

Aus der Abteilung für Molekulare Pathologie
Frau Prof. Dr. rer. nat. Anja-Katrin Bosserhoff
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**DATENBANK-GESTÜTZTE MOLEKULARBIOLOGISCHE
ANALYSE MELANOMRELEVANTER GENE**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sonja Hetterich

2013

Aus der Abteilung für Molekulare Pathologie
Frau Prof. Dr. rer. nat. Anja-Katrin Bosserhoff
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**DATENBANK-GESTÜTZTE MOLEKULARBIOLOGISCHE
ANALYSE MELANOMRELEVANTER GENE**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sonja Hetterich

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Sigrid Karrer
Tag der mündlichen Prüfung:	30.07.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
1 Einleitung	10
1.1 Struktur und Aufbau der Haut.....	10
1.1.1 Epidermis.....	10
1.1.2 Dermis	13
1.1.3 Subkutis	13
1.2 Das maligne Melanom	13
1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	14
1.2.2 Klassifikation.....	16
1.2.3 Stadieneinteilung	17
1.2.4 Prognose	18
1.2.5 Pathogenese	20
1.2.6 Bereits bekannte Gene bei der Entstehung des malignen Melanoms	21
1.2.7 Molekulare Grundlagen bei der Entstehung des malignen Melanoms	24
1.3 Beschreibung der Internetseite des <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI) und der Microarrays.....	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Materialien	31
2.1.1 Studien der Datenbank GEO Profiles des NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>).....	31
2.1.2 Säugerzelllinien	34
2.1.3 Gewebeproben.....	34
2.1.4 Humane Oligonukleotide.....	35
2.1.5 Allgemeine Materialien	35
2.1.6 Geräte.....	36
2.1.7 Lösungen	36

2.1.8	GraphPad Prism Programm.....	37
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	RNA-Isolation aus Säugerzellen	37
2.2.2	Vermessen der RNA.....	38
2.2.3	Reverse Transkription.....	38
2.2.4	<i>Realtime</i> -PCR	40
2.2.5	Gelelektrophorese.....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Ergebnisse der Internetrecherche	42
3.2	Molekularbiologische Überprüfung der Genexpression ausgewählter Gene..	71
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
3.3.1	KCNN2.....	76
3.3.2	SHFM1	77
3.3.3	PLXNA1	78
4	Diskussion.....	80
4.1	KCNN2 (<i>potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2</i>).....	80
4.1.1	Allgemeine Funktionen von KCNN2.....	80
4.1.2	Rolle von KCNN2 in Melanomzellen unter hypoxischen Bedingungen.....	81
4.2	SHFM1 (<i>split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1</i>).....	84
4.2.1	Allgemeine Funktionen von SHFM1	84
4.2.2	Mögliche Induktion der Melanogenese durch Interaktion von SHFM1 mit p53	84
4.2.3	Schwächung der Reparaturmechanismen der Zellen durch Mangel an SHFM1	85
4.2.4	Veränderungen der Kontaktinhibition in epidermalen Zellen durch SHFM1	87
4.2.5	Chromosomale Instabilität durch Ausschalten von SHFM1	88
4.3	PLXNA1 (<i>Plexin A1</i>)	90
4.3.1	Allgemeine Funktionen von PLXNA1	90

4.3.2	Rolle von Plexin A1 bei Angiogenese und Tumorproliferation.....	91
4.3.3	Erhöhung der Aktivität des VEGF-Rezeptors und Aktivierung des NFκB-Weges.....	92
4.3.4	Rolle der Plexine im malignen Melanom.....	93
4.3.5	Genexpression von Plexin A1 in weiteren Tumorarten.....	94
4.4	Diskussion der Methode der Analyse einer Internetdatenbank als Quelle für melanomrelevante Gene	96
4.4.1	Gene mit bereits bekannter Regulation im Melanom.....	96
4.4.2	<i>Affymetrix Microarrays</i> als Ausgangspunkt der Analyse.....	99
4.4.3	Mögliche Ursachen der Differenzen zwischen der Analyse der <i>Affymetrix Microarrays</i> und den eigenen experimentellen Untersuchungen	100
5	Literaturverzeichnis	104
6	Abkürzungsverzeichnis	119
7	Danksagung.....	123
8	Curriculum Vitae.....	124

Zusammenfassung

Das maligne Melanom, das von den Melanozyten der Haut ausgeht, zählt zu den bösartigsten Tumorerkrankungen des Menschen. Aufgrund seiner Eigenschaft frühzeitig zu metastasieren, ist es durch eine oft schlechte Prognose und einen häufig letalen Verlauf gekennzeichnet. Häufige Ursachen für die Entartung der Melanozyten sind Mutationen oder Expressionsänderungen von Genen dieser Zellen. In den vergangenen Jahren wurden bereits große Fortschritte bei der Identifizierung von Genen, die zur Pathogenese des Melanoms beitragen, erzielt.

Ziel dieser Arbeit war, anhand einer Onlinedatenbank weitere Gene zu finden, die aufgrund der veröffentlichten Daten auf eine Assoziation mit dem malignen Melanom hinweisen.

Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Studien der Internetdatenbank GEO Profiles des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) analysiert. Für 8000 Gene wurden bis zu sieben *Affymetrix Arrays* auf dieser Internetplattform des NCBI im Hinblick auf eine Korrelation mit dem malignen Melanom untersucht. Von den Genen, die anhand dieser Analyse als im Melanom reguliert gefunden wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Gene KCNN2 (*potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2*), SHFM1 (*split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1*) und PLXNA1 (*Plexin A1*) für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die untersuchten Arrayexperimente zeigten für alle drei Gene eine signifikant erhöhte Expression im Melanom im Vergleich zu normalen Melanozyten. Für alle drei Gene war bislang noch keine Regulation im Melanom bekannt.

Anschließend wurde experimentell geprüft, ob der gefundene Zusammenhang für diese drei Gene bei der Melanopathogenese nachgewiesen oder widerlegt werden kann. Hierfür wurde die Expression der Gene in NHEMs (normale humane epidermale Melanozyten), primären Melanomzelllinien (Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso, Mel Ho) und metastasierten Melanomzelllinien (Sk Mel 28, HTZ 19, Mel Im und Mel Ju) mittels quantitativer *real-time* PCR gemessen.

Für KCNN2 und SHFM1 fanden sich jedoch in den experimentellen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den normalen Melanozyten und den Primärtumor- bzw. Metastasenzelllinien. Bei PLXNA1 hingegen

war die Expressionsstärke des Gens sowohl in den Primärtumor- als auch in den Metastazenzelllinien im Vergleich zu den nicht entarteten Melanozyten signifikant erniedrigt. Daher wurde die Expression dieses Gens anschließend in Gewebeproben gemessen. Auch hierbei wurden Proben aus normaler Haut mit denen aus primärem Tumorgewebe und Metastasen (Lunge, Lymphknoten, Haut) verglichen. Im Gegensatz zu den Expressionsmessungen in den Zelllinien fand sich hierbei eine signifikant erhöhte Expression in den Proben aus Primärtumor im Vergleich zu normaler Haut oder Metastasen.

In den untersuchten Zelllinien konnte also für keines der drei Gene die aufgrund der Analyse der GEO Profiles-Datenbank erwartete Expression nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen dieser differentiellen Expression werden im Rahmen dieser Arbeit diskutiert. Die experimentelle Untersuchung von Gewebeproben dagegen konnte die erhöhte Expression von PLXNA1 im Melanom bestätigen.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob eine solche Datenbank grundsätzlich geeignet ist, Gene herauszufiltern, die eine Korrelation mit der Melanomentstehung oder -entwicklung aufweisen. Für zwei der drei näher untersuchten Gene muss dies prinzipiell verneint werden, da die molekularbiologische Untersuchung bei beiden Genen die durch die Internetanalyse vermutete höhere Expression im malignen Melanom nicht bestätigen konnte. Allerdings wurde bei diesen beiden Genen die Expression nur in Zelllinien gemessen. Bei dem dritten untersuchten Gen ließ sich die erwartete höhere Expression in Gewebeproben nachweisen. Die Gewebeproben spiegeln die tatsächlich vorhandene Genexpression in diesem Probenmaterial wider, während die Genexpression in den Zellkulturen unter anderem von dem Kulturmedium und den Anzuchtbedingungen abhängt und damit störanfällig sein kann. Daher muss in diesem Fall das Ergebnis in den Gewebeproben als ausschlaggebender als das aus den Zelllinien erachtet werden. In diesem Fall weisen also sowohl die Expressionsmessung im Gewebe als auch die Analyse der Online-Datenbank eine verstärkte Expression von PLXNA1 im Melanom im Vergleich zu normalen Melanozyten auf. Dies zeigt, dass die verwendete Methode zumindest bedingt geeignet ist, um Gene zu identifizieren, die eine Korrelation mit dem Melanom aufweisen.

1 Einleitung

1.1 Struktur und Aufbau der Haut

Die Haut als das größte Organ des menschlichen Organismus besteht von außen nach innen aus drei Schichten: die oberste Schicht, die den Organismus zur Umwelt abgrenzt, bildet die Epidermis (Oberhaut), die mit der darunterliegenden Dermis (Lederhaut) als Kutis zusammengefasst wird. Unter der Kutis liegt als dritte Schicht ein Fettgewebepolster, die sogenannte Subkutis (Unterhaut).

Integraler Bestandteil der Haut sind die Adnexorgane, die zumeist tief in der Dermis liegen: Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen.

Im Folgenden sollen nun die einzelnen Schichten der Haut genauer dargestellt werden (Fritsch, 2004; Moll, 2010).

1.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel ektodermalen Ursprungs mit einer Dicke zwischen 30 und 300 μm . Neben den Keratinozyten, die mit über 90 % den Hauptteil aller Zellen ausmachen, kommen Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkelzellen und Lymphozyten vor. Die Epidermis enthält Nervenfasern und wird durch Diffusion aus der darunter liegenden Dermis ernährt, da sie keine Gefäße enthält. Mit dieser ist sie über epidermale Reteleisten und bindegewebige dermale Papillen verzahnt. Diese Übergangszone wird dermoepidermale Junctionszone genannt.

Man kann die Epidermis von außen nach innen in vier horizontale Zelllagen gliedern: zuoberst liegt das Stratum corneum, das aus zehn bis 20 Lagen flacher kernloser Keratinozyten besteht. Unter dieser Hornschicht findet sich das ein- bis dreilagige Stratum granulosum (Körnerschicht) mit tief basophilen Keratohyalinkörnern. Anschließend folgen drei bis fünf Lagen durch Desmosomen miteinander verbundener Keratinozyten, das sogenannte Stratum spinosum, und die unterste Schicht stellt das Stratum basale mit einer einlagigen Schicht aus zylindrischen Basalzellen dar (Fritsch, 2004; Moll, 2010).

