aqua dest. gestoppt. Eine Gegenfärbung mit Hämalaun wurde angeschlossen um die Zellkerne sichtbar zu machen.

## 2.5 Zellkulturmethoden

### 2.5.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese nach Waschen mit PBS für 5min 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.

### **2.5.2 Transfektion von Zellkulturzellen**

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 0,5µg an Plasmid- DNA pro Versuchsansatz eingesetzt. Das Transfektionsgemisch wurde nach 4h durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur Ernte weitere 24-48h inkubiert.

Transfizierte Zellen wurden entweder durch Luciferase-Reportergen-Analysen (siehe Kapitel 2.5.3) analysiert oder zu Gesamtzellprotein (siehe Kapitel 2.4.3.1) bzw. RNA (siehe Kapitel 2.4.2.1) weiterverarbeitet.

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde der Vektor mittels der Lipofektaminmethode in die Zellen eingebracht und durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikum zum Kulturmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. Das Selektionsantibiotikum wurde anhand des Resistenzgens im Vektor, der in die Zellen eingebracht wurde, ausgewählt.

Short-interfering RNAs (siRNA) wurden mittels der Nucleofector® Technology von Amaxa (Nucleofector Kit R, Programm T-20) in Melanomzellen transfiziert. Dazu wird das Prinzip der Elektroporation genutzt.

### **2.5.3 Luciferase-Reportergen-Assay**

Regulatorische DNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe von Reportergen Analysen untersuchen. Um die Aktivität eines Promotors zu untersuchen, wird ein DNA Fragment, das den Promotorbereich enthält, vor das Luciferase-Gen des Reporterplasmids pGL3-basic (siehe Kaptitel 2.1.6) 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 das Dual-Luciferase® Reporter Assay System der Firma Promega verwendet.

Hierfür wurden je 200.000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und nach der Lipofectamin Methode (siehe Kapitel 2.5.2) 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 300µl Lysispuffer (1:5 verdünnt, Promega, Heidelberg) zugegeben und die Zellen 20 Minuten bis zu zwei Stunden auf einem Schüttler lysiert. Nach der Lyse wurden je 50µl eines Versuchsansatzes, mit den im Kit bereitgestellten Chemikalien im Luminometer vermessen.

#### **2.5.4 Migrations- und Matrigel Invasions-Assay (Boyden Kammer)**

Der Migrations- bzw. Matrigel Invasions-Assay diente zur Untersuchung der 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 Stunden lang in Medium ohne FKS kultiviert, dieses Medium anschließend abgenommen, abzentrifugiert und für den Assay benutzt. Auf das konditionierte Medium im unteren Kompartiment wurde ein Filterpapier (Whatman International Ltd, Maidstone, England) mit einer Porengröße von 8 µm luftblasenfrei aufgelegt und der Aufsatz der Boydenkammer aufgeschraubt. Bei den Migrations Assays wurden die Filter zuerst mit Gelatine beschichtet (siehe Kapitel 2.3.2.1). Für die Invasions Assays wurden zusätzlich 52 µl Matrigel (1:3 verdünnt, BD Biosciences, USA) auf den Filter pipettiert und die Kammer leicht auf der Tischoberfläche aufgeklopft um das Gel gut zu verteilen. Das Gel wurde zum Gelieren für 30 Minuten 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 800µl pro Boydenkammer in das obere Kompartiment eingebracht und vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> 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 und blauer Färbelösung gefärbt, mit Leitungswasser gespült und mit der Unterseite nach oben auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurde die Anzahl der gewanderten Zellen im Mikroskop bestimmt.

### **2.5.5 Matrigel Invasions Assay (Transwell- System)**

Invasionsversuche mit Endothelzellen (HMEC-1) in Kombination mit Melanomzellen wurden im BioCoat<sup>TM</sup> Matrigel Invasion Chamber (BD, Bedford, USA) durchgeführt. Pro Well (24-Well Platte) wurden 60.000 Melanomzellen in 1ml DMEM ohne FKS ausgesät. 24h später wurde die Matrigel beschichtete Transwell-Kammer eingesetzt und mit 50.000 Endothelzellen in 1ml DMEM ohne FKS beladen. Die Invasion der Endothelzellen fand bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 22h statt. Die Färbung und Analyse der Filter der Transwell-Kammer erfolgte wie in 2.5.4 beschrieben.

### **2.5.6 Tuben-Formations Assay**

Der Tuben-Formations Assay wurde mit Endothelzellen (HMEC-1) bzw. mit Endothelzellen in Ko-kultur mit Melanomzellen durchgeführt. Dazu wurde jede Kammer eines acht Kammer Lab-Tek<sup>TM</sup> Objektträgers (Nunc, Wiesbaden) mit je 200µl Matrigel luftblasenfrei beschichtet. Anschließend wurden pro Kammer 80.000 Endothelzellen bzw. eine Mischung aus 40.000 Endothelzellen (Fluoreszenz-markiert siehe 2.5.7) mit 40.000 Melanomzellen in 400µl MCDB-131 ausgesät. Die Tubenbildung wurde nach 8h im Phasenkontrastmikroskop evaluiert und mit einer Digitalkamera (AxioCam, MR Grab, Carl Zeiss, München-Hallbergmoos) fotografiert. Die Tubenlänge pro Fläche wurde mit Hilfe der Image J Software (frei zugänglich auf der Webpage des National Institutes of Health unter: <http://rsb.info.nih.gov/ij>) bestimmt.

### **2.5.7 CFSE- Fluoreszenz Färbung für Proliferationsanalyse und Tuben-Formations Assay**

Zur Proliferationsanalyse bzw. zur Fluoreszenzmarkierung von Zellen wurde der Farbstoff CFSE (5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) benutzt. CFSE tritt durch die Zellmembran in das Zytoplasma der Zellen und die Succinimidyl-Estergruppe reagiert dort mit freien Aminogruppen von intrazellulären Proteinen zu einem Fluoreszenzfarbstoff-Protein Komplex. Dieser Farbstoffkomplex im Zytoplasma wird bei der Zellteilung zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben und verdünnt sich während der Proliferation der Zellen. Diese Verdünnung lässt sich in Durchflusszytometrischen Messung erfassen und daraus die Proliferationsrate ermitteln (Lyons 2000). Pro Färbung wurden 2-5 Mio Zellen geerntet (siehe Kapitel 2.5.1), zweimal in PBS gewaschen und in einer 2µM CFSE Lösung für 4min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von PBS + 10% FKS gestoppt, nicht aufgenommenes CFSE wurde durch zwei Waschschrte mit PBS entfernt. Es wurden je 40.000 Fluoreszenz-markierte Zellen pro Ansatz des Tuben-Formations Assays eingesetzt. Die Proliferationsanalyse der Zellen wurde wie in Abschnitt 2.5.8 beschrieben durchgeführt.

### **2.5.8 Proliferationsanalyse mit der CFSE Methode**

Zur Proliferationsanalyse wurden je 800.000 CFSE markierte Melanomzellen (siehe Kapitel 2.5.7) in T25 Zellkulturflaschen ausgesät und die CFSE Menge an vier aufeinander folgenden Tagen durch Durchflusszytometrische Messungen im FACS Gerät (FACSCalibur System, BD Biosciences, San Jose, USA) gemessen. Die Analyse der Abnahme der CFSE Menge und die Berechnung der Zellteilungsrate erfolgte mit der CellQuest Software (BD Biosciences).

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der GraphPad Prism Software (GraphPad software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit dem ungepaartem t-Test ermittelt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.



Die Auswertung der Tissue Micro Arrays erfolgte mittels der SPSS Version 10.0 Software (SPSS Inc., Chicago, USA). Dabei wurde die statistische Assoziation von klinisch-pathologischen mit immunhistochemischen Parametern mit dem exakten Test nach Fisher untersucht. Die Überlebenskurven wurden nach der Methode von Kaplan-Meier berechnet.

### 3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Mechanismen der Entstehung und Progression des malignen Melanoms aufzuklären, um zu einem besseren Verständnis dieser Erkrankung beizutragen. Dabei stand die Analyse der BMP und TGF $\beta$  Signalkaskade und deren Vernetzung mit anderen Signalwegen im Vordergrund. Die Arbeit kann in dieser Hinsicht in drei Hauptpunkte untergliedert werden.

(1) Im ersten Teil der Arbeit wird die Expression und Funktion eines transkriptionellen Ko-Repressors der TGF $\beta$  Signalkaskade (Sno) im Melanom charakterisiert. Zusätzlich dazu wird der Einfluss des Proteins MIA auf die Expression und Aktivität von Signalmolekülen, Ko-Repressoren und Zielgenen des TGF $\beta$  Signalweges und die Auswirkung auf die Zellproliferation analysiert.

(2) Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle und Funktion von BMPs im Melanom. Dabei wird die Expression dieser Moleküle in Melanomzellen, normalen Melanozyten, Tumorgewebe und normaler Haut, sowie die Eignung von ausgewählten BMPs als prognostische Marker untersucht. Zusätzlich zu den Expressionsanalysen wird der Regulationsmechanismus von wichtigen BMPs analysiert. Des weiteren wird die funktionelle Rolle von BMPs in den Melanomzellen selbst und der Einfluss auf andere Zelltypen der Tumorumgebung charakterisiert.

(3) Im dritten Teil der Arbeit wird die Vernetzung der MAP Kinase Signalkaskade mit dem BMP Signalweg analysiert. Es wird dazu die Regulation von Kinasen und Zielgenen des MAPK Signalweges nach Stimulation mit FGF-2 und die daraus resultierende Auswirkung auf die Expression und Aktivität von BMPs untersucht.

## 4 Ergebnisse

Ein Großteil der Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, konnte bereits publiziert werden. Die Publikationen sind in Kapitel 6 aufgelistet.

Es konnte aufgeklärt werden, dass der transkriptionelle Ko-Repressor Sno die TGF $\beta$  Signalkaskade inhibiert und den Melanomzellen damit ermöglicht, sich anti-proliferativen Effekten durch TGF $\beta$  zu entziehen (Poser et al. 2005).

Des weiteren wurde der Einfluss von MIA auf den TGF $\beta$  Signalweg analysiert. Es konnte publiziert werden, dass MIA defiziente Melanomzellen, im Vergleich zur parentalen Zelllinie, die Ko-Repressoren Ski und Sno nicht exprimieren und die Signaltransduktion nach Aktivierung durch TGF $\beta$  in diesen Zellen wieder abläuft (Rothhammer und Bosserhoff 2006).

Im Rahmen der Analysen zur Rolle von BMPs im Melanom entstanden drei Publikationen. Dabei wurde zum einen die Expression von BMP-2, -4 und -7 untersucht und der Regulationsmechanismus von BMP-4 im Melanom aufgeklärt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BMPs die Invasivität von Melanomzellen fördern (Rothhammer et al. 2005). Eine zweite Studie beschäftigte sich mit dem Einfluss von BMPs auf die Tumorangiogenese. Dabei wurde eine pro-angiogenetische Funktion von BMPs im Melanom gefunden (Rothhammer et al. 2006), online Publikation vor dem Druck]. In einer dritten Studie an Gewebe- Arrays konnte BMP-7 als potentieller neuer prognostischer Marker für das rezidivfreie Überleben (recurrence free survival) bei Melanompatienten identifiziert werden [(Rothhammer et al. 2007) zur Publikation akzeptiert].

Die Daten zum Zusammenspiel von FGF-2 und BMPs wurden bisher noch nicht veröffentlicht, ein Manuskript dazu wird jedoch gerade vorbereitet.

Im folgenden werden die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, ausführlich beschrieben und im Hinblick auf Arbeiten von anderen Arbeitsgruppen diskutiert.

#### 4.1 Analyse der TGF-beta Signalkaskade

Im ersten Teil der Arbeit werden die Ergebnisse zur Regulation des TGF $\beta$  Signalweges im Melanom dargestellt. Dieser Teil setzt sich aus der Analyse von Expression und Funktion des Ko-Repressors Sno und dem Einfluss von MIA auf die TGF $\beta$  vermittelte Signaltransduktion zusammen.

##### 4.1.1 Expression und Funktion des transkriptionellen Ko-Repressors Sno

Es ist bekannt, dass der Ko-Repressor Ski von Melanomzellen exprimiert wird, um die TGF $\beta$  Signalkaskade zu inhibieren und damit die Zellen vor anti-proliferativen Effekten durch TGF $\beta$  zu schützen (siehe Kapitel 1.5.1). Die Analyse von Melanomzelllinien, die in unserem Labor zur Verfügung stehen, ergab jedoch, dass nur eine von neun Zelllinien Ski (Sk Mel 28) exprimiert. Bei allen anderen konnte weder mRNA noch Protein nachgewiesen werden (Abbildung 4-1).

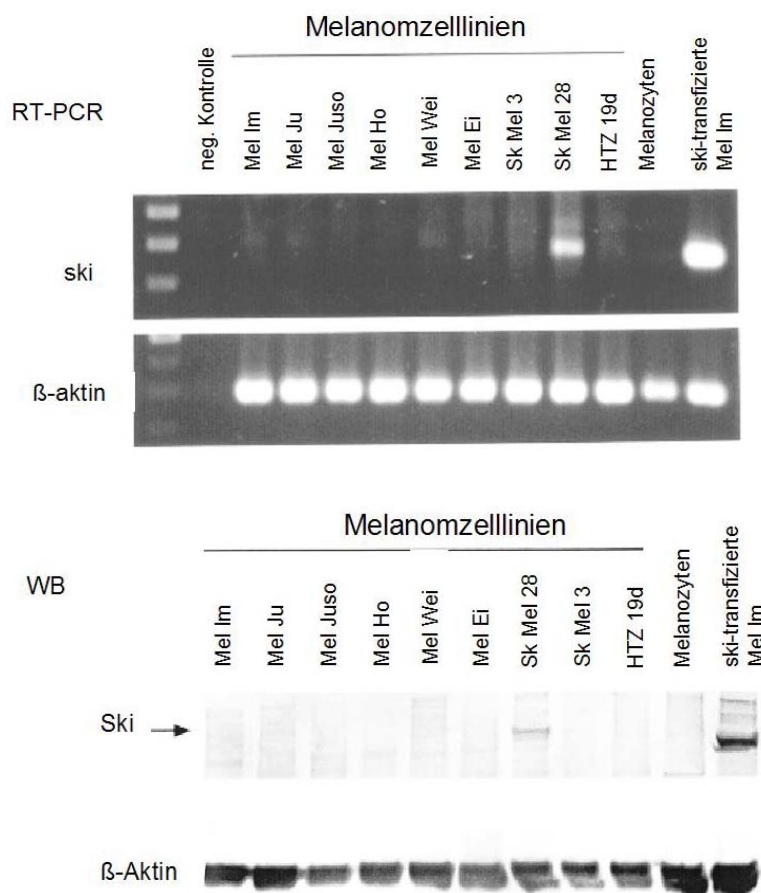
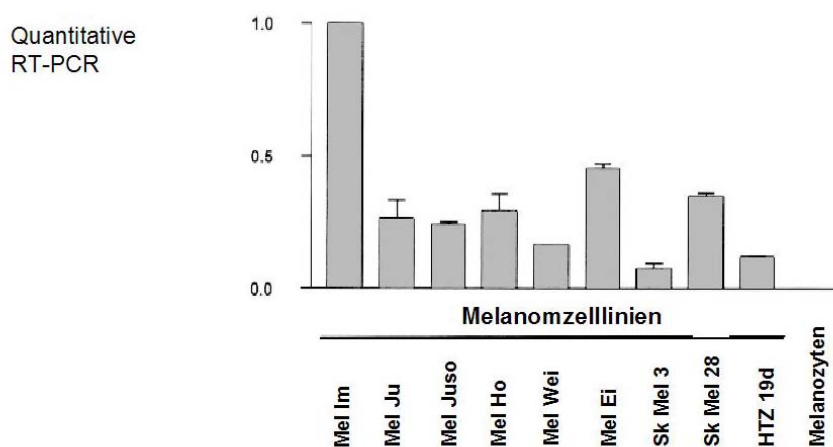


Abbildung 4-1: **Analyse der Ski Expression in neun Melanomzelllinien und normalen Melanozyten.** Nur die Zelllinie Sk Mel 28 exprimiert ski mRNA und Ski Protein.  $\beta$ -Aktin dient

als Ladekontrolle für die Proteinanalyse und als Kontrolle für die Qualität der cDNA Präparation bei der RT-PCR Analyse (Poser et al. 2005).

Da der transkriptionelle Ko-Repressor Ski in den meisten Melanomzelllinien nicht exprimiert wird, würde man erwarten, dass in diesen Zellen eine intakte TGF $\beta$  Signalkaskade vorliegt. Analysen mit einem TGF $\beta$  aktivierbaren Luciferase Reporterkonstrukt [(CAGA)<sub>9</sub>- Luc Konstrukt] zeigten jedoch, dass der Signalweg nicht aktiv und nicht aktivierbar war. Mutationen im TGF $\beta$  Rezeptor II konnten durch Sequenzierung relevanter Bereiche ausgeschlossen werden. Untersuchungen zum Smad Phosphorylierungsstatus detektierten phosphoryliertes Smad 2 in Melanomzellen, was auf eine Rezeptoraktivierung mit anschließender Smad Phosphorylierung hindeutet. Die Inhibition des Signalweges musste folglich nach der Smad Phosphorylierung, durch einen Repressor der analoge Funktion zu Ski aufweist, erfolgen. Es war daher naheliegend, die Expression des Ski Familienmitglieds Sno zu analysieren. Alle analysierten Melanomzelllinien exprimierten detektierbare Mengen an Sno mRNA und Protein, in normalen Melanozyten hingegen, war kein Sno nachweisbar (Abbildung 4-2).



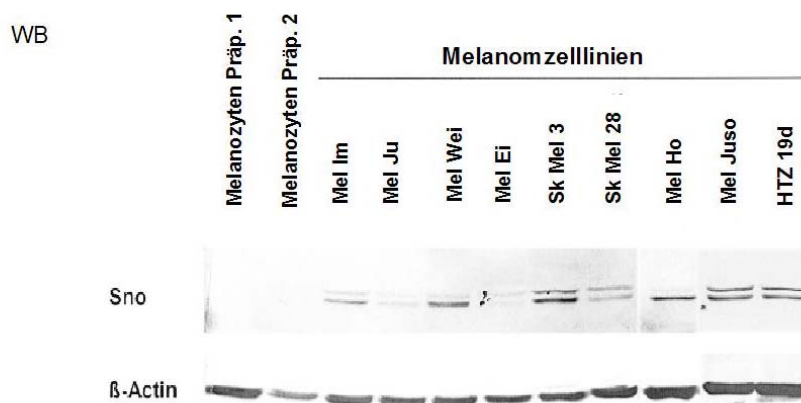


Abbildung 4-2: **Analyse der Sno Expression in Melanomzelllinien und normalen Melanozyten.** Alle analysierten Melanomzelllinien exprimieren detektierbare Mengen an Sno mRNA (Quantitative RT-PCR Analyse) und Protein (WB Analyse). In normalen Melanozyten konnte keine Expression nachgewiesen werden.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle für die Westernblot Analyse (Poser et al. 2005).

Zur näheren Charakterisierung der Funktion von Sno, wurden Zellklone generiert, die stabil mit einem antisense Sno Konstrukt transfiziert wurden und folglich eine verminderte Expression von Sno zeigten (Abbildung 4-3).

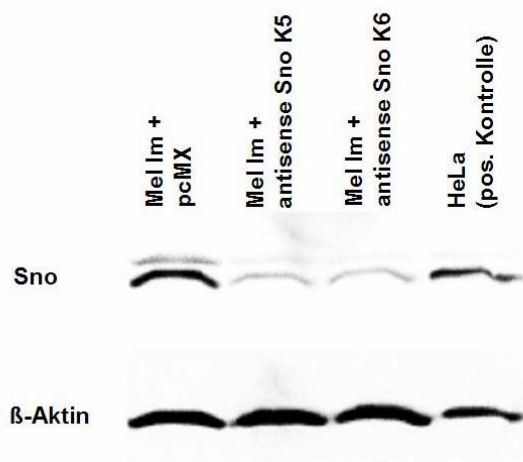


Abbildung 4-3: **Westernblot Analyse der Sno Expression in antisense Sno Zellklonen.** Die stabil transfizierten antisense Sno Zellklone zeigen verminderte Sno Protein Expression im Vergleich zur Kontrolle (Mel Im + pcMX).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle (Poser et al. 2005).