Keratinocyten

Die zahlenmäßig in der Epidermis am häufigsten vorkommenden Keratinocyten unterliegen der ungefähr vier Wochen dauernden terminalen epidermalen Differenzierung: Eine Stammzelle der Basalschicht teilt sich, wobei eine der Tochterzellen als neue Stammzelle fungiert und die andere Tochterzelle von suprabasal unter Veränderung ihrer Struktur zur Hautoberfläche wandert. Zuerst wird sie von der Basalzelle zu einer Stachelzelle im Stratum spinosum und dann über eine Körnerzelle unter Verlust der Zellorganellen zu einer Hornzelle umgewandelt, um schließlich apoptotisch zu werden und als Hornschuppe abgeschilfert zu werden.

Keratinocyten sind untereinander über Zonula adhaerentes miteinander verbunden und über Hemidesmosomen mit der Basalzellschicht verankert. Über aus Connexinen bestehende *Gap Junctions* können sie untereinander kommunizieren (Fritsch, 2004; Moll, 2010).

Melanozyten

Melanozyten sind dendritische Zellen neuroektodermaler Herkunft, die physiologischerweise mit einer Dichte von 1100 bis 1500 Zellen pro mm² im Stratum basale der Epidermis und in den äußeren Wurzelscheiden des Haarfollikels liegen. Auf gewisse Stimuli hin, darunter hauptsächlich das Einwirken von UV-Licht, synthetisieren sie das schwärzliche Pigment Melanin aus Tyrosin und sind somit für die Pigmentierung der Haut verantwortlich. Sie stehen über ihre Dendriten mit ungefähr 30 Keratinocyten in Kontakt, was als epidermale Melanineinheit bezeichnet wird.

Melanozyten besitzen spezielle Zellorganellen, die Melanosomen, in denen die Biosynthese des Melanins stattfindet. Hierzu wird die Aminosäure Tyrosin zunächst durch das Enzym Tyrosinase oxidiert und dann nach mehreren Schritten zu Eumelanin und Phäomelanin polymerisiert. Dieses wird in die Proteinmatrix des Melanosoms eingelagert. Die Melanosomen wandern anschließend in die Peripherie der Melanozyten und werden dann an den Dendritenspitzen an die umgebenden Keratinocyten abgegeben (Pigmenttransfer). Dort liegen die Melanosomen einzeln oder in Melanosomenkomplexen im Zytoplasma, was von der Größe der Melanosomen abhängt. Während bei dunkelhäutigen Menschen die Melanosomen größer sind und sich die Melanosomen daher einzeln

im Zytoplasma der Keratinozyten verteilen, lagern sich bei hellhäutigen Menschen die eher kleinen Melanosomen oft zu Komplexen zusammen.

Neben dem Abfangen freier Radikale ist der effektive Schutz vor UV-Strahlen die Hauptaufgabe des Melanins. Dies erfolgt über die Absorption der Photonen und die anschließende Umwandlung in Wärme. Bei UV-Exposition wird das Enzym Tyrosinase in den bis dahin ruhenden Melanozyten hochreguliert und die Melaninsynthese gestartet. Über einen Anstieg sowohl der Zahl der Melanosomen als auch der Dendriten kommt es zu einer Intensivierung des Proteintransfers in die Keratinozyten. Außerdem wird die Proliferation der Melanozyten stimuliert, so dass über eine Erhöhung der Mito-
serate auch die Anzahl der Melanozyten steigt. Nach Beendigung der UV-Exposition kommt es physiologischerweise zu einem langsamen Abfall der Tyrosinase-Aktivität (Fritsch, 2004; Moll, 2010).

Langerhans-Zellen

Die suprabasal in der Epidermis liegenden Langerhans-Zellen sind, wie die Melanozyten auch, dendritische Zellen. Sie wandern aus dem Knochenmark in die Haut ein und differenzieren sich erst dort zu den immunologisch wirksamen Klasse-II-Antigen tragenden Leukozyten. Indem sie ruhende T-Lymphozyten stimulieren, leiten sie primär T-Zell-abhängige Immunantworten ein und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Kontaktsensibilisierung, Transplantatabstoßungsreaktionen und weiteren immunologischen Geschehen der Haut.

Nach Kontakt mit dem Antigen durchlaufen Langerhans-Zellen einen Reifungsprozess und verlassen die Epidermis, um anschließend über afferente Lymphbahnen in die regionären Lymphknoten zu gelangen. Um eine Homöostase sicherzustellen, kommt es gleichzeitig zu einem Influx von Vorläuferzellen in die Epidermis. Im Lymphknoten leiten sie die Immunantwort durch Aktivierung von T-Zellen mit passendem Antigen-spezifischen Rezeptor ein (Fritsch, 2004; Moll, 2010).

Merkelzellen

Merkelzellen liegen einzeln oder als Aggregate im Stratum basale der Epidermis. Ihre Dichte beträgt 20 bis 300 pro mm² Haut, wobei sie besonders dicht an den Fingerbeeren, Lippen, Gaumen und Zehenballen vorkommen. Da sie als neuroendokrine Zellen

bzw. als Sinneszellen fungieren und eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von dynamischen und statischen Reizen sowie Vibrationsreizen spielen, sind sie über Synapsen mit afferenten Neuriten verbunden (Fritsch, 2004; Moll, 2010).

1.1.2 Dermis

Die Dermis ist ein fibroelastisches Gewebe, das vor allem aus Fibroblasten besteht. Diese bilden mit ihren Fortsätzen ein Netz, in das außerdem Gefäße und Nerven eingelagert sind. Die Dermis lässt sich in zwei Schichten einteilen: das Stratum papillare ist mit seinen Kollagenfasern lockerer als das darunter liegende aus elastischen Fasern aufgebaute Stratum reticulare. Für die Stabilität und Dehnbarkeit der Kollagenfasern sorgt das Kollagen Typ I, das in der ganzen Dermis vorhanden ist (Fritsch, 2004; Moll, 2010).

1.1.3 Subkutis

Die unterste Schicht der Haut ist die Subkutis, die aus läppchenartig aufgebaute Fettgewebe besteht. Dessen bindegewebige Septen kommunizieren mit der Dermis und sind Träger zahlreicher Gefäße und Nerven. Die Funktion der Subkutis besteht vor allem in der Wärmeisolierung. Außerdem wirkt sie als mechanisches Schutzpolster und Energiespeicher und sorgt für die Beweglichkeit der Haut gegenüber der Unterlage (Fritsch, 2004; Moll, 2010).

1.2 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom der Haut ist ein bösartiger Tumor, der von den Melanozyten der Haut ausgeht (Fritsch, 2004). Obwohl es nicht der häufigste Hauttumor ist, gilt das auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnete Melanom als wichtigster und auch bösartigster Tumor in der Dermatologie. Aufgrund seiner Eigenschaft sehr frühzeitig zu metastasieren ist es durch eine oft schlechte Prognose und einen häufig letalen Verlauf gekennzeichnet (Hengge und Dummer, 2006).

1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das maligne Melanom der Haut kommt vor allem in der weißen Bevölkerung vor. Weltweit gesehen hat die Inzidenz in den Industrieländern in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen. Eine besonders hohe Zahl an Neuerkrankungen verzeichneten Australien und Neuseeland mit einer Inzidenz von 50,2 bzw. 42,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern im Jahr 2002, während es in der Bundesrepublik Deutschland im gleichen Jahr 10,3 pro 100.000 waren. Damit hat sich die Inzidenz in der Bundesrepublik innerhalb von 30 Jahren um mehr als das dreifache erhöht (Anfang der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts lag die Inzidenz in der BRD bei 3 Fällen pro 100.000 Einwohnern) (Hengge und Dummer, 2006). Gemäß einer Schätzung des Robert-Koch-Instituts in Berlin erkrankten in Deutschland im Jahr 2006 7.360 Männer und 8.470 Frauen am malignen Melanom (Bertz et al., 2010). Mit insgesamt 2.287 Sterbefällen im gleichen Jahr machte dieser Tumor ungefähr 1 % aller Krebstodesfälle aus. Insgesamt lag die Mortalitätsrate im Jahr 2002 in Deutschland bei 2,8 Fällen pro 100.000 Einwohnern und damit deutlich niedriger als in Neuseeland (8,1/100.000/Jahr) oder Australien (7,0/100.000/Jahr) (Hengge und Dummer, 2006). Die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) lag bei Männern bei 85 % und bei Frauen bei 90 % (Bertz et al., 2010). Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung betrug 59 Jahre bei Männern und 60 Jahre bei Frauen.

Während Kaukasier deutlich häufiger erkranken als Personen anderen ethnischen Ursprungs, kann man bei Dunkelhäutigen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose meist dickere Primärtumore mit häufigeren Ulzerationen oder Metastasierungen finden (Hengge und Dummer, 2006).

Anhand zahlreicher Studien konnten sowohl genetische als auch verhaltensbedingte Risikofaktoren nachgewiesen werden. In rund 10 % der Fälle wird eine positive Familienanamnese gefunden, wobei das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung meist niedriger und der Verlauf milder als bei den sporadisch auftretenden Melanomen ist (Fritsch, 2004). Von diesen anlagebedingten Melanomen tritt der überwiegende Teil im Rahmen des autosomal-dominant vererbten *Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrom* FAMMM (atypisches Nävusyndrom) auf. Es kommt zu einer Deletion auf Chromosom 9, was zu einer Mutation im Tumorsuppressorgen CDKN2A führt. Dieser

Genabschnitt kodiert des weiteren unter anderem für p16INK4a. Eine Mutation dieses Gens findet man bei einem bedeutenden Anteil sowohl der familiären als auch der sporadischen Melanome. Es konnte gezeigt werden, dass die Melanomdicke bei familiären Melanomen mit einer CDKN2A-Mutation direkt mit der p16-Expression korreliert (Hengge und Dummer, 2006).

Des weiteren finden sich auch polygene Konstitutionen, die mit einem erhöhten Risiko für die Melanomentstehung einhergehen. So beträgt das relative Risiko für Rothaarige 2,38, für Blonde 1,84 und für Personen mit hellbraunen Haaren 1,49 im Vergleich zu Individuen mit schwarzen oder dunkelbraunen Haaren. Bei Menschen mit blauen Augen erhöht sich das Risiko schwarzen Hautkrebs zu entwickeln um den Faktor 1,55 gegenüber denjenigen mit dunklen Augen. Je nach Anzahl der melanozytären Nävi kommt es auch hierbei zu einer Steigerung des Risikos: während es sich bei einer Zahl zwischen elf und 50 Nävi verdoppelt, wird es bei mehr als 50 Nävi vervierfacht und bei über 100 Nävi bereits verachtstacht. Bei zehn oder mehr atypischen Nävi verzehnfacht sich das Risiko sogar. Während sich beim sogenannten kongenitalen Nävuszellnävus ab einem Durchmesser von 1,5 cm ein leicht erhöhtes Risiko ergibt, zeigte sich bei kongenitalen Riesennävi mit einem Durchmesser von mehr als 20 cm eine Entartungswahrscheinlichkeit von 4,5 % innerhalb von fünf Jahren (Hengge und Dummer, 2006).

Weitere angeborene Risikofaktoren für die Entstehung eines malignen Melanoms sind die Neigung zu Sommersprossen, die Unfähigkeit zu bräunen sowie die Tendenz, Sonnenbrände zu entwickeln (Borden, 2002).

Neben diesen bereits angeborenen, gibt es auch eine Reihe verhaltensbedingter Risikofaktoren die zur Entwicklung eines Melanoms beitragen. Die wichtigste Rolle spielt dabei das ultraviolette Licht (UV-Licht), das 10 % des Sonnenlichts ausmacht. Die langwellige UVA-Strahlung dringt bis in die Dermis der Haut ein, während die kurzwellige UVB-Strahlung nur bis in die Basalzellschicht vordringt. Diese prozentual viel geringere Strahlung ist jedoch für die Mehrheit der Sonnenbrände verantwortlich. Lange Zeit ging man davon aus, dass eine hohe kumulative UV-Exposition der wichtigste Faktor bei der Entstehung eines malignen Melanoms sei. Dies ist für die Entwicklung eines Subtyps, das Lentigo-maligne Melanom, auch gesichert. Allerdings geht man heute davon aus, dass die Sonnenlichtdosis im Kindesalter und die Anzahl der Sonnenbrände in jungen Jahren mehr Einfluss auf die Inzidenz des schwarzen Hautkrebses hat.

So entwickeln Personen, die in ihrer Kindheit häufiger kurzzeitiger aber intensiver UVB-Strahlung ausgesetzt waren, im Erwachsenenalter häufiger superfiziell spreitende und noduläre Melanome (Sebastian und Stein, 2006; Hengge und Dummer, 2006).

1.2.2 Klassifikation

Man unterscheidet beim kutanen malignen Melanom klinisch und histopathologisch vor allem vier Subtypen, neben denen es eine Reihe seltenerer Formen wie das okuläre Melanom am Auge, das verruköse Melanom, das amelanotische Melanom und das Melanom der Schleimhäute gibt (Borden, 2002; Hengge und Dummer, 2006).

Die mit rund 65 % häufigste Form ist das **superfiziell spreitende Melanom** (SSM), das insbesondere bei der hellhäutigen Bevölkerung aus meist vorbestehenden melanozytären oder dysplastischen Nävi vor allem an Rücken und Beinen auftritt. Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 51 Jahre, so dass es der Untertyp mit dem niedrigsten Durchschnittsalter ist. Häufig findet sich eine ein bis fünf Jahre lange radiale Wachstumsphase, bevor die vertikale Wuchsphase eintritt. Das meist asymmetrische SSM zeichnet sich durch dunkelbraune, schwarze oder blau-graue Pigmentierung aus.

Das **noduläre Melanom** (NM) macht ungefähr 20 % der kutanen malignen Melanome aus. Es entsteht meist aus „normaler“ Haut, seltener auch aus vorbestehenden Nävi. Dieser meist am Stamm, Kopf und Hals auftretende Subtyp zeigt ein primär vertikales Wachstum und entwickelt sich meist innerhalb weniger Monate, wodurch die Frühdiagnose deutlich erschwert wird. Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 56 Jahre. Zu diesem Zeitpunkt sind die Tumoren jedoch oft schon ulzeriert. Im Gegensatz zum SSM ist das NM meist scharf begrenzt und uniform blau-schwarz.

Mit einem durchschnittlichen Diagnosealter von 68 Jahren ist das **Lentigo-maligna-Melanom** (LMM) das Melanom der älteren Patienten. Es macht rund 10 % aller malignen Melanome aus und entwickelt sich über mehrere Jahre hinweg aus einem *Melanoma in situ*, der sogenannten Lentigo maligna. Das meist braune, schwarze oder blau-graue Melanom entsteht fast ausschließlich im Gesichtsbereich älterer Menschen, vor allem an Nase und Wangen.

Das **akral-lentiginöse Melanom** (ALM) macht mit etwa 5 % in der hellhäutigen Bevölkerung den prozentual geringsten Subtyp aus, während es bei Schwarzen jedoch über

60 % und bei Asiaten rund 30 % aller Melanome ausmacht. Bei Diagnosestellung befinden sich die Patienten durchschnittlich im 63. Lebensjahr. Das ALM tritt vor allem palmoplantar und sub- oder periungual auf. In der Frühphase zeichnet es sich durch unscharfe Pigmentierungen aus, während es in der vertikalen Wuchsphase durch knotige Anteile imponiert (Borden, 2002; Hengge und Dummer, 2006).

1.2.3 Stadieneinteilung

Das maligne Melanom wird nach klinischen und pathologischen Kriterien anhand des seit 2002 gültigen AJCC-Schemas (*American Joint Committee on Cancer*) in vier Stadien eingeteilt. Diese Stadieneinteilung richtet sich nach dem bei Malignomen üblichen TNM-System (Fritsch, 2004; Hengge und Dummer, 2006).

Im Falle des malignen Malignoms steht **T** dabei für die Tumordicke des Primärtumors, wobei man vier Abstufungen (T1 bis T4) getroffen hat. In die T-Kategorie fließt außerdem die Tatsache mit ein, ob der Tumor bereits ulzeriert ist oder nicht, was durch ein kleines a (keine Ulzeration) bzw. ein kleines b (bereits bestehende Ulzeration) kenntlich gemacht wird. Für Melanome mit einer Dicke unter 1 mm wird die sogenannte Clark-Invasionstiefe als Kriterium herangezogen.

In der **N**-Klassifikation wird auf die Anzahl der befallenen lokoregionären Lymphknoten eingegangen. Während z.B. N0 bedeutet, dass noch keine Metastasen in den Lymphknoten zu finden sind, hat das Melanom im Stadium N3 bereits vier oder mehr Knoten befallen. Außerdem wird unterschieden ob es sich um Mikro- oder Makrometastasen handelt. Die mit einem „a“ versehenen Mikrometastasen werden nur bei der Sentinel-Lymphknotenbiopsie oder bei elektiver Lymphadenektomie gefunden, während die mit „b“ gekennzeichneten Makrometastasen bereits klinisch, radiologisch oder im Ultraschall zu sehen sind.

Das **M** der TNM-Klassifikation steht für das Auftreten von Fernmetastasen, wobei hierbei die Abstufungen je nach Lokalisation der Fernmetastasen getroffen werden. Zusätzlich zu dieser Bewertung der Metastasen findet sich in der M-Klassifikation die Höhe der Serum-Laktatdehydrogenase (LDH), da eine Erhöhung dieses Parameters mit einer Verschlechterung der Prognose einhergeht (Balch et al., 2004).

Anhand dieser TNM-Kriterien werden die Stadien 0 bis IV unterschieden. *Melanoma in situ* werden dem Stadium 0, während alle anderen T-Kategorien den Stadien I und II zugeordnet werden. Vereinfacht lässt sich sagen, dass sich alle Melanome mit einer Dicke bis 2,0 mm im Stadium I befinden und im Stadium II Melanome ab 2,0 mm. Sobald Lymphknotenmetastasen zu finden sind, werden die Patienten in Stadium III eingeordnet. Alle Patienten, bei denen Fernmetastasen auftreten, entsprechen automatisch Stadium IV (Fritsch, 2004; Hengge und Dummer, 2006).

1.2.4 Prognose

Anhand der Stadieneinteilung lassen sich Aussagen über die Prognose der Erkrankung treffen. So korreliert die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) direkt mit der Stadieneinteilung und beträgt bei einem *Melanoma in situ* 100 %, in Stadium I noch über 90 % und fällt auf 45 bis 80 % in Stadium II. Im Stadium III liegt sie zwischen 25 und 65 % und ab dem Auftreten von Fernmetastasen in Stadium IV beträgt die 5-JÜR nur noch 7 bis 20 % (Fritsch, 2004).

Die Prognose in den **Stadien I und II** ist überwiegend günstig, da weder Lymphknoten befallen noch Fernmetastasen vorhanden sind. Der wichtigste prognostische Faktor ist in diesen ersten beiden Stadien die Tumordicke nach Breslow (Breslow, 1970). Darunter versteht man die „Ausdehnung des Tumors von der Basis bis zum höchsten Punkt der über die Hautoberfläche hinausragenden Struktur“ (Hengge und Dummer, 2006). Dieser vertikale Tumordurchmesser stellt einen so guten Voraussagewert dar, da er direkt proportional zur Anzahl der Tumorzellen und damit auch proportional zum Risiko der Metastasierung ist (Bordon, 2002). Nur bei Tumoren mit einer Dicke unter 1 mm zieht man außerdem für prognostische Aussagen die Invasionsstufen nach Clark et al. (Clark et al., 1969) hinzu (Balch et al., 2004). Ein zweiter wichtiger prognostischer Faktor nach der Tumordicke ist das Vorhandensein von Ulzerationen. Diese sind definiert als das Durchbrechen der Epidermis und stellen damit ein größeres Risiko für die Entwicklung von Metastasen dar. Während diese beiden Prognosefaktoren im AJCC-Klassifizierungsschema berücksichtigt werden, stellt das Alter einen weiteren wichtigen Faktor dar, der jedoch in der Stadieneinteilung noch keine Rolle spielt. Dennoch ließ sich zeigen, dass das rezidivfreie Überleben kontinuierlich mit dem Alter abnimmt. Die

Lokalisation als weiterer wichtiger prognostischer Faktor spielt dahingegen in den AJCC-Kriterien eine Rolle. Nach Balch et al. haben Melanome des Kopfes, des Nackens oder des Stamms einen deutlich ungünstigeren Verlauf mit schlechteren Überlebensraten als Melanome, die an den Extremitäten lokalisiert sind (Balch et al., 2001). Noch keinen Eingang in das AJCC-Schema hat bisher das Geschlecht gefunden, obwohl sich zeigte, dass Frauen durchschnittlich eine bessere Prognose haben als Männer (Hengge und Dummer, 2006).