In funktionellen Studien wurde die Proliferation dieser Zellklone untersucht. Es konnte dabei eine deutlich verminderte Proliferation in den antisense Sno Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, detektiert werden (Abbildung 4-4).

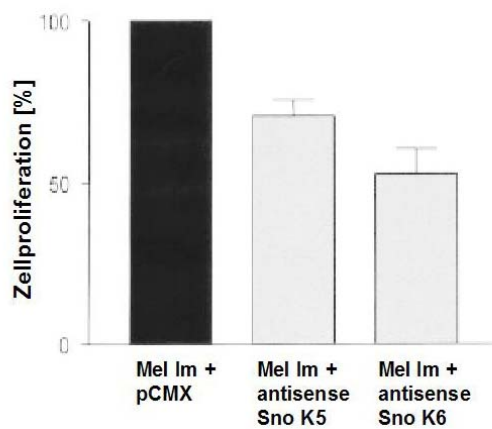


Abbildung 4-4: **Proliferation der antisense Sno Zellklone.** Die antisense Sno Zellklone (Klon 5 und 6) zeigen eine deutlich verringerte Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle (Mel Im + pCMX) (Poser et al. 2005).

Es ist bekannt, dass Ski die Expression des Zellzyklus- Inhibitors  $p21^{WAF1}$  hemmt und somit die Melanomzellen vor anti-proliferativen Effekten durch TGF $\beta$  schützt (siehe Kapitel 1.4.3). Die verminderte Proliferationsrate der antisense Sno Zellklone lässt einen ähnlichen Effekt durch den Ko-Repressor Sno vermuten. Die Analyse der  $p21^{WAF1}$  Expression ergab jedoch keinen Unterschied zwischen den antisense Sno Zellklonen und den Kontrollen. Zusätzliche Analysen von  $p15^{INK4B}$ ,  $p27^{KIP1}$  und  $p57^{KIP2}$  zeigten auch keine Regulation der Expression dieser Zellzyklus-Inhibitoren (Abbildung 4-5).

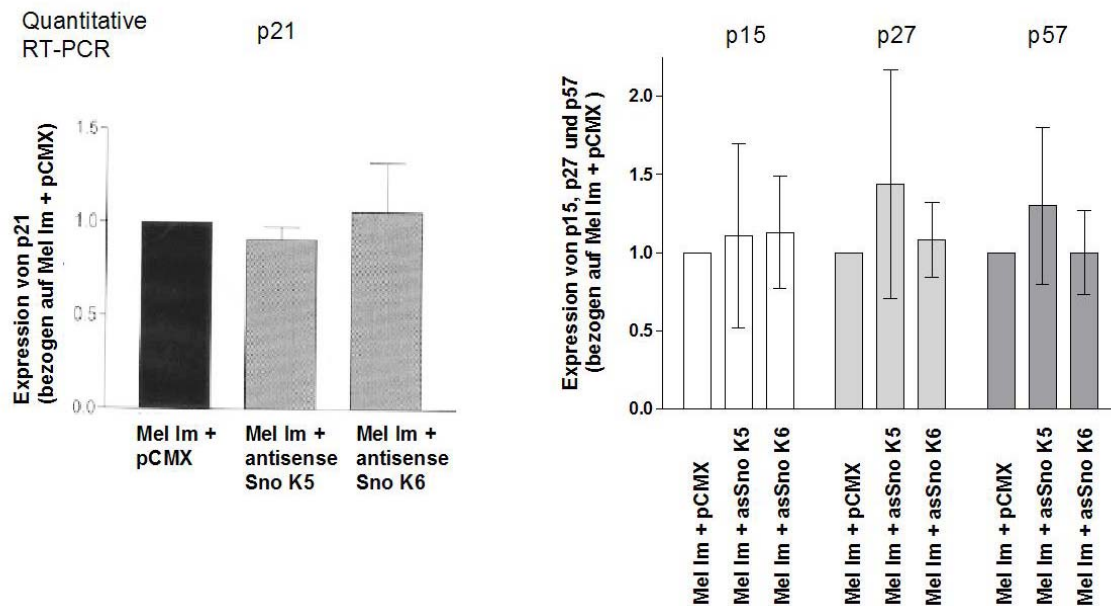


Abbildung 4-5: **Expressionanalyse der Zellzyklus-Inhibitoren p21<sup>WAF1</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p27<sup>KIP1</sup> und p57<sup>KIP2</sup> in antisense Sno Zellklonen.** Quantitative RT-PCR Analysen zeigten keine Unterschiede in der Expression der vier analysierten Zellzyklus-Inhibitoren zwischen den antisense Sno und den kontroll-transfizierten Zellklonen (Poser et al. 2005).

Ein weiteres Zielgen der TGF $\beta$  Signalkaskade, Id-1 (inhibitor of DNA binding 1), zeigte eine verstärkte Expression in den antisense Sno Zellklonen (Abbildung 4-6).

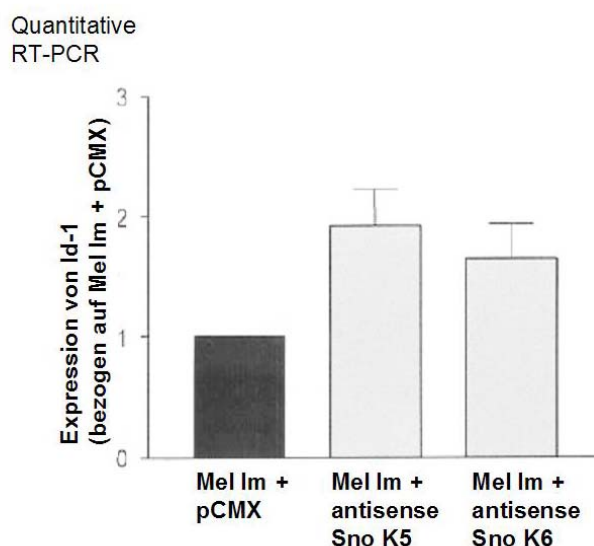


Abbildung 4-6: **Expression von Id-1 in antisense Sno Zellklonen.** In quantitativen RT-PCR Analysen zeigte sich eine verstärkte Id-1 Expression in den antisense Sno Zellklonen im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression von Id-1 wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert (Poser et al. 2005).



Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass Melanomzellen den transkriptionellen Ko-Repressor Ski oder Sno exprimieren, um sich vor anti-proliferativen Effekten durch TGF $\beta$  zu schützen. Der Mechanismus der Regulation ist dabei unterschiedlich. Ski reguliert die Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21<sup>WAF1</sup> (Medrano 2003), Sno hingegen kann die untersuchten Zellzyklus-Inhibitoren (p15<sup>INK4B</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> und p57<sup>KIP2</sup>) nicht regulieren. Es zeigte sich jedoch ein Einfluss von Sno auf die Expression des TGF $\beta$  Zielgenes Id-1.

#### **4.1.2 Einfluss von MIA auf die TGF beta vermittelte Signaltransduktion**

In vorangegangenen Studien wurde der Einfluss von MIA auf die Zellmorphologie, die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten und die Expression von Melanom-assoziierten Genen untersucht (siehe Kapitel 1.4.5). Die folgenden Analysen beschäftigen sich nun mit den Veränderungen in der TGF $\beta$  Signaltransduktion, in MIA defizienten Melanomzellklonen, die in vorangegangenen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe generiert wurden. Dazu wurde die Melanomzelllinie HMB2 stabil mit einem antisense MIA Konstrukt transfiziert und Zellklone ausgewählt, die keine MIA Expression mehr aufweisen.

Untersuchungen der MIA defizienten Melanomzellen mit einem TGF $\beta$  responsivem Luciferase Reporterkonstrukt [(CAGA)<sub>9</sub>-Luc Konstrukt] zeigten, dass nach Stimulation mit TGF $\beta$  die Luciferaseaktivität in MIA negativen Zellklonen zunahm. In den Kontrollzellen (Wildtyp, kontroll-transfizierte HMB2 + lacZ3) konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Abbildung 4-7).

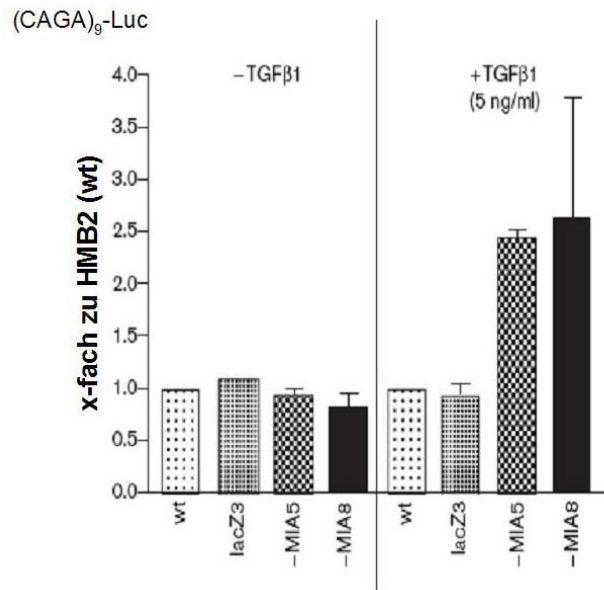


Abbildung 4-7: **Aktivität des TGFβ responsiven Luciferasekonstruktes (CAGA)<sub>9</sub>-Luc in MIA defizienten Zellklonen.** Nach Stimulation mit TGFβ konnte eine gesteigerte Luciferaseaktivität in den MIA negativen Zellen (-MIA5, -MIA8), nicht jedoch in den Kontrollen (wt, lacZ3) detektiert werden (Rothhammer und Bosserhoff 2006).

Analysen der TGFβ Zielgene JunB und Id-1 ergaben eine 10 bzw. 15fach stärkere Expression beider Gene, in MIA defizienten Zellen verglichen mit den Kontrollen. Die zusätzliche Stimulation mit TGFβ steigerte die Expression in MIA negativen Zellen auf das 50- 100fache. In den Kontrollzellen konnte keine Expressionssteigerung induziert werden (Abbildung 4-8).

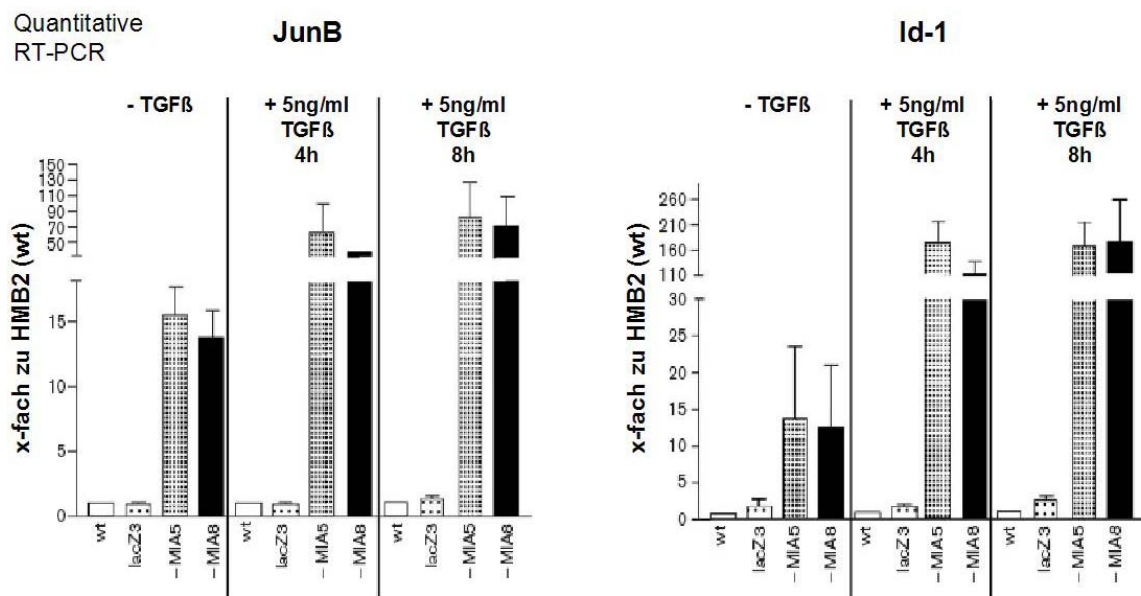


Abbildung 4-8: **Expression der TGF $\beta$  Zielgene junB und id-1 in MIA defizienten Klonen im Vergleich zu den Kontrollzellen.** MIA negative Zellen weisen ohne Zugabe von TGF $\beta$  eine 10-15fach stärkere Expression von junB bzw. id-1 im Vergleich zu den Kontrollen auf. Stimuliert man die Zellen zusätzlich mit 5ng/ml TGF $\beta$  kann die Genexpression bis zu 70fach (junB) bzw. 160fach (id-1) gegenüber den Kontrollen gesteigert werden. Die Genexpression wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert (Rothhammer und Bosserhoff 2006).

Funktionelle Analysen der antisense MIA Zellklone zeigten eine verminderte Proliferation in diesen Zellen. Die wildtyp Zellen HMB2 benötigten  $25,58 \pm 0,66$  h und die kontroll-transfizierten HMB2 lacZ3  $27,75 \pm 0,19$  h pro Verdopplungszyklus. Die MIA defizienten Zellklone proliferierten deutlich langsamer, eine Verdopplung dauerte  $35,36 \pm 2,02$  h (HMB2 –MIA5) bzw.  $45,78 \pm 0,77$  h (HMB2 –MIA8) (Rothhammer und Bosserhoff 2006).

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, welche Faktoren der TGF $\beta$  Signalkaskade durch MIA reguliert werden können. Eine Möglichkeit sind die Ko-Repressoren Ski und Sno, die im Melanom für die Unterbrechung des TGF $\beta$  Signalweges verantwortlich sind. Die folgenden Experimente untersuchen, ob die Expression dieser Faktoren durch MIA modifiziert werden kann.

In der wildtyp Zelllinie HMB2 und in der Transfektionskontrolle wurde sowohl Ski und Sno mRNA als auch Protein detektiert. In den MIA negativen Zellklonen hingegen, konnte weder Ski noch Sno nachgewiesen werden (Abbildung 4-9). Transfiziert man die wildtyp Zelllinie HMB2 mit einem Expressionskonstrukt, das die gesamte kodierende Sequenz von MIA enthält, kann die Expression von Ski und Sno induziert werden (Daten nicht gezeigt). MIA scheint somit für die Regulation der Expression von Ski und Sno eine wichtige Rolle zu spielen.

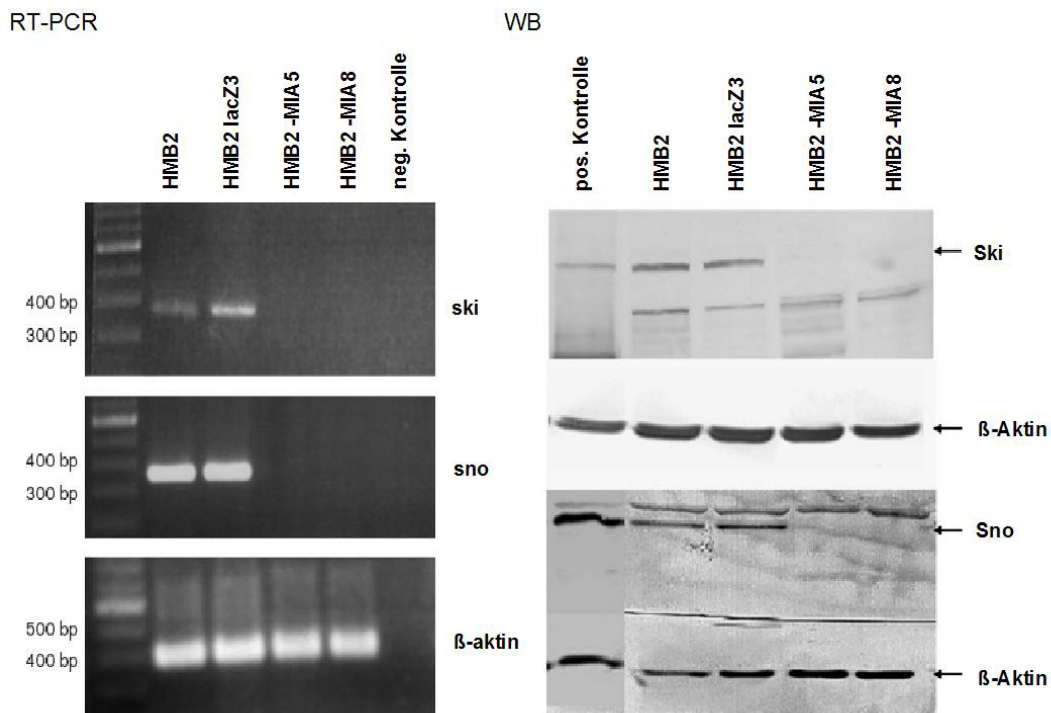


Abbildung 4-9: **Expressionsanalyse von Ski und Sno in MIA defizienten Melanomzellen.**

Mittels RT-PCR konnte ski und sno in der wildtyp Zelllinie HMB2 und im kontroll-transfizierten HMB2 lacZ3 Zellklon nachgewiesen werden. In den MIA negativen Zellklonen wird weder ski noch sno exprimiert. Die Analyse der Proteinexpression zeigte, analog zur RT-PCR, Expression von Ski und Sno in den Kontrollen nicht jedoch in den antisense MIA Zellklonen.  $\beta$ -Aktin wurde benutzt um die Qualität der cDNA zu gewährleisten (RT-PCR), bzw. als Ladekontrolle für gleiche Proteinmengen (WB) (Rothhammer und Bosserhoff 2006).

Daraus ergibt sich die Frage, wie MIA die Expression von Ski und Sno beeinflussen kann. Es ist bekannt, dass Melanomzellen eine konstitutiv aktive MAPK/ ERK Signalkaskade besitzen (siehe Kapitel 1.4.4). Frühere Untersuchungen der antisense MIA Zellklone zeigten, dass in diesen Zellen der MAPK/ ERK Signalweg, nicht ständig aktiv vorliegt (Tatzel et al. 2005). Eine Möglichkeit der Regulation von Ski und Sno wäre daher über die MAPK/ ERK Signalkaskade. Um zu testen, ob dieser Signalweg bei der Expression der beiden Ko-Repressoren eine Rolle spielt, wurden HMB2 Zellen mit dem MEK Inhibitor UO126 behandelt. Der Inhibitor UO126 inhibiert die Funktion der Kinasen MEK 1 und 2 und blockiert damit die Phosphorylierung und Aktivierung der nachfolgenden ERK Kinasen. Es zeigte sich das die Behandlung von HMB2 Zellen mit UO126 zu einer Verringerung der ski und sno Expression um 40% führte (Abbildung 4-10).

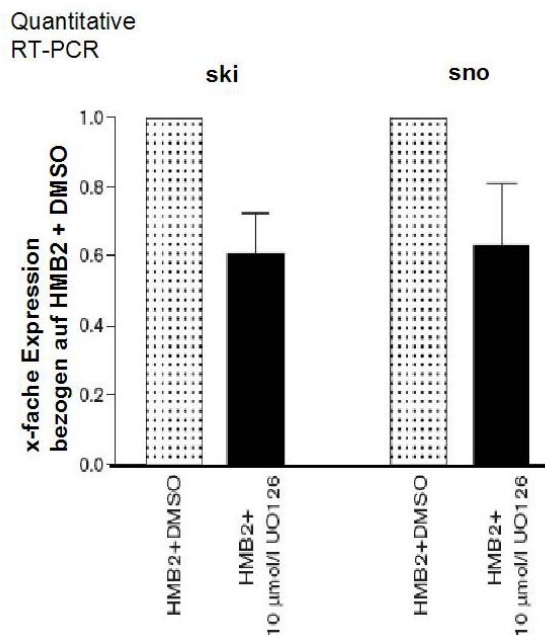


Abbildung 4-10: **Expression von ski und sno in HMB2 Zellen nach Behandlung mit dem MEK Inhibitor UO126.** Die mit UO126 behandelten Zellen zeigen eine Reduktion der ski und sno Expression um 40%, im Vergleich zu den kontroll behandelten HMB2. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel DMSO (**D**imethyl**s**ulfo**x**id). Die Expression der Ko-Repressoren wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert (Rothhammer und Bosserhoff 2006).