Da im **Stadium III** bereits Lymphknotenmetastasen vorhanden sind, spielt deren Anzahl hier auch die wichtigste prognostische Rolle. Während die 5-JÜR bei einem befallenen Lymphknoten 46 % beträgt, sind es bei vier oder mehr Knoten lediglich 24 %. In diesem Stadium ist das zweite wichtige prognostische Kriterium die Unterscheidung von Mikro- und Makrometastasen, wobei letztere signifikant schlechtere Überlebensraten haben. Weitere prognostische Faktoren sind Ulzeration und Lokalisation des Primärtumors sowie das Alter der Patienten bei Diagnosestellung (Hengge und Dummer, 2006).

Im **Stadium IV** treten bereits Fernmetastasen auf, was die durchschnittliche Überlebenszeit auf sechs bis acht Monate begrenzt. Hierbei stellt die Lokalisation der Metastasen das wichtigste prognosebeeinflussende Kriterium dar. Während bei nichtviszeralem Befall die 1-Jahresüberlebensrate 59 % beträgt, sinkt sie bei viszeraler Metastasierung auf 41 % ab. Wichtig dabei ist auch die Anzahl der betroffenen Organe. Weiterhin spielt eine Rolle, in welchem Allgemeinzustand sich der Patient befindet, sobald Fernmetastasen gefunden werden. Dies spiegelt sich im so genannten Karnovsky-Index wider. Ab einem Karnovsky-Index von unter 80 zeigte sich in Studien eine signifikant schlechtere Überlebensrate. Im Gegensatz zu den ersten drei Stadien wird in Stadium IV erstmals auch ein serologischer Parameter für die Prognosestellung berücksichtigt: wie bereits erwähnt, korreliert die Höhe der Serum-Laktatdehydrogenase mit einer reduzierten Überlebenszeit (Hengge und Dummer, 2006; Fritsch, 2004; Balch et al., 2004).

Zusätzlich zu diesen Kriterien gibt es auch noch eine Reihe von Tumormarkern des malignen Melanoms, die jedoch nur bedingt für prognostische Zwecke herangezogen werden können. Unter diesen sind vor allem Protein S100- β und MIA (*Melanoma Inhibitory Activity*) zu nennen.

S100-β ist ein Protein, das eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt, indem es unter anderem den Zellzyklus reguliert. Guo et al. beschrieben es 1995 erstmals als Serummarker des malignen Melanoms (Guo et al., 1995). Da die Höhe der Serumkonzentration gut mit der Tumormasse korreliert, ist es ein geeigneter Indikator der Tumormasse, Progression und des Therapieansprechens. Dadurch ist die Serumkonzentration mit dem Gesamtüberleben tumortragender Melanompatienten assoziiert. Allerdings gibt es keine Korrelation zwischen Protein S100-β und dem Gesamtüberleben bzw. dem rezidivfreien Überleben bei tumorfreien Patienten beispielsweise nach einer operativen Exzision von Lymphknotenmetastasen (Hengge und Dummer, 2006).

Ein weiterer wichtiger Tumormarker des malignen Melanoms ist das Protein **MIA**, das eine wichtige Rolle bei Zelladhäsion und Metastasierung spielt (siehe Kapitel 1.2.7). Es wird nur von Melanomzellen exprimiert und erste Untersuchungen ließen auf eine eindeutige Korrelation der Serumkonzentration mit dem Erkrankungsstadium schließen (Bossert et al., 1997). Spätere Untersuchungen ergaben jedoch, dass MIA gegenüber S100-β keinen Vorteil als prognostischer Marker bietet. Auch MIA ist nur aussagekräftig, wenn sich im Körper noch malignes Gewebe befindet und kann bei tumorfreien Patienten keine Aussage über die Prognose liefern (Stahlecker et al., 2000; Ugurel, 2005).

1.2.5 Pathogenese

Die Entwicklung eines malignen Melanoms geht von entarteten Melanozyten aus und lässt sich anhand genetischer und histopathologischer Merkmale nach dem Modell von Clark et al. in fünf Stufen gliedern (Clark et al., 1984). Als erste Stufe werden gewöhnliche, angeborene oder erworbene melanozytäre Nävi angesehen. Diese benignen Neoplasien entstehen durch Proliferation von Melanozyten und entarten sehr selten. Die zweite Stufe machen dysplastische oder atypische Nävi aus, die aufgrund ihrer strukturellen Veränderungen als Vorläuferläsionen und Risikofaktoren für die Melanomentwicklung gelten. Aufgrund des anormalen Wachstums der Melanozyten kommt es zu Ansammlungen von atypischen Zellen, die bereits ihre dendritischen Ausläufer verloren haben. Anschließend folgt als dritte Stufe die radiale Wachstumsphase (*radial growth phase*, RGP). Die Zellen breiten sich radiär in der Epidermis aus, können aber noch

nicht metastasieren und zeigen nur geringe lokale Invasivität und Proliferation. Ab der vierten Stufe, die durch vertikales Wachstum gekennzeichnet ist (*vertical growth phase*, VGP), durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran und infiltrieren die Dermis. Sie sind zu invasivem, metastasierendem Wachstum fähig. Die letzte Stufe der Tumorentwicklung ist das metastasierende Melanom, das sich über Blut- und Lymphwege im gesamten Körper ausbreiten kann.

Bei der Entwicklung zu einem metastasierenden malignen Melanom müssen allerdings nicht alle beschriebenen Progressionsstufen durchlaufen werden. Bei der direkten Melanomentstehung durch maligne Transformation von normalen Melanozyten können auch einzelne Stufen übersprungen werden (Clark et al., 1984; Rubin et al., 2008).

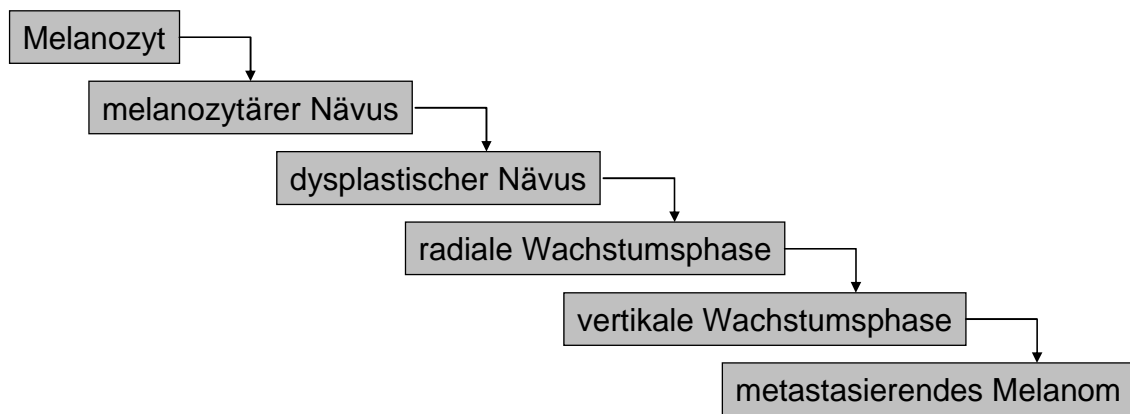


Abbildung 1: Modell der Melanomentwicklung, modifiziert nach Clark et al., 1984
Dargestellt ist die stufenweise Progression vom Melanozyten zum metastasierenden malignen Melanom.

1.2.6 Bereits bekannte Gene bei der Entstehung des malignen Melanoms

Obwohl die genaue molekulare Grundlage bei der Entstehung des malignen Melanoms trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig geklärt ist, konnten in den letzten Jahrzehnten dennoch einige Gene aufgezeigt werden, die hierbei eine Rolle spielen. Dabei ist es wichtig zwischen familiären und sporadisch auftretenden Melanomen zu unterscheiden.

Familiäre Melanome

Bei den familiären Melanomen wurde bereits Mitte des 19. Jahrhunderts eine genetische Komponente von William Norris postuliert (Norris, 1857; Fisher, 2009). Aufgrund neuer Forschungsmethoden Ende des letzten Jahrhunderts wurde der Genort 9q21 als Ausgangspunkt von melanomrelevanten Mutationen identifiziert. Dort finden sich die beiden Gene **CDKN2A** (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) und **CDKN2B**. **CDKN2A** kodiert für die beiden Tumorsuppressorproteine p16INK4a und p14ARF, die eine wichtige Rolle im Zellzyklus und bei der Regulation der Apoptose spielen. Der Verlust des p16INK4a-Proteins führt über Phosphorylierung des Rb-1-Proteins zum Übergang der Melanozyten in die S-Phase des Zellzyklus, während der Verlust des p14ARF-Proteins das p53-Protein destabilisiert (Demenais et al., 2010). Eine weitere wichtige Mutation bei familiären Melanomen ist die **CDK4**-Mutation (*Cyclin-dependent kinase 4*). Normalerweise wird die Passage durch den G1-Checkpoint im Zellzyklus durch CDK4 und CDK6 kontrolliert, die durch P16INK4a selektiv inhibiert werden. Bei Mutationen des CDK4-Gens wird die p16-Bindedomäne des Proteins CDK4 beeinflusst. Dadurch fällt der inhibierende Einfluss des p16-Proteins weg und die Regulation des Zellzyklus durch CDK4 wird verhindert (Bloethner et al., 2009; Meyle, 2009). Auch ein Polymorphismus des Melanocortin-1-Rezeptors **MC1R** führt zu einem erhöhten Melanomrisiko. Dieses Protein gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Über Aktivierung eines G-Proteins und die daraufhin folgende intrazelluläre Erhöhung von zyklischem AMP (cAMP) kommt es zur gesteigerten Produktion von Eumelanin, das als Schutz vor exogener UV-Strahlung dient. Keimbahnmutationen dieses Rezeptors findet man in 80 % der rothaarigen Individuen mit heller Haut (Demenais et al., 2010).

Sporadisch auftretende Melanome

Bei den sporadisch auftretenden Melanomen wurden vor allem fünf Mutationen gefunden, die über die Beeinflussung verschiedener Signalwege Tumorsuppressorgene inaktivieren oder Onkogene aktivieren (Fisher, 2009).

Als erstes Gen ist hier **NRAS** zu nennen, das in 15-30 % der sporadischen Melanome mutiert ist. Das Gen kodiert für ein GTP-bindendes kleines Protein der sogenannten RAS-Familie, die an der Spitze des RAS/RAF/MEK/ERK/MAP-Kinase-Signalwegs stehen. Dieser Weg aktiviert auf Signale von Wachstumsfaktoren und Zytokinen hin wachstumsstimulierende Gene und ist in mehr als 90 % der Melanome hyperaktiviert. Ebenfalls in diesen Signalweg integriert ist die Serin-Threonin-Kinase **BRAF**, die über mehrere Schritte Zellwachstum und Proliferation induziert. Hierbei ist eine UV-assoziierte Transversion von Thymin zu Arginin ursächlich für die Mutation, die in 50-70 % aller Melanome auftritt. Da diese auch in benignen melanozytären Nävi zu finden ist, geht man davon aus, dass sie in einer frühen Phase der Melanomprogression auftreten. Häufig findet sich eine Koinzidenz mit einer weiteren Mutation, der Amplifikation von **MITF** (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*). Diese tritt bei 10-20 % der Melanome vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien auf. MITF sorgt in der unveränderten Haut für die Melanozytendifferenzierung und -entwicklung und kann durch Amplifizierung als Onkogen bei der Progression des humanen malignen Melanoms wirken (Levy et al., 2006; Fisher, 2009). Wichtig für Invasion und Metastasierung bei bereits bestehenden Malignomen ist eine Mutation auf Chromosom 6p. Eine Amplifikation des dort befindlichen **NEDD9**-Gens (*Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9*) korreliert sowohl bei normalen als auch bei schon transformierten Melanozyten mit dem Potential Tochterzellen zu entsenden und Metastasen zu formieren. Diese Amplifikation und folglich Überexpression von NEDD9 findet man in 36 % der Melanommetastasen (Kim et al., 2006; Fisher, 2009). Als weitere Melanom-relevante Mutation ist hier die Amplifikation des **KIT**-Gens auf Chromosom 4q12 zu nennen. Wie MITF ist auch KIT ein essentielles Gen für Überleben und Entwicklung von Melanozyten. Es kodiert für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase und agiert als Aktivator des MAP-Kinase-Signalwegs, der wie oben erwähnt auch bei NRAS- und BRAF-Mutationen hochreguliert ist. Eine KIT-Mutation findet man in 2-5 % aller Melanome, wobei sie besonders häufig in akralen, mukosalen und chronisch sonneninduzierten Melanomen auftritt (Woodman und Davies, 2010; Fisher, 2009).

1.2.7 Molekulare Grundlagen bei der Entstehung des malignen Melanoms

Melanome entstehen durch maligne Entartung von Melanozyten. Durch Mutationen in der DNA kommt es zu Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen oder zu Aktivierung von Onkogenen, was zu einer Störung des Gleichgewichtes aus Differenzierung, Proliferation und Apoptose führt (Shih und Herlyn, 1993).

Aufgrund von Genmutationen können sich die Melanozyten ihrer Kontrolle durch die Keratinozyten entziehen und ungehindert proliferieren. Diese Autonomie und Proliferation wird durch die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Apoptose-signalen möglich. Außerdem sind veränderte Signalwege und mutierte Transkriptionsfaktoren für das ungehemmte Wachstum verantwortlich.

Die Fähigkeit zur Metastasierung erhalten die Tumorzellen durch ein verändertes Motilitäts- und Adhäsionsverhalten, das sie zum Auswandern aus der Epidermis und zum Durchdringen der Basalmembran befähigt. Im Folgenden soll nun kurz auf verschiedene molekulare Grundlagen bei der Entstehung des malignen Melanoms eingegangen werden.

Wachstumsfaktoren und Zytokine

Melanomzellen exprimieren je nach Stadium verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine und deren jeweilige Rezeptoren. Hierbei gibt es sowohl autokrine als auch parakrine Effekte. Autokrine Wachstumsfaktoren wie z.B. bFGF, PDGF-A und IL-8 werden von den Melanomzellen produziert und stimulieren die Proliferation der Melanozyten selbst, während parakrine Faktoren wie TGF- β (*Transforming Growth Factor*) und VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) die Mikroumgebung der entarteten Zellen so modifizieren, dass Angiogenese und Stromabildung möglich sind, proteolytische Enzyme aktiviert werden und sich das Adhäsionsverhalten ändert (Shih und Herlyn, 1994). Zudem gibt es einige Wachstumsfaktoren, die auf Melanozyten oder Melanomzellen in frühen Tumorstadien inhibitorische Effekte haben, was sich im Zuge der Tumorprogression ändert, bis sie schließlich zum Teil zu autokrinen Stimulatoren werden (Lázár-Molnár et al., 2000).

Das ungebremste Wachstum kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: (1) Die entartete Zelle produziert selbst exzessiv autokrine Wachstumsfaktoren. (2) Sie entwickelt eine

Resistenz gegenüber den physiologisch vorhandenen inhibitorischen Faktoren. (3) Es kommt zu einer Überexpression der für die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren notwendigen Rezeptoren. (4) Die Wachstumskontrolle wird auf der Stufe der *Second Messenger* (Botenstoffe) dereguliert (Rodeck, 1993).

Der wohl am besten untersuchte Wachstumsfaktor ist hierbei bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), der von den bereits entarteten Melanomzellen, nicht aber von normalen Melanozyten exprimiert wird. Er ist unter anderem für Angiogenese und mitogene Effekte verantwortlich (Halaban et al., 1988). Ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, aber auch bei der Stromabildung und der autokrinen Stimulation der Zellen spielen PDGF- α und - β (*Platelet-Derived Growth Factor*). Auch TGF- α (*Transforming Growth Factor*) wird von normalen Melanozyten erst nach Stimulation durch UV-Strahlung exprimiert und findet sich vor allem in den späteren Stadien, wo er für die Zellproliferation zuständig ist, wohingegen TGF- β physiologischerweise eine negative Kontrolle auf normale Melanozyten hat, die dann aber, wenn sie entartet sind, in späteren Stadien resistent gegenüber diesem antiproliferativen Effekt sind. Auch verschiedene Interleukine können als Wachstumsfaktoren in die Tumorprogression des malignen Melanoms eingreifen. So führen IL-8 und IL-10 zu einer herabgesetzten Immunantwort. IL-6 hemmt bei Melanozyten und frühen entarteten Tumorzellen noch die Proliferation, wird im Laufe der Progression dann allerdings auch zu einem autokrinen Stimulator (Lázár-Molnár et al., 2000). MGSA (*Melanoma Growth Stimulatory Activity*) wird wie bFGF, TGF- α und PDGF- α nicht von Melanozyten produziert. Die Expression erfolgt zusammen mit der Expression der Rezeptoren durch Melanomzellen, was zu einer permanenten Stimulation der Zellproliferation führt (Krasagakis et al., 1993).

Transkriptionsfaktoren

Eine große Rolle bei der Regulation der Genexpression spielt die Initiation der Transkription. Diese ist von der Bindung aktivierender oder reprimierender Transkriptionsfaktoren am Beginn der Gentranskription abhängig (Hengge und Dummer, 2006). Daher können Änderungen in der Aktivität oder Expression von Transkriptionsfaktoren viele Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Angiogenese oder Apoptose beein-

flussen. Hier sollen exemplarisch ein paar Transkriptionsfaktoren erwähnt werden, die bei der Progression des malignen Melanoms von Bedeutung sind.

Eine sehr wichtige Rolle spielt hierbei **NFκB** (*nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells*). Dieser homo- oder heterodimere Komplex besteht aus Proteinen der sogenannten Rel-Familie und wird durch Stimuli wie Bakterien, Viren, inflammatorischen Zytokinen oder oxidativen und physikalischen Stress aktiviert (Baeuerle und Henkel, 1994). Normalerweise ist NFκB an IκB gebunden und dadurch inaktiviert. Wird nun IκB über aktivierte Proteinkinasen phosphoryliert, ubiquitiniert und schließlich proteasomal abgebaut, wird NFκB dadurch frei und kann nach Phosphorylierung in den Zellkern translozieren, wo es durch Bindung an Zielgene diese aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass NFκB im malignen Melanom konstitutiv aktiviert ist, so dass die Expression einiger Gene, die Apoptose, Proliferation, Angiogenese und Metastasierung beeinflussen, induziert wird (Amiri und Richmond, 2005).

Weitere Transkriptionsfaktoren sind die Proteine der *High mobility group* (HMG), die die sogenannte HMG-Box als DNA-Bindedomäne besitzen, über die sie sowohl einzeln als auch doppelsträngige DNA binden können (Baxevanis und Landsman, 1995). Vor allem **HMGB1** ist an der Regulation von MIA (*Melanoma Inhibitory Activity*, siehe unten) beteiligt. Die Expression von HMGB1 ist im malignen Melanom hochreguliert. Durch Binden an die MIA-Promotorregion kann es dessen Expression induzieren und so die Invasionsbereitschaft der malignen Zellen fördern (Poser und Bosserhoff, 2004).

Ebenfalls an der Regulation von MIA beteiligt ist **CtBP1** (*C-terminal binding protein 1*), das ubiquitär exprimiert wird. Ursprünglich wurde das Protein als zelluläres Protein entdeckt, das mit dem C-terminalen Ende von Adenovirus E1A-Proteinen interagiert (Chinnadurai, 2007). Es konnte nun gezeigt werden, dass CtBP1 die Expression von MIA hemmt. Im malignen Melanom wird CtBP1 nicht mehr exprimiert, was zu einer folglich aktivierten Expression von MIA führt (Poser et al., 2002).

Zelladhäsion: Integrine, Cadherine, MIA

Zelladhäsionsmoleküle sind integrale Membranproteine, die mit ihren extrazellulären Domänen mit anderen Proteinen interagieren können. Im Wesentlichen haben sie zwei Aufgaben: den Zusammenhalt von Geweben und die Kommunikation von Zellen untereinander. Dabei kann man Adhäsionsmoleküle, die Kontakte zwischen benachbarten

Zellen herstellen, von solchen unterscheiden, die für die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix (ECM) verantwortlich sind. Bei Fehlregulationen oder dem Verlust dieser Moleküle geht der Zusammenhalt der Gewebe verloren und die Zellen können sich aus dem Gewebeverband lösen, was die Entstehung des malignen Melanoms fördert.