Aus diesen Analysen geht hervor, dass MIA die Aktivität der TGF $\beta$  Signalkaskade im Melanom über die Expression der Ko-Repressoren Ski und Sno modifizieren kann. Die Regulation dieser Expression findet dabei über den MAPK/ ERK Signalweg statt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MIA, durch Aktivierung der Expression von Ko-Repressoren am Schutz der Melanomzellen vor anti-proliferativen Stimuli durch TGF $\beta$  beteiligt ist.

#### 4.2 Expression und Funktion von *bone morphogenetic proteins* (BMPs) im malignen Melanom

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass BMPs nicht nur eine wichtige Rolle bei der Induktion von Knochen und Knorpel spielen, sondern auch an der Entstehung und Progression unterschiedlicher Krebsarten beteiligt sind (siehe Kapitel 1.5.2). In den nachfolgenden Kapiteln werden nun die Ergebnisse zur Expression, Regulation und Funktion der BMPs im malignen Melanom dargestellt. Zusätzlich dazu wird die Eignung einzelner BMPs als prognostische Marker analysiert.

#### 4.2.1 Analyse der BMP Expression

Die Expression von vierzehn BMPs (BMP-2- -15) wurde mittels RT-PCR, bzw. quantitativer RT-PCR, in neun verschiedenen Melanomzelllinien und jeweils drei Präparationen von humanen Melanozyten analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 dargestellt, wobei die differentiell exprimierten BMPs farblich markiert sind.

	Melanomzellen	Melanozyten
<b>BMP-2</b>	-*	-
<b>BMP-3</b>	-	-
<b>BMP-4</b>	+	(+)
<b>BMP-5</b>	-	-
<b>BMP-6</b>	+	-
<b>BMP-7</b>	+	-
<b>BMP-8</b>	+	(+)
<b>BMP-9</b>	+	+
<b>BMP-10</b>	+	(+)
<b>BMP-11</b>	+	+
<b>BMP-12</b>	-	+
<b>BMP-13</b>	+	-
<b>BMP-14</b>	+	(+)
<b>BMP-15</b>	+	+

Tabelle 4-1: **Expression von BMP-2– -15 in Melanomzellen und normalen Melanozyten.**

Die Expression wurde mittels RT-PCR bzw. quantitativer RT-PCR analysiert. -: nicht exprimiert, (+): schwache Expression, +: starke Expression. Die differentiell exprimierten BMPs sind farblich markiert. \*: nur die Melanomzelllinien SK Mel 28 und Mel Ei exprimieren BMP-2

Die Expression von BMP-4 und BMP-7 wurde zusätzlich an Gewebeschnitten von normalen Nävi, Primärmelanomen und Metastasen mittels Immunhistochemie analysiert. Dabei zeigte sich, dass beide Proteine in Nävi nicht oder nur sehr schwach, in Primärmelanomen jedoch sehr stark exprimiert werden. In Metastasen konnte eine moderate BMP-4 und eine starke BMP-7 Expression detektiert werden (Rothhammer et al. 2005).

#### 4.2.2 Regulation der BMP Expression

In ersten Analysen wurde die Expression verschiedener BMPs im Melanom untersucht. Für BMP-2, -4, -7 wurde detailliert der Regulationsmechanismus der Expression analysiert. Dazu wurden Promotorfragmente von BMP-2, -4 und -7 (BMP-2: 2225bp, BMP-4: 1618bp, BMP-7: 2255bp) in den Luciferase Reporter Vektor pGL3 basic kloniert (zur Verfügung gestellt von Markus Moser, siehe Kapitel 2.1.6). Anschließend wurde die Aktivität dieser Promotorkonstrukte in sechs verschiedenen Melanomzelllinien untersucht. Das BMP-2 Promotorkonstrukt war nur in SK Mel 28 Zellen, die auch als einzige Melanomzelllinie BMP-2 exprimieren, aktiv. Das BMP-4 Promotorkonstrukt hingegen war in allen analysierten Zelllinien stark aktiv. Es wurde eine Aktivierung um 30-45fach gegenüber den Kontrollen detektiert. Für das BMP-7 Promotorkonstrukt konnte ebenfalls eine Aktivierung nachgewiesen werden (2-11fach), die jedoch weniger stark war als für BMP-4 (Abbildung 4-11).

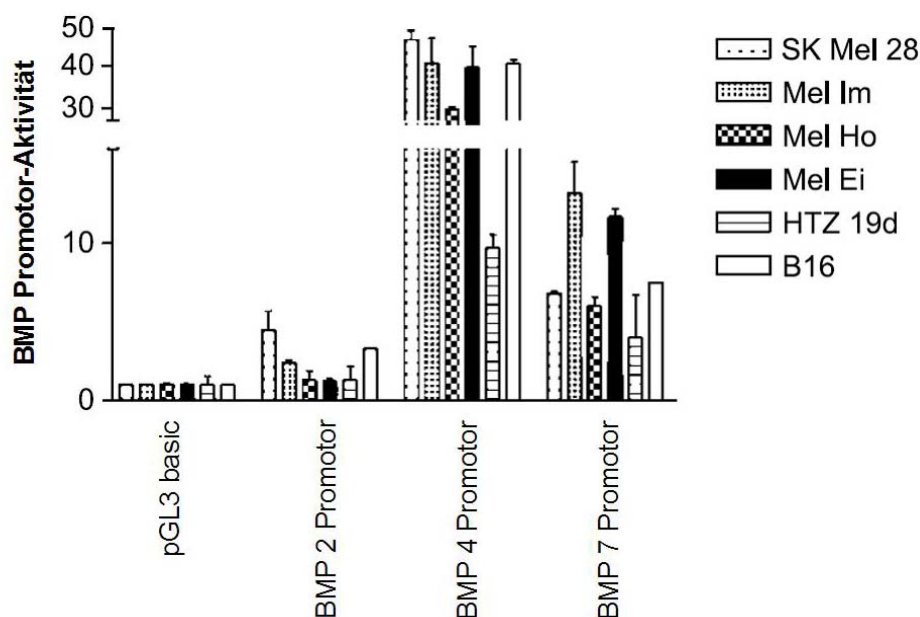


Abbildung 4-11: **Analyse der BMP-2, -4 und -7 Promotorregionen in sechs verschiedenen Melanomzelllinien.** Das BMP-2 Promotorkonstrukt zeigt nur in SK Mel 28 geringe Aktivität wohingegen die BMP-4 und -7 Konstrukte in allen Zelllinien stark aktiv sind. Der Leervektor pGL3 basic dient als negativ Kontrolle (Rothhammer et al. 2005).

Die starke Aktivierung des BMP-4 Promotorkonstruktes sollte nun genauer untersucht werden. Computergestützte Analysen des BMP-4 Promotors, nach potentiellen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, zeigten zwei Bereiche auf, in

denen jeweils eine Ets-1 und AP-2 alpha Bindestelle (-237- -221; -152- -138) in enger Nachbarschaft liegen. Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Ets-1 im Melanom überexprimiert wird und als positiver Regulator für eine Reihe von Genen, die in der Tumordinvasion und Metastasierung eine Rolle spielen, fungiert (Oikawa 2004; Rothhammer et al. 2004). Die Expression von AP-2 alpha hingegen geht im Laufe der Melanomprogression verloren (siehe Kapitel 1.4.2). Es sollte daher analysiert werden, ob AP-2 alpha und Ets-1 die BMP-4 Expression regulieren können. Um die Relevanz der Ets-1/ AP-2 alpha Bindestellen für die Promotoraktivierung zu untersuchen, wurden diese Stellen im Promotorbereich verändert. Dazu wurde die Ets-1/ AP-2 Bindestelle durch die Sequenz der EcoRI Schnittstelle (GAA TTC) ausgetauscht (Konstrukte zur Verfügung gestellt von Markus Moser, siehe Kapitel 2.1.6).

Die Aktivität der veränderten Konstrukte wurde in der Zelllinie Mel Im analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Austausch der ersten Ets-1/ AP-2 Bindestelle (-237) einen fast kompletten Verlust der Promotoraktivität zur Folge hatte. Die Veränderung der zweiten Bindestelle (-152) führte zu einer Reduktion der Promotoraktivität um 40% (Abbildung 4-12). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Bindestellen eine Rolle bei der Regulation des BMP-4 Promotors spielen.

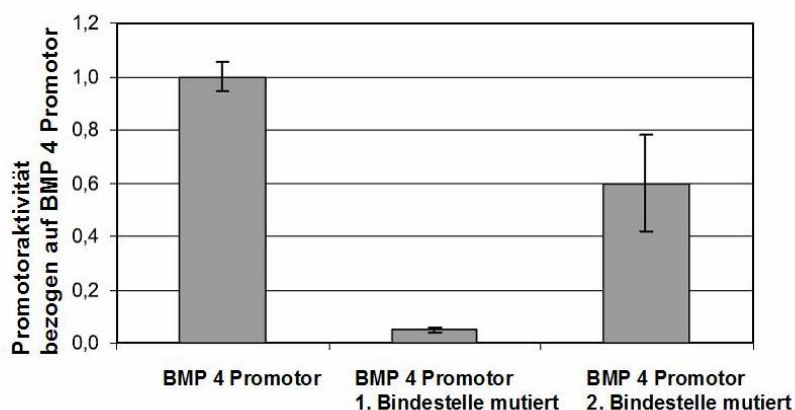


Abbildung 4-12: **Promotoraktivität des BMP-4 Promotors und der mutierten Promotorkonstrukte.** Die Sequenz des BMP-4 Promotors wurde an Stelle -237 (1. Bindestelle mutiert) und -152 (2. Bindestelle mutiert) mutiert. Dies führte an der 1. Bindestelle zu einem fast kompletten Verlust der Promotoraktivität, an der 2. Bindestelle zu einer Reduktion der Aktivität um 40% (Rothhammer et al. 2005).

Zur Analyse der Regulation der BMP-4 Promotoraktivität durch AP-2 alpha wurde ein AP-2 alpha Expressionskonstrukt zusammen mit dem BMP-4 Reporterkonstrukt in



die Melanomzelllinie Mel Im transfiziert. Dabei zeigte sich mit steigender AP-2 alpha Konzentration eine Dosis abhängige Abnahme der Luciferase Aktivität. AP-2 alpha hat somit eine reprimierende Funktion auf den BMP-4 Promotor (Abbildung 4-13). Mit Hilfe von Chromatin- Immunpräzipitations-Analysen konnte die Bindung des potentiellen Regulators Ets-1, an beide Bindestellen im BMP-4 Promotor bewiesen werden (Rothhammer et al. 2005). Ko-transfektion von Melanomzellen mit einem antisense Ets-1 und dem BMP-4 Promotorkonstrukt, zeigten in antisense Ets-1 transfizierten Zellen eine verminderte Luciferase Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 4-13). Die Transfektion der Zellen mit einem Ets-1 Expressionskonstrukt zeigte keine stark aktivierenden Effekte (Daten nicht gezeigt). Dieses Phänomen wurde schon in früheren Studien beobachtet und ist wohl darauf zurückzuführen, dass Melanomzellen schon große Mengen an Ets-1 exprimieren und dies nicht mehr gesteigert werden kann (Rothhammer et al. 2004). In diese Analysen konnte Ets-1 als Aktivator des BMP-4 Promotors identifiziert werden.

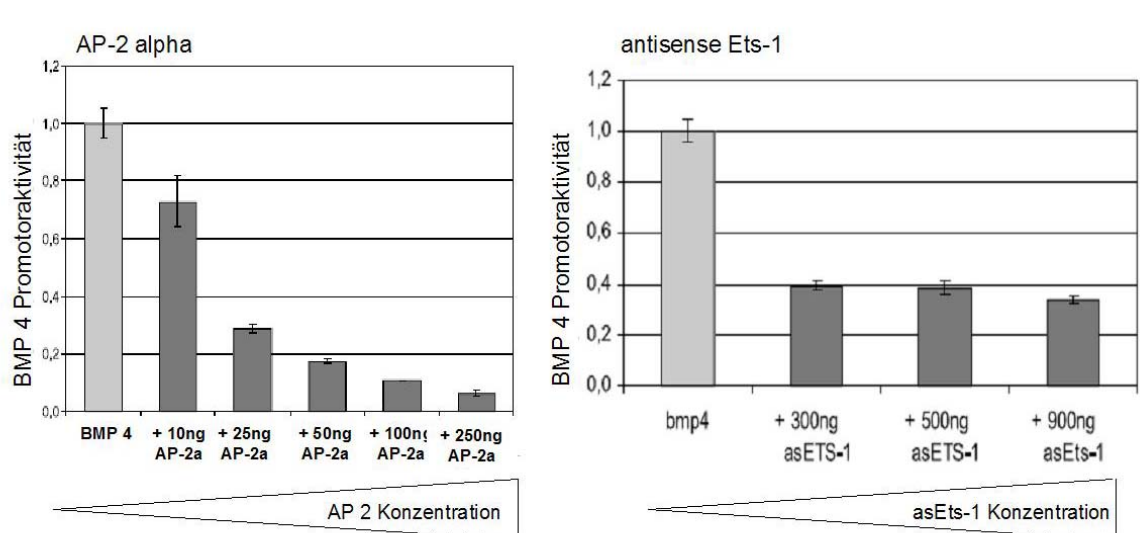


Abbildung 4-13: **BMP-4 Promotoraktivität nach Ko-transfektion mit AP-2 alpha bzw. antisense Ets-1.** Nach Transfektion mit einem AP-2 alpha Expressionskonstrukt zeigt sich eine Dosis abhängige Abnahme der BMP-4 Promotoraktivität. Eine Reduktion der Promotoraktivität ist auch nach Transfektion der Melanomzellen mit einem antisense Ets-1 Konstrukt zu detektieren (Rothhammer et al. 2005).

Analysen der BMP-4 Expression zeigten, analog zur Promotoranalyse, eine Reduktion der BMP-4 Expression nach Transfektion mit einem antisense Ets-1 Konstrukt (Abbildung 4-14).

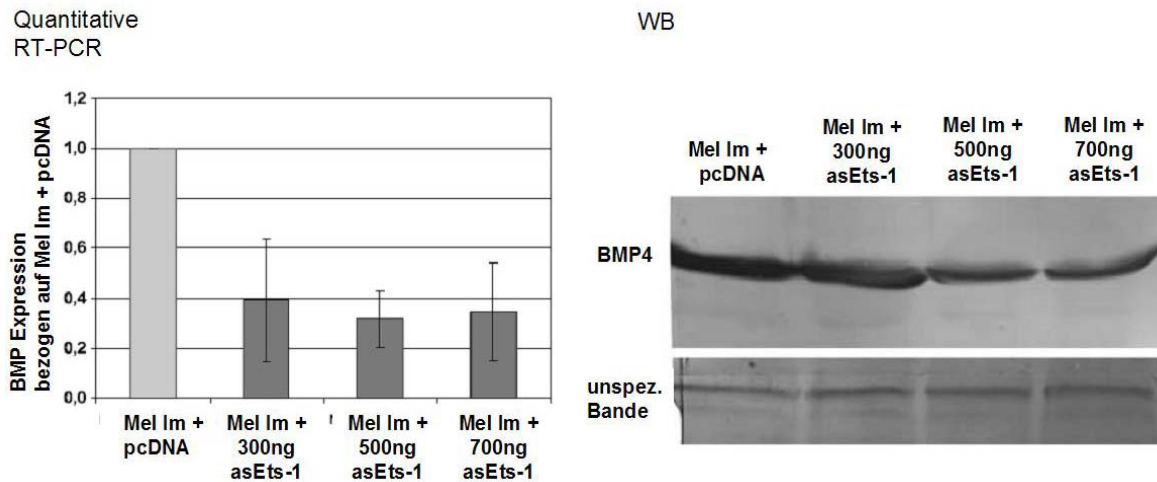


Abbildung 4-14: **Expression von BMP-4 nach Transfektion der Zelllinie Mel Im mit einem antisense Ets-1 Konstrukt.** Quantitative RT-PCR und Western Blot Analysen zeigen eine Reduktion der BMP 4 Expression nach Transfektion mit antisense Ets-1 (Rothhammer et al. 2005).

Aus den Analysen des BMP-4 Promotors geht hervor, dass die Ets-1/ AP-2 alpha Bindestellen wichtige Elemente für die Regulation der BMP-4 Expression darstellen. AP-2 alpha fungiert dabei als Repressor und Ets-1 als Aktivator der Transkription im Melanom. Auch im BMP-7 Promotor liegen potentielle AP-2 alpha und Ets-1 Bindestellen vor, die noch nicht analysiert wurden, aber einen ähnlichen Mechanismus vermuten lassen.

#### 4.2.3 Funktion von BMPs im Melanom

In funktionellen Analysen wurde der Einfluss von BMP-4 und -7, auf die Melanomzellen selbst und die Tumorumgebung, untersucht. Die Tumorumgebung enthält eine Vielzahl von Zelltypen, z.B. Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen. In ersten Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde der Einfluss von BMPs auf Endothelzellen analysiert.

##### 4.2.3.1 Autokrine Funktion von BMPs

Um die Rolle von BMPs in funktionellen Studien analysieren zu können, wurden verschiedene Zellkultur-Modellsysteme hergestellt. Es wurden stabile Melanomzellklone generiert, die eine verminderte BMP Aktivität aufweisen. Dabei

wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen wurde die Melanomzelllinie Mel Im stabil mit einem antisense BMP-4 (asBMP4) Konstrukt transfiziert, um spezifisch die Expression von BMP-4 zu inhibieren. Die Expression von BMP-4 konnte in diesen Zellklonen bis zu 70% im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen reduziert werden (Rothhammer et al. 2005). Für das zweite Modellsystem wurden Melanomzellen stabil mit einem Chordin Expressionskonstrukt transfiziert. Chordin ist ein BMP Inhibitor, der im extrazellulären Raum an BMP-2, -4 und -7 bindet und dadurch die BMP- Rezeptor Interaktion verhindert. Dabei ist nicht auszuschließen, dass Chordin neben BMP-2, -4 und -7 noch zusätzliche BMPs inhibieren kann. Die Chordin transfizierten Zellklone (CHRD) zeigten eine, bis zu 50% verringerte BMP Aktivität, welche durch ein BMP-responsives Luciferase Reporter genkonstrukt nachgewiesen wurde (Rothhammer et al. 2005).

Ein drittes Modellsystem wurde durch transiente Transduktion von normalen Melanozyten mit einem BMP-7 exprimierenden Adenovirus hergestellt.

In ersten Untersuchungen wurde die Invasivität der antisense BMP-4, Chordin überexprimierenden Zellklone und der BMP-7 transduzierten Melanozyten im Matrigel Boydenkammer Modell analysiert. Dabei zeigte sich, dass Melanomzellen mit verminderter BMP Aktivität ein deutlich geringeres Invasionspotential als die Kontrollzellen aufweisen (Abbildung 4-15). In den CHRD Zellklonen wurde eine 60%ige, in den asBMP4 Zellen sogar eine 70%ige Reduktion der Invasivität, im Vergleich zu den Kontrollzellen, detektiert.

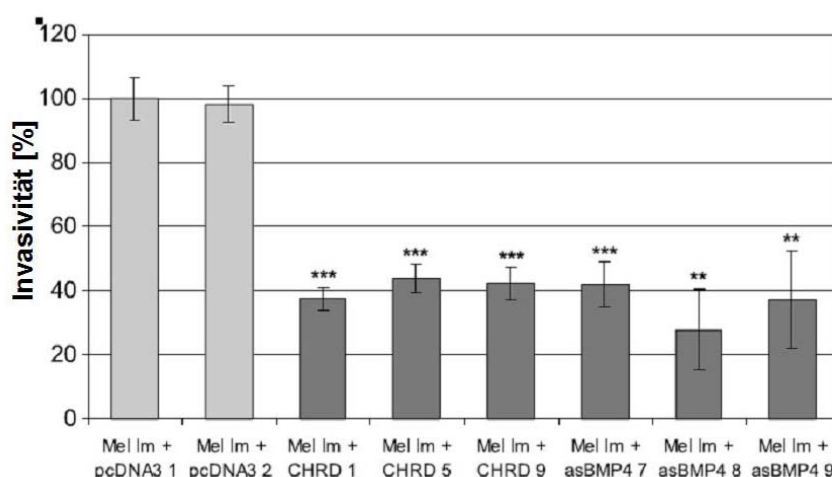


Abbildung 4-15: **Invasivität der antisense BMP-4 und Chordin überexprimierenden Zellklone im Vergleich zu den Kontrollzellen.** Zellklone mit verminderter BMP Aktivität (CHRD und asBMP4 Zellklone) zeigen eine starke Verminderung des Invasionspotentials im

Vergleich zu den Kontrollen (Mel Im + pcDNA3). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten t-Test durchgeführt. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  (Rothhammer et al. 2005).