Integrine sind Zelloberflächenproteine, die für den Kontakt zwischen dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett und der extrazellulären Matrix sorgen. In Säugetieren kommen mindestens 25 verschiedene Integrin-Rezeptoren vor, die sich jeweils aus einer von 18 α - und einer von acht β -Untereinheiten zusammensetzen (Humphries, 2000; Kuphal et al., 2005). Beide Untereinheiten bestehen aus einer langen extrazellulären Domäne, einer kurzen Transmembrandomäne und einer in der Länge variablen zytoplasmatischen Domäne, wobei die beiden extrazellulären Domänen zusammen Liganden binden können (Gille und Swerlick, 1996). Neben dieser Funktion der Adhäsion an Matrixproteine oder andere Zellen kommt den Integrinrezeptoren auch noch die Aufgabe der Vermittlung von Signalen für die Kommunikation der Zellen untereinander zu. Sie können Signale, die von Wachstumsfaktoren ausgehen, imitieren und so Signaltransduktionswege aktivieren, die unter anderem zu Zellwachstum und -proliferation beitragen (Gille und Swerlick, 1996). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich das Expressionsmuster der Integrine während der malignen Transformation ändert. Dabei geht eine erhöhte Expression der Integrine mit einem metastatischen Phänotyp einher (Marshall et al., 1998).

Cadherine sind ebenso wie Integrine transmembrane Glykoproteine. Sie sind über zytoplasmatische Proteine, die sogenannten Catenine, mit dem Zytoskelett verbunden. Neben der Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen Cadherine weitere zelluläre Funktionen wie Migration, Invasion und Zelldifferenzierung und sie induzieren spezifische molekulare Antworten wie Änderungen in der Organisation des Zytoskeletts (Behrens, 1999). Ein wichtiger Vertreter aus der Familie der Cadherine in der Tumorigenese ist das E-Cadherin, das vor allem von Melanozyten und Keratinozyten exprimiert wird (Li et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül häufig in entarteten Epithelzellen durch transkriptionelle Downregulation oder Genmutation verringert exprimiert ist. Da es in normaler Haut die Zellkontakte zwischen Keratinozyten und Melanozyten vermit-

telt, führt die fehlende oder verringerte Expression in entarteten Zellen dazu, dass die Kontrolle der Keratinozyten über die Melanozyten verloren geht und diese ungehindert wachsen und proliferieren können (Silye et al., 1998). Versuche mit Antikörpern, die die Funktion des E-Cadherins störten, führten zu einer erhöhten Invasionsbereitschaft der Zellen, während umgekehrt eine forcierte erhöhte Expression die Invasion inhibierte. Lange ging man davon aus, dass der Verlust oder die Downregulation des E-Cadherins in eher späteren Tumorstadien auftritt. Allerdings konnte diese Mutation nun auch in früheren Stadien nachgewiesen werden, so dass man mittlerweile davon ausgeht, dass der Verlust des E-Cadherins das neoplastische Wachstum der mutierten Zellen induziert (Behrens, 1999).

Gleichzeitig mit dem Verlust der Funktion von E-Cadherin kommt es zu einer verstärkten Expression von N-Cadherin während der Melanomentwicklung. Dieses normalerweise von Fibroblasten und Endothelzellen exprimierte Adhäsionsmolekül wird während der Tumorprogression von entarteten Melanozyten in hoher Zahl exprimiert und ermöglicht diesen dadurch direkt mit anderen N-Cadherin-exprimierenden Zellen zu interagieren. Der Wechsel des Subtyps in der Cadherin-Familie von E- zu N-Cadherinen entzieht die Melanozyten nicht nur ihrer Kontrolle durch die Keratinozyten, sondern sorgt auch für Wachstum und ermöglicht die Metastasierung von Melanomzellen (Li et al., 2001).

Auch eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion spielt das Protein **MIA** (*Melanoma Inhibitory Activity*). Es wird von malignen Melanomzellen sezerniert, während es in Melanozyten oder in normaler Haut nicht vorkommt (Bosserhoff et al., 1996; von Groningen et al., 1995). Anfangs verfolgte man die These, dass MIA ein Tumorsuppressorgen sei, da es das Wachstum von Melanomzellen *in vitro* inhibierte. Spätere Analysen belegten allerdings, dass es durch Inhibition des Anheftens von Melanomzellen an Fibronectin und Laminin sogar Invasion und Metastasierung der malignen Zellen fördert, indem es den Melanomzellen ermöglicht, sich von der extrazellulären Matrix zu lösen. Aufgrund dieser Regulation der Zell-Matrix-Bindung lässt sich MIA als ein Schlüsselmolekül der Regulation der Tumorprogression bezeichnen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von MIA mit der Tumorprogression des Melanoms korreliert (Bosserhoff, 2005).

1.3 Beschreibung der Internetseite des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) und der Microarrays

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Datenbank-gestützten Analyse von melanomrelevanten Genen. Hierzu wurde auf die Internet-Datenbank GEO Profiles des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) zurückgegriffen.

Das NCBI wurde 1988 als Unterorganisation der US-amerikanischen *National Library of Medicine* (NLM) gegründet. Die NLM ist Teil des *National Institute of Health* (NIH), einem nationalen Gesundheitsinstitut der Vereinigten Staaten, das dem *US-Department of Health and Human Services* angehört und seinen Sitz in Bethesda, Maryland, hat. Das NIH ist in den USA die wichtigste Behörde für biomedizinische Forschung. Es unterhält 27 Institute, darunter die weltweit größte medizinische Bibliothek NLM. Diese wurde bereits 1836 gegründet und spielt mit ihren rund zwölf Millionen Büchern, Zeitschriften, Manuskripten und weiteren Formen medizinischer Information eine Schlüsselrolle bei der Verbreitung von biomedizinischen Informationen. Um biologisch-medizinische und molekularbiologische Informationen für private und Forschungszwecke einer breiten Öffentlichkeit zugänglich zu machen, wurde das NCBI gegründet, das zur weltweit bedeutendsten Anlaufstelle für molekularbiologische Daten avanciert ist. Es unterhält unter anderem wichtige DNA-, RNA- und Proteindatenbanken, die PubMed-Literaturdatenbank mit über 18 Millionen Veröffentlichungen und die GenBank-Sequenzdatenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.nlm.nih.gov, www.nih.gov).

Eine dieser Datenbanken ist die GEO Profiles Datenbank (*Gene Expression Omnibus*), die seit 2000 ein öffentliches Repositorium unzähliger Daten ist, die unter anderem anhand von Microarray-basierten Experimenten gewonnen wurden. Sie enthält aber auch Daten aus Chromatin-Immunopräzipitations-Experimenten (ChIP-chips) und weiteren Hochdurchsatz-Experimenten. Im Jahr 2004 gab es weit mehr als 30.000 Einreichungen für mehr als 100 Organismen von rund 600 Forschungsteams. Die Daten werden analysiert und geprüft und in den meisten Fällen in Fachzeitschriften veröffentlicht (Barrett et al., 2005; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Die GEO Profiles Datenbank enthält wie viele andere Datenbanken auch unzählige Informationen über Gene, die häufig anhand von Microarrays gewonnen wurden.

Microarrays, auch „Biochips“ genannt, gibt es seit Mitte der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts. Mittlerweile gibt es zahlreiche Anwendungen der Arrays, die sich unter anderem nach der Art der Probe z.B. in DNA-, Protein- und Gewebe-Arrays gliedern lassen. Eine dieser Anwendungen ist die Analyse der Genexpression in unterschiedlichen Geweben oder von Genmutationen in bereits entartetem Gewebe mittels DNA-Arrays. Ein großer technischer Vorteil dieser Arrays ist das hohe Durchsatzverfahren, mit dem man die RNA-Expression ganzer Genome auf einem Chip untersuchen kann (Müller und Röder, 2004; www.bio.davidson.edu). Es gibt hierbei zwei Arten von DNA-Arrays: Bei den sogenannten „*spotted microarrays*“ werden cDNA, Oligonukleotide oder Fragmente aus PCR-Produkten, die der mRNA entsprechen, auf das Trägermaterial gedruckt, während die „*oligonucleotide microarrays*“ auf synthetisch hergestellten Oligonukleotiden beruhen, die an definierte Positionen des Rasters z.B. auf einem Glasträger aufgebracht werden.

Für beide Arten der DNA-Arrays wird zunächst die mRNA aus dem zu untersuchenden Gewebe extrahiert und eventuell nötigen Aufreinigungs- oder Amplifikationsschritten unterzogen. Anschließend wird die mRNA in cDNA umgeschrieben, welche anschließend mit einem Farbstoff gekoppelt auf den Mikrochip aufgetragen wird. Daraufhin folgt die Hybridisierung der komplementären Stränge: Die markierte einzelsträngige cDNA kann an die passende komplementäre DNA binden, die sich an verschiedenen Punkten des Mikrochips befindet. Diese spezifische Bindung kommt durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementär zueinander passenden Basenpaaren zustande. Nun wird die cDNA, die nicht an DNA binden konnte, abgewaschen und die gebundene cDNA mithilfe des gekoppelten Farbstoffs sichtbar gemacht. Diese Detektion kann unter anderem je nach gekoppeltem Farbstoff durch Autoradiographie, Chemilumineszenz oder Fluoreszenz erfolgen. Bei sehr aktiven Genen wird eine hohe Anzahl an mRNA-Molekülen produziert, so dass auch viel cDNA binden kann und das detektierte Signal sehr stark ausfällt, während umgekehrt bei wenig oder gar nicht exprimierten Genen die mRNA-Menge und damit die gebundene cDNA-Menge gering oder nicht vorhanden ist und sich folglich ein schwaches oder gar kein Signal detektieren lässt. Auf diese Weise lassen sich anhand der DNA-Microarrays Rückschlüsse auf die Expressionsstärke der untersuchten Gene ziehen (Hofmann, 2006; Nuber, 2005).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Studien der Datenbank GEO Profiles des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

Im Internet finden sich unzählige Datenbanken zu vielen Bereichen der Molekularbiologie. Diese Arbeit beschäftigte sich unter anderem mit der Frage, ob man dort zu findende Daten über die Expressionsstärken verschiedener Gene im malignen Melanom miteinander verknüpfen kann, um so Rückschlüsse auf eine mögliche Korrelation bestimmter Gene mit der Entstehung oder Progression des Melanoms ziehen zu können.

Hierzu wurden sieben Studien der Datenbank GEO Profiles des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) auf dessen Homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> analysiert.

GDS 1375 – *Cutaneous malignant melanoma* (kutanes malignes Melanom)

Diese Studie zeigt das mRNA-Expressionsprofil von primär malignen Melanomen, gutartigen Nävi und normaler Haut. Jedes Experiment zeigt 70 Proben, wobei jeweils sieben Proben auf normale Haut, 18 auf benigne Nävi und 45 auf das maligne Melanom entfallen. Die zu untersuchende RNA wurde aus der Haut bei Menschen (*Homo sapiens*) gemäß des Standard Trizol Protokolls oder des Qiagen RNEasy Mini Kit Protokolls isoliert und die Genexpressionen anhand von Affymetrix Human Genome U133A Arrays gewonnen. Die Ergebnisse wurden im Jahr 2005 von Talantov et al. veröffentlicht (Talanov et al., 2005). Sie identifizieren potentielle molekulare Marker für das Lymphknoten-Staging und lassen Rückschlüsse auf die Melanom-Tumorigenese zu.

GDS1505 – *Cultured skin substitute* (kultivierte Haut)

Die Studie GDS1505 beschreibt die Expressionsstärke von Genen in jeweils vier Proben normaler Haut, kultivierten Keratinozyten, kultivierten Fibroblasten und dem sogenannten „*cultured skin substitute*“, also kultivierter Haut, die Fibroblasten und Keratinozyten enthält. Anhand der Expressionshöhe der Gene in den einzelnen Proben lassen sich Unterschiede der Genexpression zwischen kultivierter und nativer, unbehandelter Haut

feststellen. Die Ergebnisse, die mittels des Affymetrix Human Genome U133A Arrays gewonnen wurden, wurden 2005 von Smiley et al. veröffentlicht (Smiley et al., 2005).

GDS2081 - *Jun kinase inhibition effect on keratinocytes: time course* (Inhibierender Effekt der Jun-Kinase auf Keratinozyten im zeitlichen Verlauf)

Diese Studie zeigt in acht Proben den Einfluss eines Jun-Kinase-Inhibitors auf Keratinozyten. Während die ersten vier Proben die Expressionsstärke bei unbehandelten Keratinozyten nach einer, vier, 24 und 48 Stunden zeigen, wurde bei den anderen vier Proben der Jun-Kinase-Inhibitor SP600125 eingesetzt und zu den gleichen Zeitpunkten die Genexpression gemessen. SP600125 ist ein spezifischer reversibler ATP-kompetitiver Inhibitor für die drei Isoformen der Jun-Kinase. Die differentielle Expression der Proben zeigt Gene in epidermalen Keratinozyten, die durch die Jun-Kinase reguliert werden. Veröffentlicht wurden die Ergebnisse der Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Arrays im Jahr 2006 von Gazel et al. (Gazel et al., 2006).

GDS1989 - *Melanoma progression* (Melanomprogression)

Bei GDS1989 wird die unterschiedliche Expression der Gene in 18 Gewebeproben dargestellt. Es findet sich dabei je eine Probe aus der Kultur von epidermalen Melanozyten, epidermalen Keratinozyten und eine Probe des metastasierenden Melanoms. Weitere 15 Proben zeigen die Expressionsprofile in Biopsien der verschiedenen Progressionsstufen der Melanomentwicklung. Bei diesen Biopsien wurden jeweils zwei Proben aus normaler Haut, benignen Nävi, atypischen Nävi, *Melanoma in situ*, *Vertical Growth Phase (VGP) Melanoma*, *Metastatic Growth Phase (MGP) Melanoma* und drei Proben aus Lymphknotenmetastasen genommen. Die Ergebnisse, die 2005 von Smith et al. veröffentlicht wurden, lassen Rückschlüsse auf die unterschiedliche Expression des Gens zwischen benignen und atypischen Nävi und zwischen *Melanoma in situ* und vertikal oder metastasierend wachsenden Melanomen zu (Smith et al., 2005). Sie wurden anhand des Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays gewonnen.

GDS1965 - *Melanocyte to melanoma transformation* (Transformation der Melanozyten zum Melanom)

Die Studie GDS1965 zeigt die Expressionsprofile der Gene in normalen Melanozyten, primären Melanomzellen und metastasierenden Melanomzellen, wobei es jeweils zwei Proben zu den normalen Melanozyten und je sechs Proben zu den bereits entarteten Zellen gibt. Bei den Proben der Melanomzellen stammt jeweils eine Probe aus dem Primärtumor, die anderen fünf Proben sind aus metastatischem Gewebe gewonnen. Die mRNA dieser Proben wurde, nach Umschreibung in cDNA, mittels Affymetrix Human Genome U133A Array analysiert. Die Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf Veränderungen im fortgeschrittenen Melanom im Vergleich zu normalen Melanozyten zu und eröffnen mögliche neue Ansätze zur Einschätzung von Prognose, Staging und Therapieoptionen bei Patienten mit malignem Melanom. Die Ergebnisse der einzelnen Arrays wurden 2004 von Hoek et al. veröffentlicht (Hoek et al., 2004).

GDS1314 - *Malignant melanoma cell lines* (Zelllinien des malignen Melanoms)

Die Studie GDS1314 zeigt die Expressionsstärken in fünf verschiedenen Melanomzelllinien: Mel Juso, A374, 607B, 518A2 und Skmel 28. Die anhand von Affymetrix Human Genome U133A Arrays gewonnenen und 2005 von Okamoto et al. veröffentlichten Ergebnisse korrelieren mit Regionen chromosomaler „*Breakpoints*“ und weisen auf eine Assoziation zwischen diesen Regionen und veränderter Genexpression hin (Okamoto et al., 2005).

GDS1761 - *NCI60 cancer cell lines* (NCI60 Krebszelllinien)

Die Studie GDS1761 zeigt die mRNA-Expressionprofile von 64 Proben aus den sogenannten NCI60 (*US National Cancer Institute*). Dies sind 60 Zelllinien aus Tumoren verschiedenster Gewebe und Organe (Shoemaker, 2006). Diese Zelllinien werden häufig als experimentelle Modelle für neoplastische Erkrankungen herangezogen. Von diesen Zelllinien wurden in der Studie neun Proben aus Brustkrebs, sechs Proben eines ZNS-Tumors, sieben Proben eines Kolontumors, acht Proben Knochenmark von Leukämiepatienten, acht Proben aus Melanomzelllinien, neun Proben des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC), sechs Proben aus Gewebe eines Ovarialtumors, zwei Proben eines Prostata Tumors, acht Proben eines renalen Tumors und eine

unbekannte Probe mittels NCI cDNA Arrays untersucht. Die Ergebnisse zeigen Variationen in der Genexpression der Zelllinien und deren Beziehungen zu *in-vivo*-Tumoren. Sie wurden im Jahr 2000 von Ross et al. veröffentlicht (Ross et al., 2000).

2.1.2 Säugerzelllinien

Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Juso	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Sk Mel 28	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Sk Mel 3	Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase eines Melanoms
HTZ 19d	Humane Melanomzelllinie aus Hirnmetastase eines Melanoms
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
NHEM	Normale humane epidermale Melanozyten

2.1.3 Gewebeproben

TB Nr. 2	Primärtumor
TB Nr. 3	Primärtumor
TB Nr. 62	Primärtumor
TB Nr. 70	Primärtumor
TB Nr. 16	Primärtumor
TB Nr. 78	Primärtumor
TB Nr. 4	Metastase (Lymphknoten)
TB Nr. 35	Metastase (Haut)
TB Nr. 5	Metastase (Lymphknoten)
TB Nr. 80	Metastase (Haut)
TB Nr. 31	Metastase (Lunge)
TB Nr. 30	normale Haut
TB Nr. 33	normale Haut

2.1.4 Humane Oligonukleotide

Das Primerpaar für den β -Aktin Nachweis wurde von der Firma MWG Biotech, Martinsried, synthetisiert. Alle anderen Primer wurden von Sigma Aldrich, München, hergestellt. Die Oligonukleotide wurden mit Wasser auf eine Stammlösung von 100 μ M verdünnt.

KCNN2 for 1431	5' - CCGCATGGACTGTCCGAGCTT – 3'
KCNN2 rev 1618	5' - GGCTGTGCAACCAGCACCCATA – 3'
PLXNA1 for 3203	5' - AGGGAGAACGGCTGCCTGGT – 3'
PLXNA1 rev 3345	5' - AGCAGGGAGCGCACGTTGTC – 3'
SHFM1 for 112	5' - GGGCGCGGACAGTCGAGATG – 3'
SHFM1 rev215	5' - GCCAGCCCAGTCTTCGGCAG – 3'
β -Aktin for	5' - CTACGTGGCCCTGGACTTCGAGC – 3'
β -Aktin rev	5' - GATGGAGCCGCCGATCCACACGG - 3'

2.1.5 Allgemeine Materialien

BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA	SeaKem® LE Agarose
Braun, Frankfurt am Main	Aqua ad injectabilia
Genaxxon, Stafflangen	dNTPs
GraphPad Software Inc., San Diego, USA	GraphPad Prism 4.03 Software
Invitrogen, Carlsbad, USA	100 bp DNA Ladder, Superscript II, 5x First Strand Buffer
Qiagen, Hilden	RNeasy® Mini Kit
Roche Diagnostics, Mannheim	RNAse A, LightCycler® Capillaries, LightCycler DNA Master SYBR green I, dN6 Primer, PCR reaction buffer
Sigma, St. Louis, USA	Ethidiumbromid, Bromphenolblau, DTTs
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Oligonukleotide
Takara Bio Inc., Shiga, Japan	SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)

2.1.6 Geräte

Gelelektrophoreseapparaturen

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

Heiz- und Kühlblöcke

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

Spannungsgeräte

BioRad, München	PowerPac Basic, Model 200/2.0 Power Supply
-----------------	--

Zentrifugen

Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5415D
Qualitron, Korea	Tischzentrifuge
Roche Diagnostics, Mannheim	LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte

H. Saur, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 200K, 254nm
Heidolph, Kehlheim	Vortexer REAX 2000
MWG Biotech, Ebersberg	Geldokumentationssystem 2001i
Peglap Biotechnologie GmbH, Erlangen	Nanodrop® ND-1000-UV/Vis Spektral-Photometer
Roche Diagnostics, Mannheim	LightCycler® II

2.1.7 Lösungen

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1,5 % (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 % (w/v) in H ₂ O bidest

PANTM Biotech GmbH, Aidenbach	PBS (Phosphate buffered saline)
Qiagen, Hilden	RNA-Lysepuffer
Qiagen, Hilden	RW1-Waschpuffer
Qiagen, Hilden	RPE-Waschpuffer

2.1.8 GraphPad Prism Programm

Für die statistische Auswertung wurde das GraphPad Prism Programm Version 6.0 verwendet (www.graphpad.com). Die seit 1984 bestehende Software bietet für die statistische Auswertung unter anderem den t-Test, nicht-parametrische Vergleiche und ANOVA-Tests an. Für die vorliegende Arbeit wurden die Daten aus zwei zu vergleichenden Proben mithilfe des Mann-Whitney-Tests und bei mehreren zu vergleichenden Proben anhand des Kruskal-Wallis-Tests analysiert (www.graphpad.com; Bortz et al., 2008).