Transduziert man normale Melanozyten, die selbst kein BMP-7 produzieren, mit einem BMP-7 exprimierenden Adenovirus, lässt sich die Invasivität dieser Zellen induzieren. Unbehandelte normale Melanozyten können die Matrigelschicht kaum durchdringen, um in das untere Kompartiment der Kammer einzuwandern. Die Expression von BMP-7 induziert jedoch einen stark invasiven Melanozyten-Phänotyp, der im Vergleich zu den Kontrollen (NHEM, NHEM + Ad-EGFP) ein größeres Invasionspotential aufweist. (Abbildung 4-16).

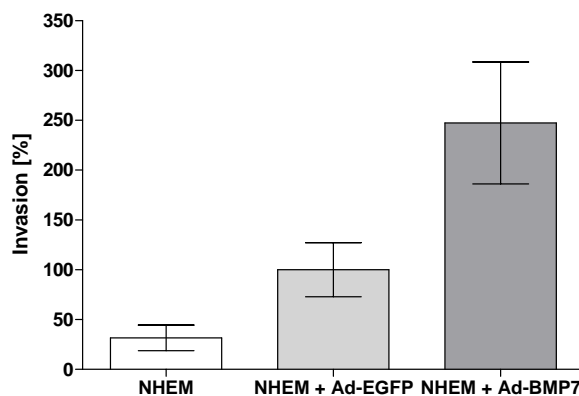


Abbildung 4-16: **Invasivität von BMP-7 transduzierten Melanozyten.** Melanozyten die mit einem BMP-7 exprimierenden Adenovirus transduziert wurden weisen eine verstärkte Invasivität im Vergleich zu den nicht behandelten NHEM und den kontroll-transduzierten Zellen auf. (NHEM: normale, humane, epidermale, Melanozyten)

Diese Experimente konnten zeigen, dass die Reduktion der BMP Aktivität in Melanomzellen eine verminderte Fähigkeit zur Invasion nach sich zieht. Exprimiert man hingegen BMP-7 in normalen Melanozyten, erhält man einen Zelltyp der eine verstärktes Invasionspotential aufweist.

In weiteren Analysen wurde die Proliferation der CHR1 und asBMP4 Zellklone untersucht. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Zellklonen mit verminderter BMP Aktivität festgestellt werden. Auch die Fähigkeit der Zellklone, ohne Zell-Matrix Adhäsion, Kolonien in Agar zu bilden (anchorage-independent growth), war nicht verändert. Es konnten keine Unterschiede, in Größe und Anzahl der Kolonien zwischen den Zellen mit

verringerten BMP Aktivität und den Kontrollen detektiert werden (Rothhammer et al. 2005).

Damit Tumore wachsen und metastasieren können, benötigen sie ein System das die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet. Es wurde gezeigt, dass Melanome auf zwei unterschiedliche Arten eine neue Mikrozirkulation ausbilden können. Zum einen kann der Tumor durch die Produktion und Freisetzung von pro-angiogenetischen Faktoren Blutgefäße aus dem bestehenden Gefäßsystem rekrutieren. Melanome besitzen jedoch zusätzlich die Fähigkeit, selbst eine Art Versorgungssystem aufzubauen. Sie bilden Kanäle aus extrazellulärer Matrix, gesäumt von Tumorzellen, durch die Nährstoffe und Sauerstoff transportiert werden können und imitieren damit die Struktur von normalen Blutgefäßen aus Endothelzellen. Dieser Prozess wird als „vasculogenic mimicry“ bezeichnet (Folberg und Maniotis 2004). Die Fähigkeit der Melanomzellen zur „vasculogenic mimicry“ kann *in vitro* auf Matrigel beschichteten Zellkulturflächen analysiert werden. Dabei bilden sich röhrenartige Netzwerke aus Melanomzellen.

Die Analyse der Melanomzelllinie Mel Im und der kontroll-transfizierten Zellen (Mel Im + pcMX1) zeigte, dass beide Zellpopulationen die Fähigkeit besitzen ein verzweigtes Netzwerk auf Matrigel beschichteten Objektträgern auszubilden. Die Chordin überexprimierenden (Mel Im + CHRD K1) und die antisense BMP-4 (Mel Im + asBMP4 K7 und K9) Zellklone waren dazu nicht in der Lage (Abbildung 4-17).

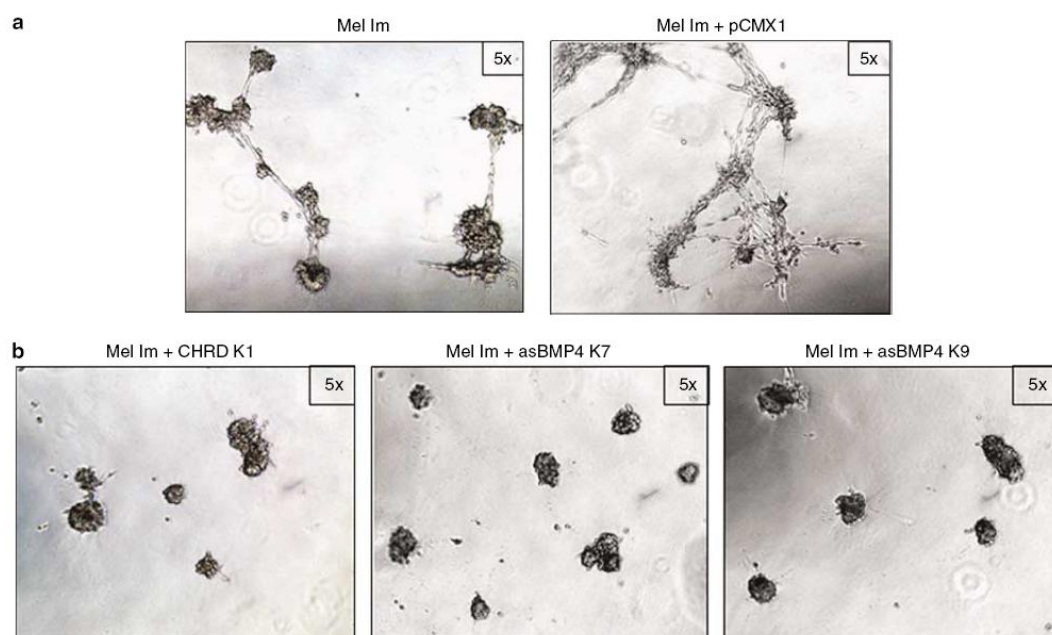


Abbildung 4-17: „Vasculogenic mimicry“ der Chordin überexprimierenden und antisense BMP-4 Zellklone. a) Die parentale Zelllinie Mel Im und die kontroll-transfizierten

Zellen (Mel Im + pCMX1) bilden eine röhrenartige Struktur auf dem Matrigel beschichteten Objekträger aus. b) Die CHRD bzw. asBMP4 Zellklone können diese Netzstruktur nicht bilden (Rothhammer et al. 2006).

Kultiviert man die Melanomzellklone zusammen mit Endothelzellen (HMEC, **h**uman **m**icrovascular **e**ndothelial **c**ells) bilden sich kooperative Netzwerke zwischen den Kontrollzellen (Mel Im, Mel Im + pCMX1) und den Endothelzellen aus. Die CHRD und asBMP4 Zellklone können auch in Kooperation mit HMEC keine Netzwerke bilden. Des weiteren inhibieren sie auch die Ausbildung von Gefäß-ähnlichen Strukturen durch die Endothelzellen (Rothhammer et al. 2006).

Im Rahmen der Analyse der „vasulogenic mimicry“ wurde eine Reihe von Genen (ephA2, VE-Cadherin, laminin 5 gamma 2 Kette) beschrieben, die eine wichtige Rolle bei diesem Prozess spielen (Hendrix et al. 2003). Diese Gene wurden, zusammen mit weiteren Genen, die eine Rolle bei der Gefäßbildung spielen (id-1, tek), in den folgenden Studien analysiert.

Dabei zeigten sich keine Expressionsunterschiede der laminin 5 gamma 2 Kette in den CHRD bzw. asBMP4 Zellklonen verglichen mit den Kontrollen. Bei allen anderen Genen war die Expression, in den Zellen mit verminderter BMP Aktivität, geringer. Die Expression von ephA2 (epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase), id-1 (inhibitor of DNA binding 1), und tek (epithelial-specific protein receptor tyrosine kinase) war in den Chordin überexprimierenden und antisense BMP-4 Zellen deutlich reduziert, im Vergleich zu den Kontrollen. (Abbildung 4-18, a, c, d). Bei VE-Cadherin war die Reduktion der Expression in Mel Im + CHRD K1 geringer. Die antisense BMP-4 Zellklone zeigten jedoch auch eine deutliche Abnahme der Expression (Abbildung 4-18, b).

Weiterführende Analysen konnten zeigen, dass die Expression von id-1 direkt durch Stimulation mit rekombinantem BMP-4 induziert werden kann. Dies war zu erwarten, da id-1 als direktes Zielgen des BMP Signalweges beschrieben ist (ten Dijke et al. 2003). Bei ephA2, VE-Cadherin und tek lässt sich die Expression nicht direkt durch Stimulation der Zellen mit BMP-4 initiieren. Die veränderte Expression in den Zellklonen mit verminderter BMP Aktivität ist wohl sekundären Effekten, die noch genauer analysiert werden müssen, zuzuschreiben.

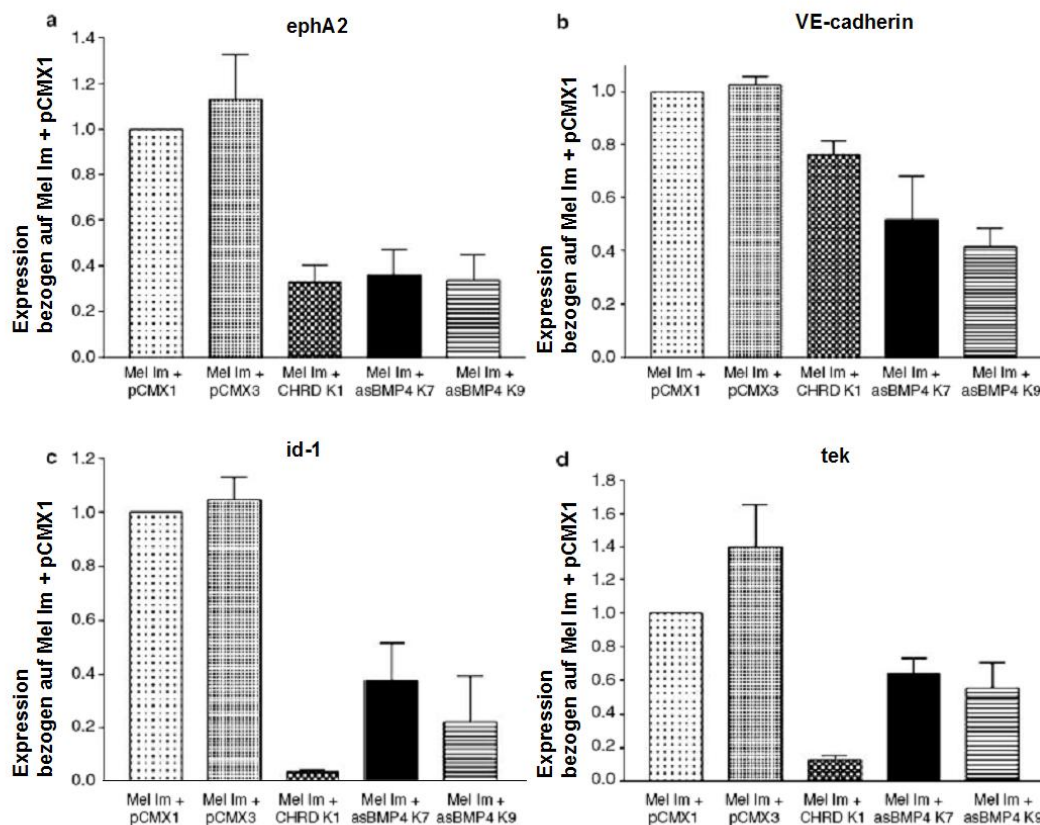


Abbildung 4-18: **Expression von ephA2 (epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase), VE-cadherin (vascular endothelial cadherin), id-1 (inhibitor of DNA binding 1), und tek (epithelial-specific protein receptor tyrosine kinase) in CHRD und asBMP4 Zellklonen.** Alle Zellklone mit verminderter BMP Aktivität zeigen eine verringerte Expression von ephA2, VE-cadherin, id-1 und tek verglichen mit den Kontrollzellen (Rothhammer et al. 2006).

Zusammenfassend ergibt sich, dass BMPs autokrin, stimulatorische Effekte auf Melanomzellen besitzen. Sie fördern die Invasivität der Melanomzellen und spielen eine Rolle bei der Bildung einer Gefäß-ähnlichen Mikrozirkulation („vasculogenic mimicry“).

#### 4.2.3.2 Parakrine Funktion von BMPs auf Endothelzellen

Eine wichtige Voraussetzung für das Wachstum und die Metastasierung eines Tumors ist die optimale Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Dabei spielt ein Mechanismus eine entscheidende Rolle: die Rekrutierung von Blutgefäßen aus dem bestehenden Gefäßsystem durch Produktion und Freisetzung von pro-angiogenetischen Faktoren. Da es sich bei BMPs um sezernierte Proteine handelt,



die parakrine Effekte hervorrufen können, wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss von BMPs auf die Tumorumgebung speziell die Endothelzellen analysiert. In ersten Experimenten wurde untersucht, ob rekombinantes BMP-2 und -4, die Bildung von Gefäß-ähnlichen Strukturen *in vitro* induzieren kann. Dazu wurden Endothelzellen (HMEC) auf Matrigel mit reduziertem Wachstumsfaktorgehalt ausgesät. Die Kontrollen wurden dabei nur in serumfreien Zellkulturmedium kultiviert. Die anderen Zellen wurden mit je 100ng/ml BMP-2 bzw. BMP-4 behandelt. Es zeigte sich sehr deutlich, dass unbehandelte Endothelzellen kaum röhrenartige Strukturen, die BMP behandelten Zellen hingegen ein verzweigtes Netzwerk, ausbilden konnten (Abbildung 4-19, a). Die Gesamttubenlänge pro Kulturfläche wurde zusätzlich mit einem Graphikprogramm (Image J, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) am Computer vermessen und im Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 4-19, b).

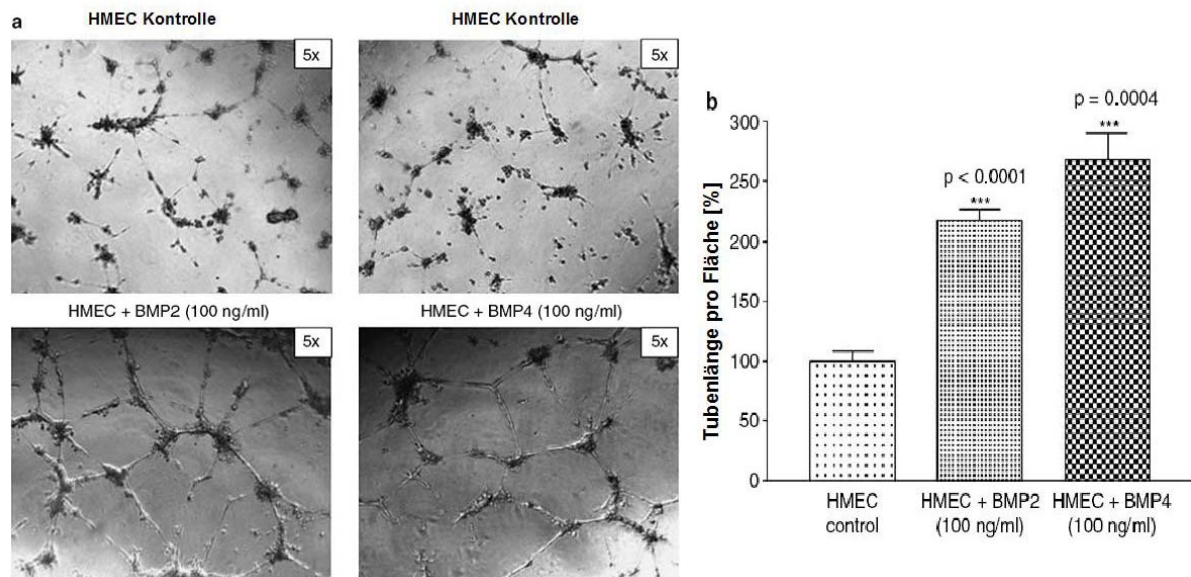


Abbildung 4-19: **Induktion der Tubenbildung durch BMP-2 und -4.** a) Phasenkontrast Aufnahme der Endothelzellkulturen auf Matrigel beschichteten Objektträgern. Bei den Kontrollen sind nur sehr wenige und kurze röhrenartige Strukturen zu erkennen. Die mit BMP-2 oder -4 behandelten Endothelzellen hingegen, bilden weit verzweigte Tubennetzwerke aus. b) Die Gesamttubenlänge pro Zellkulturfläche wurde mit Hilfe eines Graphikprogramms (Image J) am Computer analysiert und im Balkendiagramm aufgetragen. Die BMP-2 und BMP-4 behandelten Zellen zeigen eine signifikant größere Gesamttubenlänge als die Kontrollen. Die statistische Auswertung wurde mittels ungepaartem t-Test vorgenommen (Rothhammer et al. 2006).



In weiteren Analysen wurde untersucht, ob BMPs chemotaktische Eigenschaften besitzen. Dabei sollte geklärt werden, ob sie die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Endothelzellen beeinflussen können. Dazu wurde rekombinantes BMP-2 bzw. -4 in das untere Kompartiment des Boydenkammer Systems eingebracht und die Migration von HMEC analysiert. Es zeigte sich, dass beide BMPs als chemotaktische Faktoren die Migration der Endothelzellen induzieren (Abbildung 4-20, a). Analysiert man die Invasivität dieser Zellen im Transwell-System zusammen mit Melanomzellen, zeigt sich das BMPs auch eine Rolle in der Endothelzell-Invasion spielen. Dazu werden im unteren Kompartiment des Systems die verschiedenen Melanomzellklone ausgesät. Nach 24 Stunden wird der Matrigel beschichtete Filter mit den Endothelzellen eingebracht. Die Analyse der Invasivität ergab, dass weniger Endothelzellen in Richtung der Chordin überexprimierenden und der antisense BMP-4 Zellklone im Vergleich zu den Kontrollen gewandert waren (Abbildung 4-20, b).

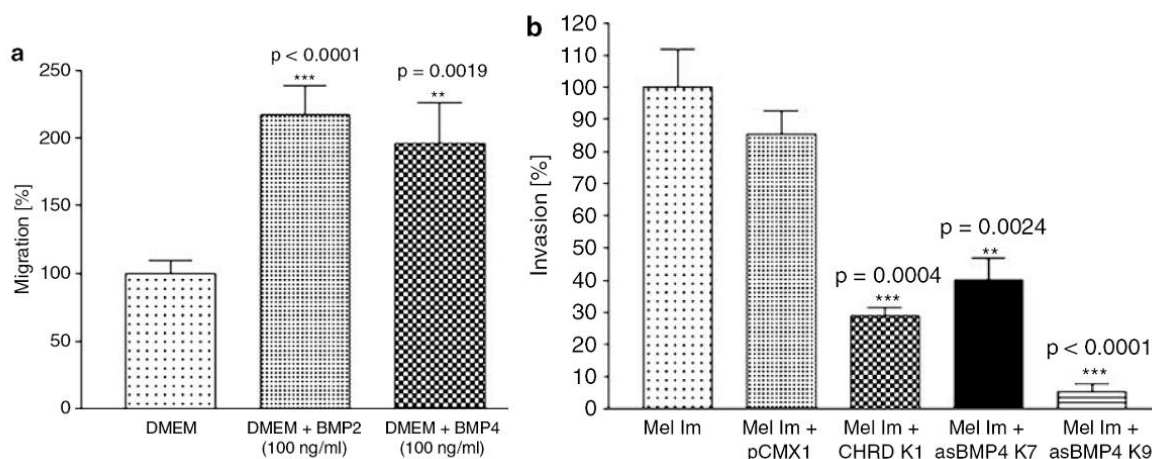


Abbildung 4-20: **Einfluss von BMP-2 und -4 auf Migration und Invasion von Endothelzellen.** a) Rekombinantes BMP-2 und -4 wirken als chemotaktische Faktoren und induzieren die Migration der Endothelzellen. b) Invasivität der Endothelzellen ist verringert in Richtung der Zellklone mit verminderter BMP Aktivität. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (Rothhammer et al. 2006).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sowohl BMP-2 als auch BMP-4 als chemoattraktive Faktoren für Endothelzellen fungieren. Des weiteren sind beide BMPs in der Lage die Tubenbildung *in vitro* zu induzieren. Es lässt sich daher vermuten, dass die Neo-Angiogenese im Tumor durch BMPs gefördert wird, die von Melanomzellen in die Tumorumgebung sezerniert wurden.

#### 4.2.3.3 Funktion von BMPs *in vivo*

Zur *in vivo* Analyse der Funktion von BMPs wurden die Chordin überexprimierenden und die antisense BMP-4 Zellklone subkutan in SCID (severe combined immunodeficiency) Mäuse injiziert. Dabei zeigten die Chordin überexprimierenden Zellen ein deutlich langsames Tumorwachstum und kleinere Tumore bei Versuchsende im Vergleich zur Kontrolle. Bei den antisense BMP-4 Zellklonen war ein geringfügig späteres Tumorwachstum zu erkennen, die Größe der Tumore bei Beendigung des Experiments unterschied sich jedoch nicht von der Kontrolle (Tabelle 4-2).

	Tag 0	Tag 5	Tag 12	Tag 20	Tag 28	Tag 35
Mel Im+pCMX1	0.0+0.00	0.0+0.00	0.9+0.18	12.3+2.49	41.1+6.58	70.3+19.61
Mel Im+CHRD K1	0.0+0.00	0.0+0.00	0.0+0.00	0.3+0.15	6.7+6.7	13.2+6.60*
Mel Im+asBMP4 K7	0.0+0.00	0.0+0.00	0.6+0.40	11.3+3.60	40.0+10.82	71.1+18.62
Mel Im+asBMP4 K9	0.0+0.00	0.0+0.00	0.9+0.41	17.8+6.33	51.8+18.90	58.1+21.92

Tabelle 4-2: Mittelwerte der Tumorgröße + Standardabweichung, pro Gruppe wurden 10 Mäuse analysiert. Die Mel Im + CHRD K1 Tumore waren bei Versuchsende (Tag 35) signifikant kleiner als die Kontrolltumore (Mel Im + pCMX1) (\* p = 0,0103). Zwischen den Mel Im + asBMP4 K7 und K9 Tumoren und der Kontrolle zeigte sich kein Unterschied bei der Tumorgröße. Die statistische Analyse wurde mittels ungepaartem t-Test durchgeführt (Rothhammer et al. 2006).

Zusätzliche histologische Analysen der Tumore zeigten große apoptotische und nekrotische Bereiche in den asBMP4 Tumoren, nicht jedoch in den Kontrollen [Abbildung 4-21, a, (Rothhammer et al. 2006)]. Immunhistologische Untersuchungen der CD31 (PECAM-1, **platelet-endothelial cell adhesion molecule 1**) Expression, einem Markerprotein für Endothelien, wiesen deutliche Färbungen in den Kontrolltumoren auf, nicht aber in den Tumoren, die aus den antisense BMP-4 Zellklonen entstanden sind (Abbildung 4-21). Das bedeutet, dass in den Kontrollen Gefäßstrukturen vorhanden sind, nicht jedoch in den Tumoren mit verminderter BMP Aktivität. Dadurch lassen sich die großen nekrotischen Bereiche und die verstärkte Apoptose erklären, da hier der Tumor nicht mehr optimal mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wurde. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass BMPs *in vitro* und *in vivo* pro-angiogenetische Eigenschaften besitzen.

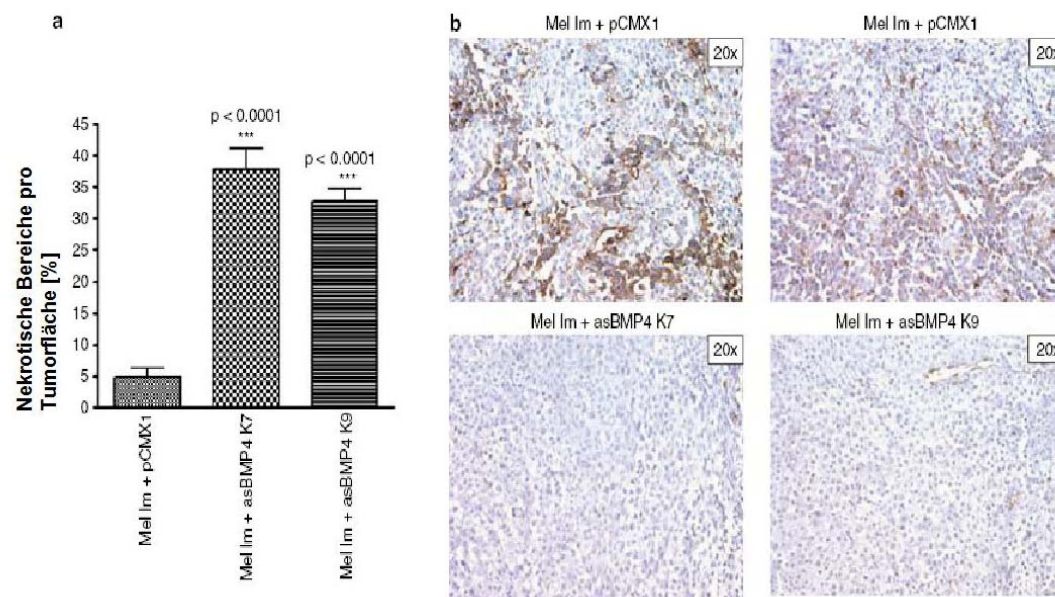


Abbildung 4-21: **Histologische und immunhistologische Analyse der Tumore aus den *in vivo* Mausexperimenten.** a) Die Tumore die aus den antisense BMP-4 Zellklonen entstanden sind, weisen signifikant größere nekrotische Bereich auf, als die Kontrollen. Die statistische Analyse wurde mittels ungepaartem t-Test vorgenommen. b) Immunhistologische Färbung von CD31, einem Marker für Endothelstrukturen. In den Kontrolltumoren (Mel Im + pCMX1) ist eine deutliche Färbung (braun) zu erkennen. In den asBMP4 Tumoren zeigte sich keine CD31 Färbung (Rothhammer et al. 2006).

#### 4.2.3.4 BMP-7 als prognostischer Marker

In einer weiteren Studie sollte untersucht werden, ob BMP-7 mit klinisch-pathologischen Kriterien von malignen melanozytären Tumoren assoziiert ist. Dazu wurde eine immunohistochemische Analyse der BMP-7 Expression, an einem Gewebe Mikro-Array (TMA, tissue microarray) durchgeführt. Dieser TMA beinhaltet Gewebe von 160 benignen Nävi, 88 Primärmelanomen und 101 Metastasen von Melanomen. Die Auswertung der BMP-7 Färbung erfolgte halb-quantitativ durch Einteilung in drei Klassen: 0: keine BMP-7 Färbung bzw. schwache Färbung in  $< 20\%$  der Zellen, 1+: schwache Färbung in  $> 20\%$  der Zellen bzw. starke Färbung in  $< 20\%$  der Zellen, 2+: starke Färbung in  $> 20\%$  der Zellen. Die statistische Analyse, zwischen den klinisch-pathologischen und den immunohistochemischen Parametern, wurde mit Hilfe einer Statistiksoftware (SPSS, Version 10.0, SPSS Inc., Chicago)

durchgeführt. Dabei wurde der exakte Test nach Fisher, bzw. zur Darstellung der Überlebenskurven, die Methode nach Kaplan- Meier benutzt.

Es zeigte sich eine signifikante Induktion der BMP-7 Expression in Primärmelanomen ( $p < 0,001$ ) und Metastasen ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu benignen Nävi. Weiterhin stellte sich heraus, dass Lymphknoten-Metastasen eine stärkere BMP-7 Expression aufweisen als Metastasen, die in der Haut auftreten ( $p < 0,01$ ). Um das rezidivfreie Überleben (recurrence free survival) zu analysieren, wurden die Gruppen, nicht oder nur schwach (Klasse 0- 1+) gefärbter mit den stark (Klasse 2+) gefärbten Primärmelanomen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Gruppe mit der starken BMP-7 Färbung (Klasse 2+), ein doppelt so hohes Risiko hat, an einem Rezidiv zu erkranken (score 2+: mittleres rezidivfreies Überleben von 34 Monaten; score 0-1+: mittleres rezidivfreies Überleben von 84 Monaten) (Abbildung 4-22; Rothhammer et al., 2007, akzeptiert).

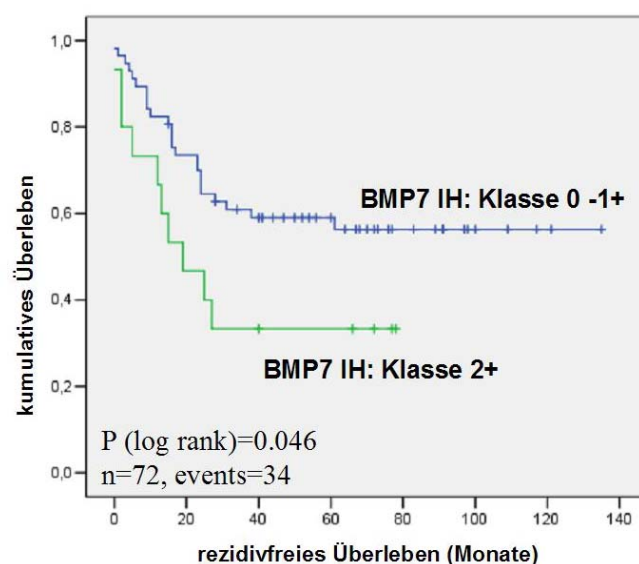


Abbildung 4-22: **Kaplan-Meier Überlebenskurven der beiden analysierten Gruppen** (Gruppe 1: BMP-7 Färbung 0-1+, Gruppe 2: BMP-7 Färbung 2+). Eine starke BMP-7 Expression im Primärtumor (Klasse 2+) geht mit einem schlechteren rezidivfreien Überleben einher [(Rothhammer et al. 2007) zur Publikation akzeptiert].

Diese Studien konnten zeigen, dass BMP-7 einen potentiellen neuen Marker zur Prognose des rezidivfreien Überlebens beim malignen Melanom darstellt.

### 4.3 Einfluss von FGF-2 auf Expression und Aktivität von BMPs

Analysen von Hoffman und Kollegen zur Entwicklung der Speicheldrüse, konnten zeigen, dass die Expression von BMP-4 und -7, über FGFR-1 (fibroblast growth factor receptor 1) vermittelte Signaltransduktion reguliert wird (Hoffman et al. 2002). Zusätzlich dazu wurde gezeigt, dass homozygote Mutation des FGFR-1 zu einer veränderten BMP-2 und -4 Expression führten (Dell'Era et al. 2003). Es ist bekannt, dass FGFR-1 und sein Ligand FGF-2 (fibroblast growth factor 2), eine wichtige Rolle bei der Melanomentstehung spielen. Durch autokrine Effekte verbessert FGF-2 das Überleben und die Proliferation der Melanomzellen, des weiteren trägt FGF-2 in Melanozyten zu einem transformierten Phänotyp bei (siehe Kapitel 1.4.1). Transfektionen von Melanomzellen mit einem dominant-negativen FGFR-1 Konstrukt, führten zu einer stark reduzierten Proliferation der Zellen *in vitro*, sowie zu einer Reduktion der Tumorbildung in Mäusen (Yayon et al. 1997).

Diese Studien zeigen, dass FGF-2 einen wichtigen Wachstumsfaktor bei der Entstehung und Progression des Melanoms darstellt. Welche Rolle dabei das Zusammenspiel zwischen FGF-2 und BMPs spielt, sollte im Folgenden analysiert werden.

Um die Effekte von FGF-2 zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurde, durch Transduktion mit einem FGF-2 exprimierenden Adenovirus, die FGF-2 Expression in Melanomzellen und normalen Melanozyten induziert. In einem zweiten Ansatz wurde, durch Transfektion einer FGF-2 siRNA die Expression in Melanomzellen verringert. Abbildung 4-23 zeigt die *fgf-2* Expression in den transduzierten bzw. transfizierten Zellen.

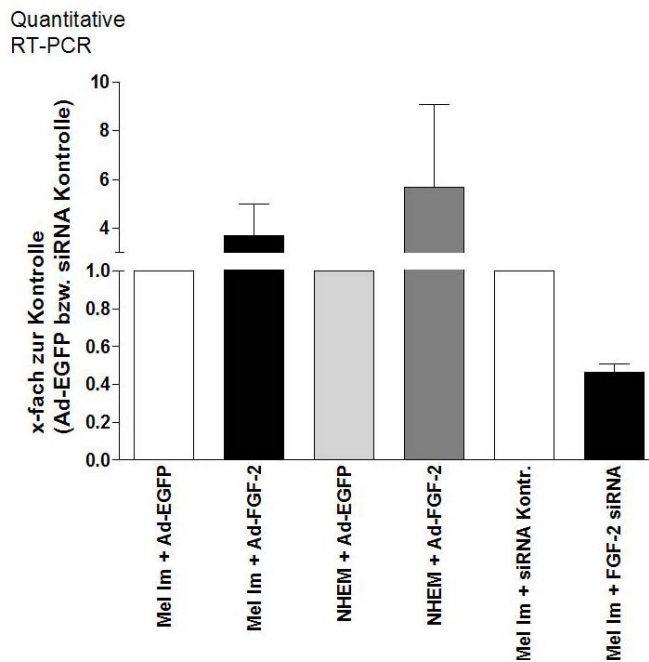


Abbildung 4-23: **Quantitative RT-PCR Analyse der fgf-2 Expression in Mel Im und NHEM (normale humane epidermale Melanozyten).** Nach Transduktion mit einem fgf-2 exprimierenden Adenovirus, zeigen Mel Im eine 4fach und NHEM eine 6fach erhöhte fgf-2 Expression. Transfektion einer FGF-2 siRNA führte zu einer Reduktion der Expression um etwa 50%.

Es ist bekannt, dass die FGF-2 vermittelte Signalweiterleitung über den MAPK Signalweg stattfindet (siehe Kapitel 1.4.4). Daraus ergibt sich die Frage, ob FGF-2 die Aktivität des Transkriptionsfaktors Ets-1 induzieren kann, welcher dann wiederum die Expression von BMPs regulieren könnte (siehe Kapitel 4.2.2). Untersuchungen der Aktivität eines Ets-1 responsiven Luciferase Konstruktes zeigten, dass die Aktivität von Ets-1 durch FGF-2 induzierbar ist. Dazu wurde das Ets-1 Luc Konstrukt zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines FGF-2 Expressionsplasmides in die Zelllinie Mel Im transfiziert. Ko-transfektion einer FGF-2 siRNA führte zu einer verminderten Ets-1 Aktivität (Abbildung 4-24).

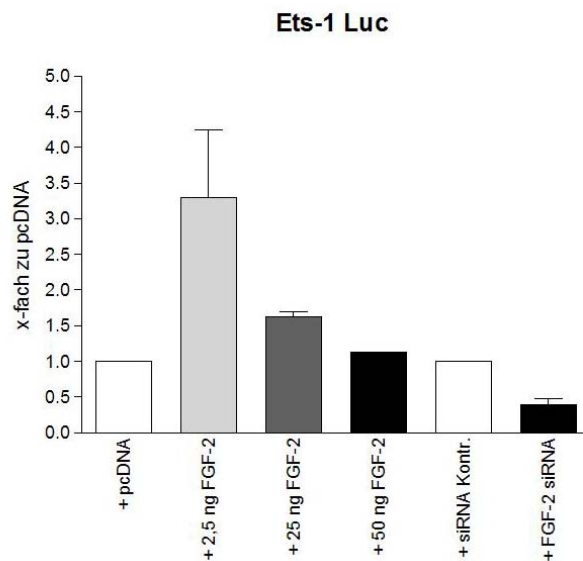


Abbildung 4-24: **Ets-1 Luciferase Aktivität nach Transfektion einem FGF-2 Expressionskonstrukt bzw. einer FGF-2 siRNA.** Die Ets-1 Aktivität wird durch geringe Konzentrationen des FGF-2 Expressionsplasmids (2,5ng pro Transfektion) induziert. Die FGF-2 siRNA reduziert die Ets-1 Aktivität um etwa 60%.

Diese Experimente zeigen, dass die Aktivität von Ets-1 durch FGF-2 induziert werden kann. Die nachfolgenden Untersuchungen sollen nun klären, ob die Expression und Aktivität von BMP-4 und -7 durch FGF-2 beeinflussbar sind. Dazu wurde, mittels quantitativer RT-PCR Analyse die Expression von bmp-4 und -7 in den FGF-2 Virus transduzierten (Ad-FGF-2) und FGF-2 siRNA transfizierten Zellen bestimmt.

Es zeigte sich eine deutliche Induktion der bmp-4 und -7 Expression in den Ad-FGF-2 behandelten Zellen (Abbildung 4-25).

Quantitative  
RT-PCR

BMP-4

BMP-7

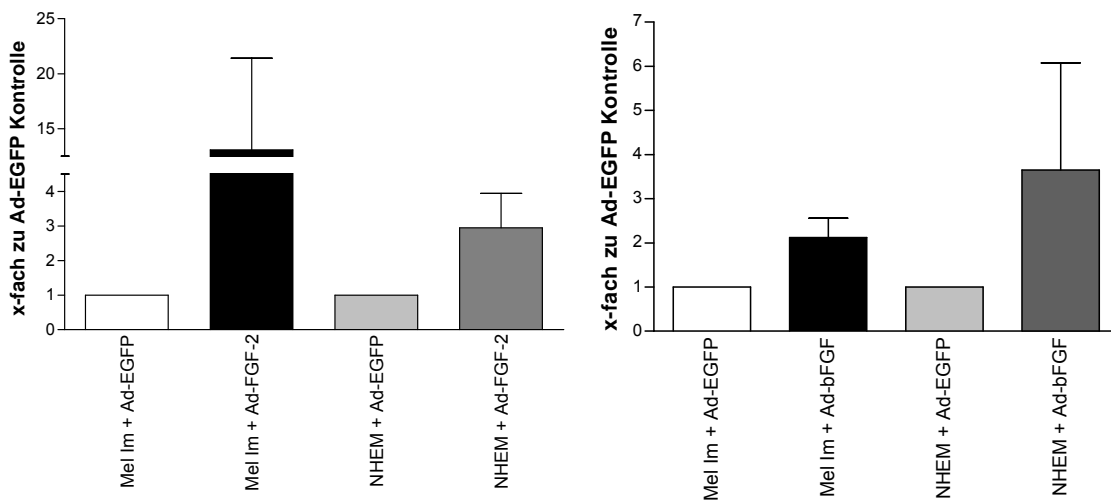


Abbildung 4-25: **Analyse der bmp-4 und –7 Expression mittels quantitativer RT-PCR.**

Transduktion der Melanomzelllinie Mel Im bzw. von normalen Melanozyten (NHEM) mit einem FGF-2 exprimierenden Adenovirus induziert in beiden Zelltypen sowohl die bmp-4 als auch die bmp-7 Expression.

Melanomzellen, die mit einer FGF-2 siRNA transfiziert wurden, zeigten eine deutliche Reduktion der bmp-4 und –7 Expression (Abbildung 4-26).

Quantitative  
RT-PCR

BMP-4

BMP-7

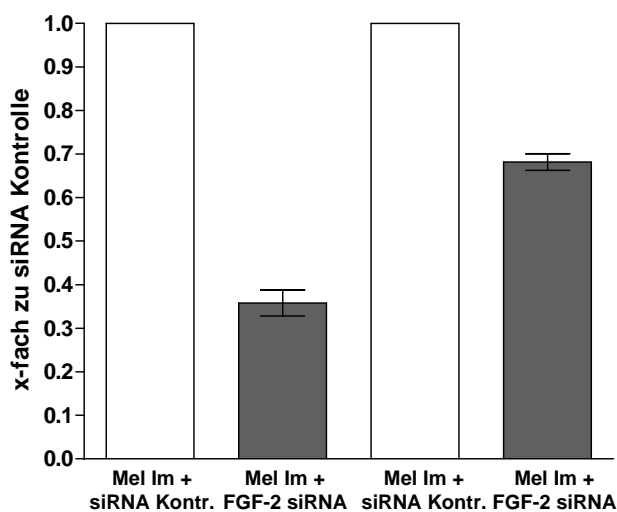




Abbildung 4-26: **Analyse der Expression von bmp-4 und -7 mittel quantitativer RT-PCR.** Mel Im die mit einer FGF-2 siRNA transfiziert wurden zeigen eine deutlich verminderte bmp-4 und-7 Expression im Vergleich zu den Kontrollen.

Analysiert man die Aktivität des bmp-4 und -7 Promotors zeigt sich, analog zur Expression, eine Induktion der Promotoraktivität durch FGF-2.

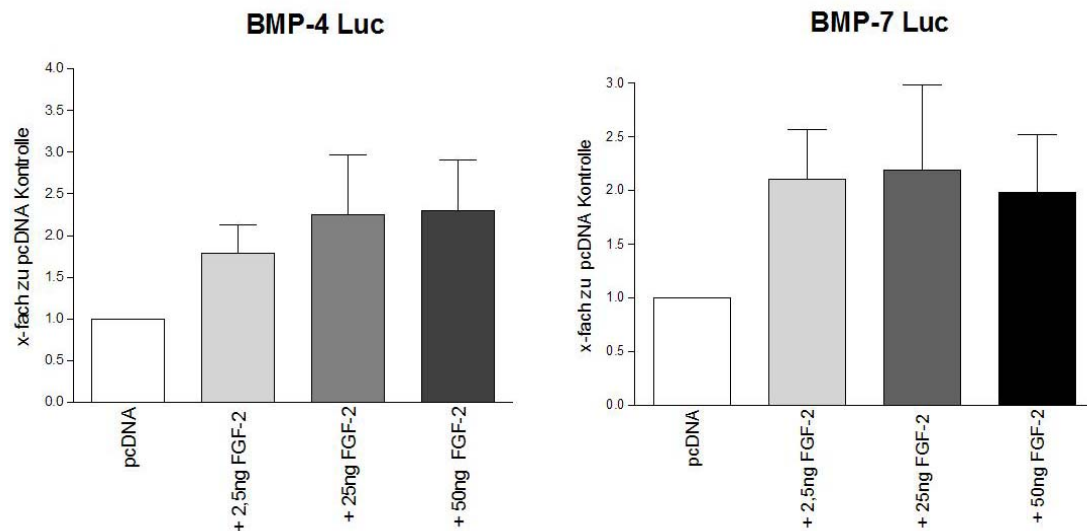


Abbildung 4-27: **Promotoraktivität von bmp-4 und -7 nach Transfektion mit einem FGF-2 Expressionskonstrukt.** Im Vergleich zur Kontrolle (pcDNA) zeigt sich eine deutliche Induktion der bmp-4 und -7 Promotoraktivität in FGF-2 transfizierten Zellen (Mel Im).

Diese Experimente konnten zeigen, dass FGF-2 die Expression und Aktivität von BMP-4 und -7 über den Transkriptionsfaktor Ets-1 induzieren kann.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle der BMP/ TGF $\beta$  Signalkaskade bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms analysiert. Hierbei konnten drei wichtige Aspekte näher charakterisiert werden. Zum einen wurde die Funktion eines neuen Ko-Repressors der TGF $\beta$  Signalkaskade (Sno) im Melanom aufgeklärt. Sno wird in Melanomzellen exprimiert und ermöglicht diesen Zellen, analog zu dem bereits bekannten Ko-Repressor Ski, anti-proliferativen Effekten durch TGF $\beta$  zu entgehen. Weiterführende Analysen ergaben, dass die Expression von beiden Ko-Repressoren (Ski und Sno) durch das Protein MIA beeinflusst wird. Im zweiten Teil der Arbeit stand die Analyse der Expression und Funktion von BMPs im Vordergrund. Dabei zeigte sich, dass die meisten Mitglieder der BMP Familie von Melanomzellen exprimiert werden. Analysiert man die Funktion der BMPs ergaben sich einerseits, autokrine, stimulatorische Effekte auf die Zellinvasion. Des weiteren wurden parakrine Einflüsse auf die Endothelzellen des umgebenden Tumorstromas beobachtet. BMPs induzieren hier die Migration und Tubenbildungskapazität der Endothelzellen. Ein dritter Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Interaktion von BMPs und FGF-2, einem wichtigen Wachstumsfaktor bei der Melanomentstehung. Es wurde gezeigt, dass FGF-2 die Expression und Aktivität von BMPs, über den Transkriptionsfaktor Ets-1, induzieren kann.

Die Relevanz dieser Ergebnisse bei der Melanomentstehung und Progression wird nun im folgenden Kapitel diskutiert.

### 5.1 Regulatoren der TGF-beta Signaltransduktion

Es konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die TGF $\beta$  Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms spielt (Van Belle et al. 1996; Moretti et al. 1997; Krasagakis et al. 1994). In Abhängigkeit vom Zelltyp wurden dabei völlig unterschiedliche Funktionen von TGF $\beta$  beschrieben. In normalen Melanozyten fungiert TGF $\beta$  als anti-proliferativer Faktor. Melanozyten produzieren dabei selbst kein, oder nur geringe Mengen an TGF $\beta$ . Die TGF $\beta$  vermittelte Kontrolle der Proliferation erfolgt durch die umgebenden Keratinozyten der Haut. Melanomzellen hingegen sind resistent gegenüber diesen anti-proliferativen Effekten. Sie produzieren und sezernieren sogar selbst TGF $\beta$  1, 2 und 3, die zur verstärkten Migration der Zellen und zur Tumorangio-genese beitragen

(Lazar-Molnar et al. 2000; Van Belle et al. 1996). Es wurde lange spekuliert, durch welche Mechanismen Melanomzellen vor anti-proliferativen Effekten geschützt sind, bis Reed und Kollegen die Funktion des Ko-Repressors Ski (homolog of v-Ski avian sarcoma viral oncogene) im Melanom aufklärten (Reed et al. 2001). Diese Studie zeigte, dass Ski im Melanom verstärkt exprimiert wird, an Smad 2, 3 und 4 bindet und dabei die Smad abhängige Transkription von TGF $\beta$  Zielgenen inhibiert. Die Unterbrechung der TGF $\beta$  vermittelten Signaltransduktion stellt somit einen wirksamen Mechanismus dar, um der Proliferationskontrolle zu entgehen.

Die uns zur Verfügung stehenden Melanomzellen zeigten jedoch bis auf eine Zelllinie keine Expression von Ski, obwohl alle Zellen resistent gegenüber anti-proliferativen Stimuli durch TGF $\beta$  sind (Poser et al. 2005). Auch inaktivierende Mutationen des TGF $\beta$  Rezeptor II, die in anderen Krebsarten beschrieben wurden, konnten nicht detektiert werden (Biswas et al. 2004; Lucke et al. 2001). Da auch die Rezeptor-vermittelte Smad Phosphorylierung intakt war, konnte nur eine Inhibition des Signalweges durch einen Repressor analog zu Ski in Frage kommen. Studien von Stroschein und Kollegen zeigten, dass neben Ski das Ski homologe Protein Sno (**S**ki-related **n**ovel gene) als Ko-Repressor der TGF $\beta$  vermittelten Signalweiterleitung fungieren kann (Stroschein et al. 1999). Sno interagiert mit Smad 2 und 4 und verhindert die Transkription von TGF $\beta$  Zielgenen. Dadurch wird der inaktive Status der Signalkaskade aufrecht erhalten, wenn kein Ligand gebunden ist. Findet eine Aktivierung der Signalkaskade statt, wird Sno durch einen Smad 3 abhängigen Mechanismus degradiert und die Transkription von Zielgenen kann stattfinden. Sno ist jedoch selbst ein Zielgen von TGF $\beta$ , wodurch eine Überexpression des Ko-Repressors induziert wird. Die darauf folgende Akkumulation von Sno führt zur Termination der aktivierten Signalkaskade. Sno wird ubiquitär in geringen Mengen exprimiert, die Überexpression dieses Proteins jedoch führt zur Inhibition der TGF $\beta$  Signalkaskade. Untersuchungen in embryonalen Fibroblasten zeigten, dass die konstitutive Überexpression von Sno zu einem transformierten Phänotyp beitragen kann (Stroschein et al. 1999).

Untersuchungen unserer Melanomzelllinien zeigten eine starke Expression von Sno in allen analysierten Linien. Normale Melanozyten exprimierten kein bzw. kaum nachweisbare Mengen an Sno. Weiterführende Analysen ergaben, dass Sno, analog zu Ski, als Ko-Repressor der TGF $\beta$  Signalkaskade im Melanom fungiert. Dazu wurden Melanomzellen mit einem antisense Sno Konstrukt transfiziert, um die Sno

Expression dieser Zellen zu reduzieren. Die Reduktion von Sno führte zu einer verminderten Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen (Poser et al. 2005).

Es ist bekannt, dass Ski die Smad abhängige Expression von  $p21^{WAF1}$  reprimiert und dadurch der Zellzykluskontrolle entgegen wirkt (Reed et al. 2001). Es konnte jedoch kein Einfluss von Sno auf die Expression von  $p21^{WAF1}$  detektiert werden. Die antisense Sno Zellklone zeigten keine Expressionsunterschiede zu den Kontrollen und auch in allen analysierten Sno exprimierende Zelllinien ließen sich detektierbare Mengen an  $p21^{WAF1}$  nachweisen. Die Ski exprimierenden Zelllinie SK Mel 28 hingegen, wies kaum nachweisbare Mengen an  $p21^{WAF1}$  mRNA auf. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die  $p21^{WAF1}$  Expression durch Sno nicht reguliert werden kann. Möglicherweise spielt Smad 3 dabei eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass Ski als Ko-Repressor für Smad 2, 3 und 4 fungiert (Reed et al. 2001). Sno hingegen inhibiert hauptsächlich die Funktion von Smad 2 und 4. Sno und Smad 3 interagieren zwar miteinander, aber die Interaktion führt nicht zur Inhibition der Smad 3 Funktion sondern zur Degradation von Sno (Stroschein et al. 1999). Zusätzlich dazu wurde gezeigt, dass Smad 3 zusammen mit Smad 4 und Sp-1 eine wichtige Rolle bei der TGF $\beta$  vermittelten Aktivierung des  $p21^{WAF1}$  Promotors einnimmt (Pardali et al. 2000; Lee et al. 2007). Es wäre daher möglich, dass in Melanomzellen die Sno exprimieren, die Expression von  $p21^{WAF1}$  hauptsächlich durch Smad 3 reguliert wird, da Smad 3 von Sno nicht inhibiert werden kann.

Da die Expression von  $p21^{WAF1}$  in den antisense Sno Zellklonen nicht reguliert war, wurden weitere Zellzyklus-Inhibitoren ( $p15^{INK4B}$ ,  $p27^{KIP1}$ ,  $p57^{KIP2}$ ) untersucht. Doch auch  $p15^{INK4B}$ ,  $p27^{KIP1}$  und  $p57^{KIP2}$  werden von allen Zelllinien exprimiert und es zeigten sich keine Expressionsunterschiede zwischen den antisense Sno und den Kontrollzellklonen. Möglicherweise spielt Smad 3 auch bei der Regulation dieser Inhibitoren eine Rolle.

Interessanterweise führt die Expression von  $p15^{INK4B}$ ,  $p21^{WAF1}$ ,  $p27^{KIP1}$  und  $p57^{KIP2}$  nicht zum Zellzyklus Arrest der Melanomzellen. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass diese Proteine neben der Funktion als Zellzyklus-Inhibitoren, noch andere Prozesse in der Zelle regulieren können (Coqueret 2003). Es wird angenommen, dass nukleäres  $p21^{WAF1}$  für die Regulation des Zellzyklus verantwortlich ist, zytoplasmatisches  $p21^{WAF1}$  hingegen jedoch zur Zelltransformation beiträgt. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass zytoplasmatisches  $p21^{WAF1}$  Melanomzellen vor p53-induzierter Apoptose schützt (Coqueret 2003; Gorospe et al.

1997). Es wäre möglich, dass in Melanomzellen die Zellzyklus-Inhibitoren im Zytoplasma vorliegen und daher nicht zu einem Arrest des Zellzyklus führen, sondern zu einem transformierten Zelltyp beitragen.

Die Analyse eines weiteren TGF $\beta$  Zielgenes (Inhibitor of DNA binding, Id-1) zeigte, im Gegensatz zu den Zellzyklus-Inhibitoren, eine Induktion der Expression in den antisense Sno Zellklonen. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der Sno Expression, die Inhibition der Signalkaskade aufhebt und dass TGF $\beta$  Zielgene wieder exprimiert werden (Poser et al. 2005).

Für weitere Analysen der TGF $\beta$  Signaltransduktion im Melanom wurde ein Modellsystem benutzt. Dazu wurde in der Melanomzelllinie HMB2 die Expression des Proteins MIA durch Transfektion mit einem antisense MIA Konstrukt unterdrückt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich diese Zellklone durch einen Melanozyten-ähnlichen Phänotyp auszeichnen (Poser et al. 2004; Tatzel et al. 2005). Die MIA defizienten Zellen wiesen, im Vergleich zu den Kontrollen, verstärkte E-Cadherin Expression und den Verlust von N-Cadherin, sowie Zell-Zell Kontakte, dendritische Ausläufer und Pigmentierung der Zellen auf. Zusätzlich dazu konnte eine Reduktion von Melanom-assoziierten Genen, wie MT1-MMP (**m**embrane-**t**ype **m**atrix **m**etalloproteinase 1), Integrin  $\beta$ 3, t-PA (**t**issue-**t**ype **p**lasminogen **a**ctivator) und SPARC (**s**ecreted **p**rotein **a**cidic and **r**ich in **c**ystein) in diesen Zellen detektiert werden (Poser et al. 2004; Tatzel et al. 2005). In diesen Melanozyten-ähnlichen Zellen wurde nun die Regulation des TGF $\beta$  Signalweges untersucht. Dabei konnte in den antisense MIA Zellklonen die Aktivierung eines TGF $\beta$  responsiven Reportergenkonstruktes nach Stimulation mit TGF $\beta$  beobachtet werden. Auch die Expression von TGF $\beta$  Zielgenen war in diesen Zellen induzierbar. In den MIA exprimierenden Melanomzellen (parentale Zelllinie und kontroll-transfizierte Zellen) hingegen war der TGF $\beta$  Signalweg nicht aktivierbar. Des weiteren zeichneten sich die MIA negativen Melanomzellen durch eine verminderte Proliferation aus (Rothhammer und Bosserhoff 2006). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MIA Faktoren reguliert, die inhibitorisch auf die TGF $\beta$  vermittelte Signaltransduktion wirken. Es war daher naheliegend, die Expression der Ko-Repressoren Ski und Sno, deren Funktion als Inhibitoren des TGF $\beta$  Signalwegs nachgewiesen wurde, zu untersuchen. (Poser et al. 2005; Reed et al. 2001). Analysen der Zellklone ergaben, dass beide Ko-Repressoren von der parentalen Zelllinie und der Transfektionskontrolle exprimiert werden. Die MIA defizienten Zellen exprimierten

weder Ski noch Sno. Wird MIA, durch Transfektion mit einem Expressionskonstrukt überexprimiert, kann die Ski und Sno Expression induziert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die, in Abhängigkeit von der Tumorprogression zunehmende Expression von MIA zur Induktion der Ski und Sno Expression beiträgt. Durch MIA kann somit ein Mechanismus in Gang gesetzt werden, der Melanomzellen vor anti-proliferativen Effekten durch TGF $\beta$  schützt.

Daraus ergibt sich die Frage, wie MIA die Expression von Ski und Sno regulieren kann. Vorhergehende Studien konnten zeigen, dass MIA defiziente Melanomzellen einen Melanozyten-ähnlichen Phänotyp aufweisen und sich in vielen Punkten von der parentalen Melanomzelllinie unterscheiden (Poser et al. 2004; Tatzel et al. 2005). Dabei wurden auch Unterschiede im MAPK/ ERK Signalweg detektiert. Die MIA defizienten Melanomzellen zeigen im Vergleich zur parentalen Zelllinie, keine konstitutive ERK 1/ 2 Phosphorylierung und damit keine Aktivität der ERK Kinasen (Tatzel et al. 2005). Dies ist vergleichbar mit ruhenden normalen Melanozyten, in denen dieser Signalwege ebenfalls nicht konstitutiv aktiv vorliegt. Da Melanozyten und die MIA negativen Zellklone, im Gegensatz zu Melanomzellen, die Ko-Repressoren Ski und Sno nur gering bzw. nicht exprimieren, könnte die Aktivierung des MAPK/ ERK Signalweges dabei eine Rolle spielen. Um die Beteiligung dieser Signalkaskade an der Regulation von Ski und Sno nachzuweisen, wurden Melanomzellen mit Inhibitoren der MAPK/ ERK Signalkaskade behandelt. Dabei zeigte sich, dass die behandelten Zellen eine geringere Ski und Sno Expression im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen. Die Expression der beiden Ko-Repressoren konnte jedoch durch die Behandlung mit MAPK/ ERK Inhibitoren nicht komplett gehemmt werden (Rothhammer und Bosserhoff 2006). Dies lässt vermuten, dass neben den ERK Kinasen noch andere Kinasen an der Regulation von Ski und Sno beteiligt sind. Ob MIA auch an der Regulation von anderen wichtigen Kinasen im Melanom beteiligt ist muss in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden.

## **5.2 Rolle von *bone morphogenetic proteins***

Bone morphogenetic proteins (BMPs) wurden erstmals in den sechziger Jahren von Dr. Marshall Urist aus demineralisierten Knochenextrakten isoliert. Im Rahmen seiner Arbeiten beschrieb er die Fähigkeit dieser Proteine Knochen und Knorpel zu induzieren. Erst später wurde bekannt, dass BMPs Mitglieder der TGF $\beta$  Superfamilie sind und bei unterschiedlichen zellulären Prozessen, z.B. auch bei der

Embryogenese, eine wichtige Rolle spielen (Henrik und Olle 2001; Yamamoto und Oelgeschlager 2004). Studien von Sela-Donenfeld und Kalchauer zeigten (Sela-Donenfeld und Kalchauer 1999), dass die Expression von BMP-4 im dorsalen Teil des Neuralrohrs die Ablösung von Neuralleistenzellen aus der Neuralanlage induziert. Es wird angenommen, dass BMP-4 dabei an der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt ist. Die epitheliale-mesenchymale Transition ist Voraussetzung dafür, dass Neuralleistenzellen von ihrem angestammten Ort auswandern können (Radisky 2005; Sela-Donenfeld und Kalchauer 1999). Dabei verlieren die epithelialen Zellen den direkten Zell-Zell-Kontakt und auch ihre Zellpolarität. Die Zell-Matrix Interaktion verändert sich und die Zellen sind nun in der Lage die extrazelluläre Matrix durch Expression von Matrixmetalloproteinasen zu modulieren. Die Umwandlung in Richtung eines mesenchymalen Zelltyps ermöglicht den Neuralleistenzellen aus der festgelegten epithelialen Struktur auszuwandern (Radisky 2005). Der Vorgang der EMT findet jedoch nicht nur während der Embryogenese statt. Es wird angenommen, dass auch bei der Tumorprogression und Metastasierung eine Transition zum mesenchymalen Phänotyp stattfindet, der mit einer verstärkten Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen einher geht. Diese Transition konnte zum Teil auch bei der Entstehung des malignen Melanoms beobachtet werden (Pla et al. 2001; Kuphal et al. 2005; Kuphal und Bosserhoff 2006).

Neben der Beteiligung von BMPs an „normalen“ Entwicklungsprozessen, zeigen neuere Studien auch eine Rolle von BMPs bei der Entstehung und Progression von Tumoren (Langenfeld et al. 2003; Langenfeld und Langenfeld 2004; Yang et al. 2005; Deng et al. 2007). Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben, dass BMPs die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Krebszellen fördern (Deng et al. 2007; Yang et al. 2005). Möglicherweise induzieren sie auch bei diesen Prozessen einen mesenchymalen Phänotyp der Tumorzellen. Diese Vorkenntnisse deuteten zu Beginn meiner Arbeit darauf hin, dass BMPs bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms involviert sein könnten.

Die Expressionsanalyse von BMPs zeigte, dass BMP-4, -6, -7, -8, -10, -13 und -14 differentiell von Melanomzellen im Vergleich zu normalen Melanozyten exprimiert werden. Die Expression von BMP-4 und -7 wurde, zusätzlich zu den Analysen an Melanomzelllinien, auch an Gewebeschnitten untersucht. Dabei konnte eine starke BMP-4 und -7 Expression in Primärmelanomen und Melanommetastasen, im Vergleich zu einer nicht nachweisbaren oder sehr schwachen Expression in

normalen Nävi detektiert werden (Rothhammer et al. 2005). Die verstärkte Expression dieser BMPs in Melanomzellen lässt vermuten, dass BMPs an der malignen Transformation und/ oder der Progression dieser Zellen beteiligt sind. BMP-2 wurde nur von zwei der neun analysierten Melanomzelllinien exprimiert und scheint, im Gegensatz zu anderen Krebsarten, im Melanom nur eine geringe Rolle zu spielen. BMP-3 und -5 wurden weder von Melanomzellen noch von Melanozyten exprimiert. Es ist bekannt, dass BMP-3 als BMP Inhibitor fungiert (Gamer et al. 2005; Bahamonde und Lyons 2001). Aufgrund der fehlenden BMP-3 Expression im Melanom lässt sich vermuten, dass BMP-3 die Signaltransduktion verhindern und damit einen wichtigen Signalweg für die Zellen blockieren könnte. BMP-9, -11 und -15 wurden sowohl von Melanomzellen als auch von Melanozyten exprimiert und scheinen in beiden Zelltypen gleichermaßen wichtig zu sein. BMP-12 wurde als einziges Familienmitglied stärker von Melanozyten als von Melanomzellen exprimiert. Ob BMP-12 eine spezielle Funktion bei der Melanozyten Homöostase und dadurch eine Sonderstellung in der BMP Familie einnimmt, ist jedoch bisher noch nicht bekannt.

Die differentielle Expression von verschiedenen BMPs deutet darauf hin, dass diese Proteine an der Entstehung und Progression des malignen Melanoms beteiligt sein könnten. Die genaue Rolle sollte mit Hilfe von detaillierten funktionellen Analysen geklärt werden. Dabei zeigte sich, dass BMPs sowohl einen autokrinen Einfluss auf die Melanomzellen selbst als auch parakrine Einflüsse auf die Zellen der Tumorumgebung haben.

Die autokrinen Effekte wurden anhand von verschiedenen Modellsystemen untersucht. In einem ersten Ansatz wurde gezielt die Expression von BMP-4 in Melanomzellen durch Transfektion mit einem antisense BMP-4 Konstrukt verringert. Da in diesem System nur BMP-4 vermittelte Effekte analysierbar waren, wurden zusätzlich Melanomzellklone generiert die den BMP Inhibitor Chordin stabil exprimieren (Rothhammer et al. 2005). Es ist bekannt, dass Chordin die Funktion von BMP-2, -4 und -7 inhibiert, wobei auch die Inhibition weiterer BMPs nicht ausgeschlossen werden kann. Chordin wird in den extrazellulären Raum sezerniert und kann dort die Rezeptorbindung von BMPs und damit die Aktivierung der Signaltransduktion verhindern (Balemans und Van Hul 2002).

Die Analyse der Melanomzellklone mit verminderter BMP Aktivität zeigte, dass diese Zellen im Vergleich zu den Kontrollen eine geringere Migrations- und



Invasionsfähigkeit aufwiesen (Rothhammer et al. 2005). Transduziert man normale Melanozyten mit BMP-7 kann in diesen Zellen das Migrations- und Invasionspotential induziert werden.

Es ist bekannt, dass BMP-4 die Ablösung und Auswanderung von Neuralleistenzellen, aus denen auch Melanozyten entstehen, aus dem dorsalen Neuralrohr induziert (Liu und Jessell 1998). In einem Screening wurde unter anderem die kleine GTPase RhoB als BMP Zielgen, das an dieser Migration beteiligt ist, identifiziert. Die Behandlung von dorsalem Neuralplattengewebe mit BMP-4 induzierte wandernde Neuralleistenzellen *in vitro*. Dieser Effekt konnte durch Zugabe eines Rho Inhibitors nahezu vollständig inhibiert werden (Liu und Jessell 1998). Rho GTPasen spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts während der Migration, durch Induktion von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten (Ridley und Hall 1992; Kobayashi et al. 2006). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Aktivität von LIMK1 (**LIM** domain kinase **1**) durch BMP-4 beeinflusst werden kann. LIMK1 ist wie die Rho GTPasen an der Ausbildung von Stressfasern beteiligt. LIMK1 bindet an den zytoplasmatischen Teil des BMP Rezeptors II wodurch ihre Aktivität negativ reguliert wird. Die Aktivierung des BMP Rezeptorkomplexes durch BMP-4 führt zur Dissoziation der LIM Kinase, die daraufhin aktiv im Zytoplasma vorliegt (Foletta et al. 2003). Diese Studien lassen vermuten, dass BMPs durch Regulation von Rho GTPasen oder LIM Kinasen an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind und somit die Migrationsfähigkeit von Melanomzellen beeinflussen können.

Die Fähigkeit von BMPs die Invasivität zu fördern, wurde neben unseren Studien auch für andere Krebsarten beschrieben (Langenfeld et al. 2003; Deng et al. 2007). Dabei konnten Deng und Kollegen (Deng et al. 2007) zeigen, dass BMP-4 die Expression und Aktivität des Urokinase Typ des Plasminogen-Aktivators (uPA) in Kolonkarzinomzellen induziert. Die Aktivierung von uPA trägt zur Degradation der extrazellulären Matrix bei und erleichtert den Tumorzellen die Invasion der Tumorumgebung. Des weiteren wurde von Nakashima und Tamura beschrieben, dass BMP-2 zusammen mit Wnt3A (**wingless-type** MMTV integration site family, member **3A**) die Expression von MMP-13 (**matrix metalloproteinase 13**, collagenase 3) induziert und die Expression von TIMP-1 (**tissue inhibitor of metalloproteinase 1**) in Myoblasten inhibiert (Nakashima und Tamura 2006). MMPs sind wie uPA am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass BMPs autokrin die Expression von matrix-degradierenden Enzymen (uPA, MMP) induzieren sowie die Expression von MMP Inhibitoren (TIMP) in Melanomzellen inhibieren und somit zu einem invasiven Phänotyp beitragen. Da es sich bei BMPs um sezernierte Proteine handelt, werden möglicherweise auch Zellen des umgebenden Tumorstromas zur Expression dieser Enzyme angeregt. In ersten Untersuchungen konnten wir feststellen, dass die Behandlung von Fibroblasten mit BMPs zur Induktion der Expression von MMP-3 und -13 führt. Dabei handelt es sich jedoch um preliminäre Daten. Es sind noch detaillierte Analysen nötig um die parakrine Funktion von BMPs auf Fibroblasten aufzuklären.

Neben dem Einfluss von BMPs auf die Migrations- und Invasionskapazität konnten wir zusätzliche Effekte auf die „vasculogenic mimicry“ der Melanomzellen beobachten. Es ist bekannt, dass Melanome zusätzlich zur Neo-Angiogenese einen weiteren Mechanismus besitzen, um die Versorgung des Tumors zu gewährleisten. Es wurden Kanäle beschrieben, die aus extrazellulärer Matrix, gesäumt von Tumorzellen bestehen und durch die Nährstoffe und Sauerstoff in den Tumor gelangen können. Dieses Phänomen wird als „vasculogenic mimicry“ bezeichnet (Maniotis et al. 1999). Wir konnten zeigen, dass in den Melanomzellklonen mit verminderter BMP Aktivität die Fähigkeit zur „vasculogenic mimicry“ *in vitro* im Vergleich zu den Kontrollzellen verloren geht. Dieser Verlust geht einher mit der verminderten Expression von EphA2 (epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase), VE-Cadherin (**v**ascular **e**ndothelial **c**adherin), Id-1 (inhibitor of **DNA** binding **1**) und TEK (endothelial cell-specific tyrosine kinase receptor). Diese Gene spielen eine wichtige Rolle bei der „vasculogenic mimicry“ und der Tumor-Angiogenese (Hendrix et al. 2003). In einer Studie von Seftor und Kollegen (Seftor et al. 2001) wurde beschrieben, dass auch die gamma 2- Kette von Laminin 5 an der „vasculogenic mimicry“ beteiligt ist. Wir konnten jedoch keine Expressionsunterschiede von Laminin 5 gamma 2 zwischen den Zellklonen mit verminderter BMP Aktivität und den Kontrollen detektieren. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von EphA2, VE-Cadherin, Id-1 und TEK, nicht jedoch von Laminin 5 gamma 2, durch BMPs reguliert werden kann.

In weiterführenden Analysen konnten wir, neben der autokrinen Funktion in Melanomzellen, zusätzlich parakrine Effekte von BMPs auf die Endothelzellen der Tumorumgebung detektieren. Es zeigte sich, dass rekombinantes BMP-2 und -4 als

chemoattraktive Substanzen für Endothelzellen fungieren und deren Migration in Richtung des Stimulus induzieren. Auch konditionierte Überstände von Melanomzellen zeigten diesen Effekt. Überstände von Melanomzellklonen mit verminderter BMP Aktivität wiesen jedoch ein stark vermindertes chemoattraktives Potential auf. Zusätzlich zu der chemoattraktiven Funktion, konnten wir auch eine Induktion der Tubenbildung durch BMP-2 und -4 *in vitro* beobachten. Diese *in vitro* Beobachtungen wurden durch Analysen der Melanomzellklone im Nacktmausmodell *in vivo* bestätigt. Tumore, die aus antisense BMP-4 transfizierten Melanomzellen entstanden sind, wiesen im Vergleich zu den Kontrollen kaum endotheliale Gefäßstrukturen auf. Dies hatte zur Folge, dass aufgrund der schlechteren Nähr- und Sauerstoff Versorgung sehr große apoptotische und nekrotische Bereiche in den antisense BMP-4 Tumoren zu finden waren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die einen pro-angiogenetischen Einfluss von BMPs in verschiedenen Zellmodellen zeigen konnten (Langenfeld und Langenfeld 2004; Raida et al. 2005). Langenfeld und Langenfeld zeigten, dass Tumore aus Lungenkrebszellen, die zusammen mit BMP-2 in Nacktmäuse injiziert wurden, mehr Blutgefäße aufweisen als die Kontrollen ohne BMP-2 (Langenfeld und Langenfeld 2004). Raida und Kollegen konnten ähnliche Effekte nach Transfektion von Brustkrebszellen mit BMP-2 beobachten (Raida et al. 2005). Zusätzlich dazu wurde beschrieben, dass BMPs durch Regulation der Expression und Aktivität von VEGF (vascular endothelial growth factor) an der Angiogenese der Knochen-Neubildung beteiligt sind (Deckers et al. 2002; Peng et al. 2005). VEGF scheint dabei auch in Melanomzellen eine Rolle bei der Angiogenese und der „vasculogenic mimicry“ zu spielen. Wir konnten zeigen, dass Melanomzellen in Ko-kultur mit Endothelzellen Tuben-artige Netzwerke ausbilden, die aus einer Mischung beider Zelltypen bestehen. In Ko-kulturen aus Endothelzellen und Melanomzellklonen mit verminderter BMP Aktivität waren diese Strukturen nicht detektierbar. Behandelt man diese Zellen jedoch mit rekombinantem VEGF, so lässt sich die Tubenbildungskapazität wiederherstellen (Rothhammer et al. 2006). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Effekte von BMPs auf die Tumorangiogenese und „vasculogenic mimicry“ durch VEGF vermittelt sein könnten.

Des weiteren konnten wir zeigen, dass die Expression von Id-1 und TEK durch BMPs reguliert wird. Id-1 und TEK spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Blutgefäßen während der Embryogenese und der Tumor-Angiogenese (Ward und

Dumont 2002; Benezra et al. 2001). Benezra und Kollegen konnten in Tumoren, die auf *Id1*<sup>+/-</sup> und *Id3*<sup>-/-</sup> knock out Mäuse transplantiert wurden, große nekrotische Bereiche aufgrund kaum vorhandener Vaskularisation beobachten (Benezra et al. 2001). Die Blutgefäße dieser Tiere konnten nicht verzweigen, um im Tumor neue Gefäßstrukturen auszubilden. TEK defiziente Mäuse zeichnen sich durch eine verringerte Lebensdauer der Endothelzellen und die verminderte Verzweigung der Blutgefäße aus. Diese Defekte führen letztendlich dazu, dass die Mäuse zwischen E9,5 und E12,5 versterben (Ward und Dumont 2002).

Diese Ergebnisse zeigen, dass BMPs nicht nur an der „vasculogenic mimicry“ beteiligt sind, sondern auch die Tumor- Angiogenese positiv beeinflussen können und damit zu einer ausreichende Nähr- und Sauerstoffversorgung des Tumors beitragen.

Neben den funktionellen Studien wurde auch der Regulationsmechanismus von BMPs im Melanom untersucht. Analysen von BMP-4 und -7 Promotorkonstrukten zeigten eine starke Aktivität dieser Konstrukte in verschiedenen Melanomzelllinien. Mutationen von ausgewählten Transkriptionsfaktorbindestellen im Promotorbereich von BMP-4 führten zu einer Reduktion bzw. zum kompletten Verlust der Promotoraktivität. Dies deutet darauf hin, dass die BMP-4 Expression durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Computer gestützte Analysen identifizierten Ets-1 und AP-2 als potentielle Faktoren, die an dieser Regulation beteiligt sind. In vorangegangenen Studien konnten wir zeigen, dass Ets-1 in Melanomzellen, sowie in Primärmelanomen und Metastasen stark exprimiert wird. In normalen Melanozyten hingegen lies sich keine Expression nachweisen. Des weiteren konnten wir zeigen, dass Ets-1 die Expression von MMP-1 (**m**atrix **m**etallo**p**roteinase **1**), MMP-3 (**m**atrix **m**etallo**p**roteinase **3**), uPA (**u**rokinase-type **p**lasminogen **a**ctivator) und Integrin  $\beta 3$  induziert und damit die Invasivität vom Melanomzellen positiv beeinflusst (Rothhammer et al. 2004). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte Ets-1 nun als positiver Regulator der BMP-4 Expression identifiziert werden. Zusätzlich zu Ets-1 wurde die Funktion von AP-2 alpha im Hinblick auf die BMP-4 Promotorregulation analysiert. Dabei zeigte sich, dass AP-2 alpha den BMP-4 Promotor im Melanom negativ reguliert. Es ist bekannt, dass die Expression von AP-2 alpha im Laufe der Melanomprogression verloren geht und dass AP-2 im Melanom als Tumorsuppressor wirkt. AP-2 alpha kann dabei sowohl als positiver als auch als negativer Regulator von Zielgenen fungieren (Bar-Eli 2001). Wir konnten somit zeigen, dass Ets-1 eine

aktivierende und AP-2 alpha eine reprimierende Wirkung auf die Transkription von BMP-4 hat.

Neben der Promotorregulation sollte auch das Zusammenspiel zwischen BMPs und anderen wichtigen Wachstumsfaktoren im Melanom untersucht werden. Es waren dabei einige Hinweise in der Literatur zu finden, dass die Expression verschiedener BMPs durch FGF-2 moduliert wird. Studien von Hoffman und Kollegen zeigten, dass die Expression von BMP-4 und -7 über FGFR-1 vermittelte Signaltransduktion bei der Entwicklung der Speicheldrüse reguliert wird (Hoffman et al. 2002). Zusätzlich dazu wurde in Myozyten mit homozygoter Mutation des FGFR-1 eine veränderte BMP-2 und -4 Expression beobachtet (Dell'Era et al. 2003). Sailer und Kollegen (Sailer et al. 2005) stellten fest, dass neuronale Stammzellen, die mit FGF-2 und BMP-2 behandelt wurden, zu Neuralleisten-Vorläuferzellen differenzieren. Zusätzlich dazu konnten sie zeigen, dass im Rahmen dieser Differenzierungsprozesse die Expression von BMP-2 durch die Behandlung mit FGF-2 und BMP-2 induziert wird (Sailer et al. 2005).

FGF-2 ist ein Wachstumsfaktor der bei der Melanomentstehung eine wichtige Rolle spielt. Melanomzellen können im Vergleich zu Melanozyten selbst FGF-2 produzieren und sezernieren und ist dabei als autokriner Stimulator für die autonome Proliferation der Melanomzellen unabdingbar (Lazar-Molnar et al. 2000). Expressionsanalysen zeigten, dass die BMP-4 und -7 Expression sowohl in Melanomzellen als auch in normalen Melanozyten durch FGF-2 induziert werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, wie FGF-2 die Expression von BMPs reguliert. Es ist bekannt, dass FGF-2 nach Bindung an Rezeptor Tyrosinkinasen die Signaltransduktion über die MAP Kinase Signalkaskade induziert (siehe Kapitel 1.4.4). Da die Aktivität des Transkriptionsfaktors Ets-1 durch MAP Kinase-abhängige Phosphorylierung reguliert wird, war es naheliegend die Beteiligung von Ets-1 in diesem Regulationsmechanismus zu untersuchen (Oikawa 2004). Wir konnten dabei zeigen, dass die Ets-1 Aktivität in Melanomzellen durch FGF-2 induzierbar ist. Aktiviertes Ets-1 bindet im Zellkern an den BMP Promotor und induziert dort die Transkription von BMPs.

Interessanterweise war sowohl die Induktion der Ets-1 Aktivität als auch die Regulation der BMP Expression nur nach Transfektion bzw. Transduktion der Zellen mit FGF-2 zu beobachten. Die Behandlung der Zellen mit rekombinantem FGF-2 zeigte keine Effekte. Es ist bekannt, dass die humane FGF-2 mRNA, durch Initiation

der Translation an unterschiedlichen Startkodons, in fünf verschiedene FGF-2 Isoformen (18 kDa, 22 kDa, 22,5 kDa, 24 kDa, 34 kDa) translatiert werden kann. Die Isoform mit dem geringsten Molekulargewicht (18 kDa) kann sezerniert werden und im extrazellulären Raum als autokriner und parakriner Wachstumsfaktor fungieren. Die anderen Isoformen (high molecular weight, hmw, Isoformen) liegen fast ausschließlich intrazellulär im Zytoplasma oder Zellkern vor. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass diese intrazellulären Isoformen unterschiedliche biologische Prozesse, zum Beispiel Serum-unabhängiges Wachstum (18 kDa - 24 kDa Isoformen), Proliferation (18 kDa - 24 kDa Isoformen), oder Metastasierung (24 kDa Isoform) in verschiedenen Zellsystemen induzieren (Sorensen et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass neben der Regulation der Ets-1 Aktivität durch Phosphorylierung auch intrazelluläre Mechanismen an der Aktivierung von Ets-1 und der folgenden Induktion der BMP Expression beteiligt sein könnten. Um die Regulation der BMP Expression durch FGF-2 genau aufzuklären, sind jedoch weiterführende Studien notwendig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit zur Aufklärung der BMP/ TGF $\beta$  Signalkaskade im malignen Melanom beitragen konnte. Es wurde ein neuer Inhibitor des TGF $\beta$  Signalweges charakterisiert, der es Melanomzellen ermöglicht anti-proliferativen Effekten durch TGF $\beta$  zu entgehen. Vor allem wurde jedoch die Expression und Funktion von *bone morphogenetic proteins* näher beleuchtet. Es hat sich gezeigt, dass viele BMPs differentiell von Melanomzellen nicht jedoch von normalen Melanozyten exprimiert werden. Funktionelle Analysen ergaben, dass BMPs einerseits die Migration und Invasion von Melanomzellen induzieren (autokrine Stimulation), andererseits aber auch auf die Endothelzellen der Tumorumgebung wirken (parakrine Stimulation). Es scheint, dass BMPs eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms spielen und dass die Inhibition dieser Moleküle einen möglichen Ansatzpunkt für die Tumorthherapie darstellen könnte.

## 6 Eigene Publikationen

Rothhammer T, Wild PJ, Meyer S, Bataille F, Pauer A, Klinkhammer-Schalke M, Hein R, Hofstaedter F, Bosserhoff AK.

Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) expression is a potential novel prognostic marker for recurrence in patients with primary melanoma.

Disease markers, IOS Press, zur Publikation akzeptiert

Rothhammer T, Bataille F, Spruss T, Eissner G, Bosserhoff AK.

Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma.

Oncogene. 2006 Dec 18; [Epub ahead of print]

PMID: 17173062

Rothhammer T, Bosserhoff AK.

Influence of melanoma inhibitory activity on transforming growth factor-beta signaling in malignant melanoma.

Melanoma Res. 2006 Aug;16(4):309-16.

PMID: 16845326

Poser I, Rothhammer T, Dooley S, Weiskirchen R, Bosserhoff AK.

Characterization of Sno expression in malignant melanoma.

Int J Oncol. 2005 May;26(5):1411-7.

PMID: 15809735

Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M, Bosserhoff AK.

Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration.

Cancer Res. 2005 Jan 15;65(2):448-56.

PMID: 15695386

## 7 Literaturverzeichnis

- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC and Lawley TJ. (1992). *J Invest Dermatol*, **99**, 683-690.
- Adler MJ and White CR, Jr. (1997). *Semin Cutan Med Surg*, **16**, 122-130.
- Altmeyer, P. and Bacharach-Buhles, M. Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Umweltmedizin. (2007). Springer-Verlag, Heidelberg.
- Amiri KI and Richmond A. (2005). *Cancer Metastasis Rev*, **24**, 301-313.
- Arndt S, Poser I, Schubert T, Moser M and Bosserhoff AK. (2005). *Lab Invest*, **85**, 1330-1341.
- Baade P and Coory M. (2005). *Aust N Z J Public Health*, **29**, 383-386.
- Baeuerle PA and Henkel T. (1994). *Annu Rev Immunol*, **12**, 141-179.
- Bahamonde ME and Lyons KM. (2001). *J Bone Joint Surg Am*, **83-A Suppl 1**, S56-S62.
- Balemans W and Van Hul W. (2002). *Dev Biol*, **250**, 231-250.
- Bar-Eli M. (2001). *Pigment Cell Res*, **14**, 78-85.
- Becker D, Meier CB and Herlyn M. (1989). *EMBO J*, **8**, 3685-3691.
- Benezra R, Rafii S and Lyden D. (2001). *Oncogene*, **20**, 8334-8341.
- Bernard DJ, Lee KB and Santos MM. (2006). *Reprod Biol Endocrinol*, **4**, 52.
- Bertz, J., Giersiepen, K., Haberland, J., Hentschel, S., Kaatsch, P., Katalinic, A., Stabenow, R., Stegmaier, C., and Ziegler, H. Krebs in Deutschland. 5.überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.(2006). Saarbrücken, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI.
- Biswas S, Chytil A, Washington K, Romero-Gallo J, Gorska AE, Wirth PS, Gautam S, Moses HL and Grady WM. (2004). *Cancer Res*, **64**, 4687-4692.
- Bogenrieder T, Landthaler M and Stolz W. (1998). *Hautarzt*, **49**, 91-100.
- Bosserhoff AK. (2005). *Pigment Cell Res*, **18**, 411-416.
- Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R, Stolz W and Buettner R. (1997). *Cancer Res*, **57**, 3149-3153.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F and Nieto MA. (2000). *Nat Cell Biol*, **2**, 76-83.
- Clark WH. (1991). *Br J Cancer*, **64**, 631-644.



- Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH and Van Horn M. (1984). *Hum Pathol*, **15**, 1147-1165.
- Coqueret O. (2003). *Trends Cell Biol*, **13**, 65-70.
- De Biase P and Capanna R. (2005). *Injury*, **36 Suppl 3**, S43-S46.
- de Gruijl FR. (1999). *Eur J Cancer*, **35**, 2003-2009.
- Deckers MM, van Bezooijen RL, van der HG, Hoogendam J, van Der BC, Papapoulos SE and Lowik CW. (2002). *Endocrinology*, **143**, 1545-1553.
- Dell'Era P, Ronca R, Coco L, Nicoli S, Metra M and Presta M. (2003). *Circ Res*, **93**, 414-420.
- Deng H, Makizumi R, Ravikumar TS, Dong H, Yang W and Yang WL. (2007). *Exp Cell Res*, **313**, 1033-1044.
- Eisenmann KM, VanBrocklin MW, Staffend NA, Kitchen SM and Koo HM. (2003). *Cancer Res*, **63**, 8330-8337.
- Folberg R and Maniotis AJ. (2004). *APMIS*, **112**, 508-525.
- Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massague J and Bernard O. (2003). *J Cell Biol*, **162**, 1089-1098.
- Gamer LW, Nove J, Levin M and Rosen V. (2005). *Dev Biol*, **285**, 156-168.
- Giacinti C and Giordano A. (2006). *Oncogene*, **25**, 5220-5227.
- Giono LE and Manfredi JJ. (2006). *J Cell Physiol*, **209**, 13-20.
- Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi MC and Holbrook NJ. (1997). *Oncogene*, **14**, 929-935.
- Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC and Taga R. (2005). *Braz J Med Biol Res*, **38**, 1463-1473.
- Halaban R, Kwon BS, Ghosh S, Delli BP and Baird A. (1988). *Oncogene Res*, **3**, 177-186.
- Harland M, Taylor CF, Chambers PA, Kukalich K, Randerson-Moor JA, Gruis NA, de Snoo FA, ter Huurne JA, Goldstein AM, Tucker MA, Bishop DT and Bishop JA. (2005). *Oncogene*, **24**, 4604-4608.
- Hein, R., Gummer, M., Messer, G., and Plewig, G. Klinische Typen des malignen Melanoms. [5. überarbeitete Ausgabe].(2000). München, Tumorzentrum München.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR and Seftor RE. (2003). *Oncogene*, **22**, 3070-3075.
- Hengge, U. R. and Dummer, R. Hrsg. Malignes Melanom. Standards und Innovationen in Diagnostik und Therapie. (2006). Köln, Deutscher Ärzte-Verlag GmbH.

- Henrik B and Olle N. (2001). *Acta Orthopaedica Scandinavica*, **72**, 318-319.
- Hoffman MP, Kidder BL, Steinberg ZL, Lakhani S, Ho S, Kleinman HK and Larsen M. (2002). *Development*, **129**, 5767-5778.
- Hogan BL. (1996). *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 432-438.
- Hsu MY, Meier F and Herlyn M. (2002). *Differentiation*, **70**, 522-536.
- Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA and Bar-Eli M. (1998). *EMBO J*, **17**, 4358-4369.
- Jean D, Gershenwald JE, Huang S, Luca M, Hudson MJ, Tainsky MA and Bar-Eli M. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 16501-16508.
- Karin M, Cao Y, Greten FR and Li ZW. (2002). *Nat Rev Cancer*, **2**, 301-310.
- Kincaid MC. (1998). *Cancer Control*, **5**, 299-309.
- Kobayashi M, Nishita M, Mishima T, Ohashi K and Mizuno K. (2006). *EMBO J*, **25**, 713-726.
- Korchynskiy O and ten Dijke P. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 4883-4891.
- Krasagakis K, Garbe C, Schrier PI and Orfanos CE. (1994). *Anticancer Res*, **14**, 2565-2571.
- Kuphal S and Bosserhoff AK. (2006). *Oncogene*, **25**, 248-259.
- Kuphal S, Palm HG, Poser I and Bosserhoff AK. (2005). *Melanoma Res*, **15**, 305-313.
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P and Langenfeld J. (2003). *Carcinogenesis*, **24**, 1445-1454.
- Langenfeld EM and Langenfeld J. (2004). *Mol Cancer Res*, **2**, 141-149.
- Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S and Falus A. (2000). *Cytokine*, **12**, 547-554.
- Lee HJ, Yun CH, Lim SH, Kim BC, Baik KG, Kim JM, Kim WH and Kim SJ. (2007). *Oncogene*, **26**, 173-185.
- Levy C, Khaled M and Fisher DE. (2006). *Trends Mol Med*, **12**, 406-414.
- Li G, Satyamoorthy K, Meier F, Berking C, Bogenrieder T and Herlyn M. (2003). *Oncogene*, **22**, 3162-3171.
- Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Soon LC, Zhuang L, McCarthy SW and Scolyer RA. (2006). *Pathology*, **38**, 287-301.
- Liu JP and Jessell TM. (1998). *Development*, **125**, 5055-5067.
- Lucke CD, Philpott A, Metcalfe JC, Thompson AM, Hughes-Davies L, Kemp PR and Hesketh R. (2001). *Cancer Res*, **61**, 482-485.

- Lyons AB. (2000). *J Immunol Methods*, **243**, 147-154.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS and Hendrix MJ. (1999). *Am J Pathol*, **155**, 739-752.
- McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ, Golub TR and Fisher DE. (2002). *Cell*, **109**, 707-718.
- Medrano EE. (2003). *Oncogene*, **22**, 3123-3129.
- Meier F, Caroli U, Satyamoorthy K, Schitteck B, Bauer J, Berking C, Moller H, Maczey E, Rassner G, Herlyn M and Garbe C. (2003). *Exp Dermatol*, **12**, 296-306.
- Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, Hsu MY, Schitteck B, Garbe C and Herlyn M. (1998). *Front Biosci*, **3**, D1005-D1010.
- Miller AJ and Mihm MC, Jr. (2006). *N Engl J Med*, **355**, 51-65.
- Moretti S, Pinzi C, Berti E, Spallanzani A, Chiarugi A, Boddi V, Reali UM and Giannotti B. (1997). *Melanoma Res*, **7**, 313-321.
- Nakashima A and Tamura M. (2006). *Front Biosci*, **11**, 1667-1678.
- Oikawa T. (2004). *Cancer Sci*, **95**, 626-633.
- Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH and Garbe C. (1994). *Hautarzt*, **45**, 285-291.
- Panka DJ, Atkins MB and Mier JW. (2006). *Clin Cancer Res*, **12**, 2371s-2375s.
- Pardali K, Kurisaki A, Moren A, ten Dijke P, Kardassis D and Moustakas A. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 29244-29256.
- Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM and Huard J. (2005). *J Bone Miner Res*, **20**, 2017-2027.
- Phillips FM, Turner AS, Seim HB, III, MacLeay J, Toth CA, Pierce AR and Wheeler DL. (2006). *Spine J*, **6**, 500-506.
- Pho L, Grossman D and Leachman SA. (2006). *Curr Opin Oncol*, **18**, 173-179.
- Pla P, Moore R, Morali OG, Grille S, Martinozzi S, Delmas V and Larue L. (2001). *J Cell Physiol*, **189**, 121-132.
- Polsky D and Cordon-Cardo C. (2003). *Oncogene*, **22**, 3087-3091.
- Poser I and Bosserhoff AK. (2004). *Histol Histopathol*, **19**, 173-188.
- Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R and Bosserhoff AK. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 24661-24666.
- Poser I, Rothhammer T, Dooley S, Weiskirchen R and Bosserhoff AK. (2005). *Int J Oncol*, **26**, 1411-1417.

- Poser I, Tatzel J, Kuphal S and Bosserhoff AK. (2004). *Oncogene*, **23**, 6115-6124.
- Radisky DC. (2005). *J Cell Sci*, **118**, 4325-4326.
- Raida M, Clement JH, Leek RD, Ameri K, Bicknell R, Niederwieser D and Harris AL. (2005). *J Cancer Res Clin Oncol*, **131**, 741-750.
- Reed JA, Bales E, Xu W, Okan NA, Bandyopadhyay D and Medrano EE. (2001). *Cancer Res*, **61**, 8074-8078.
- Ridley AJ and Hall A. (1992). *Cell*, **70**, 389-399.
- Rothhammer T, Bataille F, Spruss T, Eissner G and Bosserhoff AK. (2006). *Oncogene*. Online Publikation vor dem Druck.
- Rothhammer T and Bosserhoff AK. (2006). *Melanoma Res*, **16**, 309-316.
- Rothhammer T, Hahne JC, Florin A, Poser I, Soncin F, Wernert N and Bosserhoff AK. (2004). *Cell Mol Life Sci*, **61**, 118-128.
- Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M and Bosserhoff AK. (2005). *Cancer Res*, **65**, 448-456.
- Rothhammer, T., Wild, P. J., Meyer, S., Bataille, F., Pauer, A., Klinkhammer-Schalke, M., Hein, R., Hofstaedter, F., and Bosserhoff, A. K. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) expression is a potential novel prognostic marker for recurrence in patients with primary melanoma. Disease markers [zur Publikation akzeptiert].(2007). IOS Press Inc.
- Royer D, Grinstein E and Janz M. (1999). *Der Onkologe*, **V5**, 884-890.
- Ruppert R, Hoffmann E and Sebald W. (1996). *Eur J Biochem*, **237**, 295-302.
- Sailer MH, Hazel TG, Panchision DM, Hoepfner DJ, Schwab ME and McKay RD. (2005). *J Cell Sci*, **118**, 5849-5860.
- Sander, C. A., Flaig, M. J., Starz, H., Gummer, M., and Haraida, S. Histopathologie des malignen Melanoms. [MANUAL Maligne Melanome], 28-31.(2000). München, Tumorzentrum München.
- Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, Kalabis J and Herlyn M. (2002). *Cell Growth Differ*, **13**, 87-93.
- Sauter ER and Herlyn M. (1998). *Mol Carcinog*, **23**, 132-143.
- Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V and Hendrix MJ. (2001). *Cancer Res*, **61**, 6322-6327.
- Sela-Donenfeld D and Kalcheim C. (1999). *Development*, **126**, 4749-4762.
- Shapiro GI. (2006). *J Clin Oncol*, **24**, 1770-1783.
- Sharpless E and Chin L. (2003). *Oncogene*, **22**, 3092-3098.

- Smalley KS. (2003). *Int J Cancer*, **104**, 527-532.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC. (1985). *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Sorensen V, Nilsen T and Wiedlocha A. (2006). *Bioessays*, **28**, 504-514.
- Steingrimsson E, Copeland NG and Jenkins NA. (2004). *Annu Rev Genet*, **38**, 365-411.
- Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K and Akslen LA. (2002). *Am J Pathol*, **161**, 229-237.
- Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q and Luo K. (1999). *Science*, **286**, 771-774.
- Tada A, Pereira E, Beitner-Johnson D, Kavanagh R and Abdel-Malek ZA. (2002). *J Invest Dermatol*, **118**, 316-322.
- Takeda M, Mizuide M, Oka M, Watabe T, Inoue H, Suzuki H, Fujita T, Imamura T, Miyazono K and Miyazawa K. (2004). *Mol Biol Cell*, **15**, 963-972.
- Tatzel J, Poser I, Schroeder J and Bosserhoff AK. (2005). *Pigment Cell Res*, **18**, 92-101.
- ten Dijke P, Korchynskyi O, Valdimarsdottir G and Goumans MJ. (2003). *Mol Cell Endocrinol*, **211**, 105-113.
- Van Belle P, Rodeck U, Nuamah I, Halpern AC and Elder DE. (1996). *Am J Pathol*, **148**, 1887-1894.
- Vance KW and Goding CR. (2004). *Pigment Cell Res*, **17**, 318-325.
- Volkenandt, M., Schmid-Wendtner, M. H., Messer, G., and Plewig, G. Stadieneinteilung des malignen Melanoms. MANUAL Maligne Melanome , 16-18.(2000). München, Tumorzentrum München.
- Wagener, C. Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumore. 2. aktualisierte und erweiterte Auflage.(1999). Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Ward NL and Dumont DJ. (2002). *Semin Cell Dev Biol*, **13**, 19-27.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM and Wang EA. (1988). *Science*, **242**, 1528-1534.
- Xu LY and Koo J. (2006). *Int J Dermatol*, **45**, 1275-1283.
- Yamamoto Y and Oelgeschlager M. (2004). *Naturwissenschaften*, **91**, 519-534.
- Yang S, Zhong C, Frenkel B, Reddi AH and Roy-Burman P. (2005). *Cancer Res*, **65**, 5769-5777.
- Yayon A, Ma YS, Safran M, Klagsbrun M and Halaban R. (1997). *Oncogene*, **14**, 2999-3009.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

alpha MSH	alpha melanocyte-stimulating hormone
ALM	akral-lentiginöses Melanom
APS	Ammoniumpersulfat
AP-2 alpha	activating enhancer-binding protein 2 alpha
bFGF/ FGF-2	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
BMPR	bone morphogenetic proteine receptor
BSA	bovine serum albumin
CDK	cyclin dependent kinase
c-KIT	stem cell factor receptor
CXCL	chemokine, CXC motif ligand
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-Cadherin	epithelial cadherin
ELAM	endothelial leukocyte adhesion molecule
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ERK	extracellular signal regulated protein kinase
<i>et al.</i>	Lat.: und andere
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FKS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	granulocyte /macrophage colony stimulating factor
HDM2	human double minute 2
HGF	hepatocyte growth factor
ICAM	intercellular adhesion molecule
IGF	insulin like growth factor
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KIT/ SCF	stem cell factor
LMM	lentigo-maligna Melanom

MCAM	melanoma cell adhesion molecule
min	Minuten
MITF	microphthalmia associated transcription factor
MMP	Matrixmetalloproteinase
N-Cadherin	neuronal cadherin
NFkB	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells
NHEM	Normale humane epidermale Melanozyten
NM	noduläres Melanom
OD	Optische Dichte
PAA	Poly-acrylamid
PAR-1	protease-activated receptor 1
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
RB	Retinoblastom Protein
RGP	radial growth phase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SCF	stem cell factor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
TGF alpha	transforming growth factor alpha
TGF beta	transforming growth factor beta
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	tumor necrosis factor
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
uPA	Urokinase Typ des Plasminogen Aktivators
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VGP	vertical growth phase
(v/v)	Volumenverhältnis
(w/v)	Masse pro Volumen

## Danksagung

Nachfolgend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders herzlich bedanken will ich mich bei Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff für die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Danke für ein immerzu offenes Ohr, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Fähigkeit jedesmal erneut meine Begeisterung für molekularbiologische Fragestellungen zu wecken.

Vielen, vielen Dank, dass Du mir die Chance gegeben hast, trotz verschiedener Hindernisse in Deiner Arbeitsgruppe zu promovieren!

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Schneuwly für die Betreuung meiner Doktorarbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät und die Unterstützung bei der Promotionseignungsprüfung.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg durchführen zu können und auch für die finanzielle Unterstützung bei Kongressreisen.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die gesamte AG Boßerhoff für den Spass bei der Arbeit und das tolle Arbeitsklima. Vielen Dank vor allem an Sibylla, für die vielen RNAs, RIPAs, Kernpräps, ... die ich im Laufe meiner Arbeit aus Deiner Zellbank verbraucht habe und ganz speziellen Dank für den fluffigsten Gugelhupf den man sich vorstellen kann!

Danke Silke, Steffi und Ina für die ständige Diskussionsbereitschaft, die Hilfe im Labor und für das ein oder andere kleine Schwätzchen bei einem Kaffee.

Vielen Dank auch an alle Kooperationspartner, vor allem Frauke für die Hilfe mit den histologischen Auswertungen und Herrn Dr. Thilo Spruß für die Überwachung der Mausexperimente.

Ein riesiges Dankeschön natürlich auch an meine Eltern, die mir mein Studium und die Promotion erst ermöglicht haben.

Norbert, Dir vielen Dank für die Geduld und die Ablenkung während der Promotionseignungsprüfung und dem Verfassen der Dissertation!



## Erklärung

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

Ort, Datum

Tanja Rothhammer