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Isolation aus Säugerzellen

Für die RNA-Isolation wurde das RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen verwendet.

Zunächst wurde das Kulturmedium von konfluent wachsenden Zellen abgenommen und die Kultur einmal mit PBS gespült. Anschließend wurden mit einem Zellschaber die Zellen mit 1 ml PBS von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgeschoben. Nachdem die Zellen bei 3.000 U/min 5 Minuten lang abzentrifugiert wurden, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 350 µl RNA-Lysepuffer resuspendiert und lysiert.

Dieses Lysat wurde mit 350 µl Ethanol (70 %) durch kurzes Vortexen vermischt und die Probe anschließend auf das RNeasy spin column gegeben, bei 10.000 UpM für 15 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Genauso wurde zunächst mit 700 µl Waschpuffer RW1 und anschließend mit 500 µl Waschpuffer RPE verfahren.

Nachdem erneut 500 µl Waschpuffer RPE auf das RNeasy spin column gegeben wurden, wurde eine zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 U/min durchgeführt. Indem 30

μl RNase-freies Wasser 1 Minute lang bei 10.000 U/min durch das RNeasy spin column zentrifugiert wurden, konnte die RNA schließlich eluiert werden. Das RNA-Eluat wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren.

2.2.2 Vermessen der RNA

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

$$1 \text{ OD } 260 \text{ nm Einheit} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

2.2.3 Reverse Transkription

Um die RNA in cDNA umzuschreiben, wurden nach dem Vermessen der RNA nach folgendem Schema die entsprechenden Mengen RNA mit Wasser gemischt:

	RNA/ μl	H ₂ O/ μl
NHEM P6	3	8
NHEM P7	4	7
NHEM P9	4	7
Mel Ei	3	8
Mel Wie	1	10
Mel Juso	3	8
Mel Ho	2,5	8,5
Sk Mel 28	0,5	10,5
Sk Mel 3	0,5	10,5
HTZ 19	5	6
Mel Im	0,5	10,5

Mel Ju	1	10
Primärtumor TB Nr. 2	1,5	9,5
Primärtumor TB Nr. 3	9	2
Primärtumor TB Nr. 62	1	10
Primärtumor TB Nr. 70	3	8
Primärtumor TB Nr. 16	10	1
Primärtumor TB Nr. 78	10	1
Metastase TB Nr. 4	1	10
Metastase TB Nr. 35	1,5	9,5
Metastase TB Nr. 5	10	1
Metastase TB Nr. 80	0,5	10,5
Metastase TB Nr. 31	1	10
normale Haut TB Nr. 30	4	7
normale Haut TB Nr. 33	10	1

Zu diesen 11 μl wurden jeweils 4 μl First-Strand-Puffer (5x), 2 μl DTT (0,1 M), 1 μl dNTPs (10 μM) und 1 μl dN6 Random-Primer gegeben. Zur Denaturierung der RNA wurde der Mix 5 min bei 70 °C inkubiert und nach der Abkühlung auf ca. 50 °C jeweils 1 μl Superscript II hinzugefügt. Die reverse Transkription erfolgte anschließend bei einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde der Mix für 10 min auf 70 °C erhitzt. Durch die Zugabe von jeweils 1 μl RNase A und der anschließenden Inkubation bei 37 °C (20-30 min) wurde die restliche RNA entfernt.

2.2.4 Realtime-PCR

Um die Expressionsstärke der mRNA zu quantifizieren, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR mittels des LightCyclers II Systems von Roche Diagnostics, Mannheim, durchgeführt. Die hierfür benötigte cDNA wurde wie unter 2.2.3 beschrieben hergestellt. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt:

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

0,5 µl Primer forward (20 µM)

0,5 µl Primer reverse (20 µM)

8 µl H₂O

und hierzu jeweils 1 µl cDNA bzw. 1 µl H₂O für die Negativkontrolle.

Der Versuchsansatz wurde dabei folgendem Programm unterzogen:

Denaturierung: 95 °C

Annealing: je nach Primerpaar variierend, 45 Zyklen

Amplifikation: 72 °C

Messtemperatur: je nach Primerpaar variierend

Primerpaar	Annealing	Messtemperatur	Standard
			1:1; 1:10; 1:100
KCNN2 for 1431/ KCNN2 rev 1618	58 °C	80 °C	Mel Juso
PLXNA1 for 3202/ PLXNA1 rev 3345	59 °C	89 °C	Mel Ju
SHFM1 for 112/ SHFM1 rev 215	58 °C	81 °C	Mel Im

Als Standard zur Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde das „housekeeping gene“ β -Aktin verwendet.

2.2.5 Gelelektrophorese

Für den Nachweis von PCR-Produkten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Mittels dieser Methode werden die DNA-Moleküle ihrer Größe entsprechend aufgetrennt.

Für alle Nachweise wurde ein 1,5 % Agarose-Gel verwendet. Die PCR-Proben wurden mit einem Blaumarker versehen und in die Geltaschen pipettiert. Außerdem wurde ein Standard mit aufgetragen, um die Länge der Fragmente abschätzen zu können. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte stets bei 117 V in einem 1x TAE-Puffer.

Um die aufgetrennte DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel nach der Elektrophorese für 20 Minuten in eine Ethidiumbromid-Lösung (0,04 %) gelegt. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA. Da Ethidiumbromid UV-Licht absorbiert und im sichtbaren Bereich fluoresziert, konnte das Gel abschließend unter dieser Wellenlänge analysiert und fotografiert werden. Anhand des Standards ließ sich die Länge der DNA-Fragmente bestimmen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Internetrecherche

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden sieben Studien der Internetdatenbank GEO Profiles des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) auf der Homepage dieses Zentrums <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> untersucht. Ziel war dabei, anhand dieser Studien Gene herauszufiltern, die aufgrund der veröffentlichten Daten auf eine Korrelation mit der Melanomentstehung oder -entwicklung schließen lassen. Anschließend sollte im Labor untersucht werden, ob dieser Zusammenhang nachgewiesen oder widerlegt werden kann.

Als erstes Auswahlkriterium wurde die Studie **GDS1375** gewählt. Hierbei finden sich in der Datenbank 22.283 analysierte Gene. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 8.000 Gene dieser Datenbank auf eine mögliche Korrelation mit dem malignen Melanom untersucht. In den Diagrammen des Arrays GDS1375 finden sich, wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, jeweils sieben Proben normaler Haut, 18 Proben von benignen Nävi und 45 Proben aus Zelllinien des malignen Melanoms. Die insgesamt 70 Proben finden sich in den grau unterlegten Kästen und wurden mit GSM71671 bis GSM71740 durchnummeriert. Bei GDS1375 sowie auch bei allen anderen folgenden Studien lässt sich an der linken oberen Ecke jedes Diagramms der Studienname (hier GDS1375), anschließend der jeweilige Reporter, der das Diagramm bereitgestellt hat (hier 202276_at) und zum Schluss der Name des Gens (hier SHFM1) ablesen. Auf der linken Y-Achse werden in roter Schrift Werte angegeben, auf die sich die roten oder zum Teil rosafarbenen Balken beziehen. Diese Balken zeigen die Expressionsstärke des jeweiligen Gens und jeder Balken repräsentiert die Messergebnisse einer Probe. Rosafarbene Balken tragen den Status „*absent*“. Bei diesen Proben konnte die Genexpression nicht detektiert werden oder es wurden Streusignale detektiert. Da dies bedeutet, dass sich das jeweilige Expressionssignal unter der Detektionsschwelle befindet, ist der Wert nicht automatisch gleich Null zu setzen. Diese Werte wurden im Folgenden für die Berechnung der Mittelwerte außer Acht gelassen, da sie keine verlässlichen Daten vorweisen. Auf der rechten Y-Achse findet man in blauer Schrift eine Skalierung in Prozentangaben. Auf diese Achse beziehen sich die blauen kleinen Quadrate im Diagramm. Diese repräsentieren

eine Rangordnung der Expressionsmessung. Alle Werte einer Hybridisierung wurden sortiert und anschließend in 100 Gruppen aufgeteilt.

Im Folgenden wird nun zur Veranschaulichung des Vorgehens bei der Analyse immer ein Diagramm des Gens SHFM1 gezeigt.

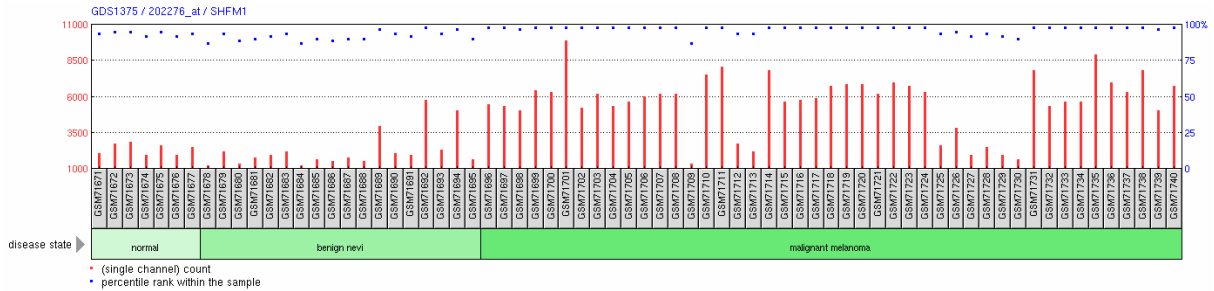


Abbildung 3.1: GDS1375 des Gens SHFM1

In der Studie GDS1375 wurde anhand der Expressionsstärke überprüft, ob das Gen eine differentielle Expression zwischen Nävi und Melanom bzw. zwischen Haut und Nävi zeigt. In die weitere Analyse wurden die Gene aufgenommen, bei denen sich eine veränderte Expression in den Proben des malignen Melanoms zeigte. Wenn es keine oder nur geringe Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben gab, wurde das Gen als nicht melanomrelevant eingestuft und für die weitere Untersuchung außer Acht gelassen. Auf diese Weise wurden anhand dieses ersten Kriteriums folgende Gene für weitere Analysen zugelassen (siehe Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2):

ABCA3	ABHD2	ACOT7	ACSL3
ACTN1	ADCY2	ADIPOR2	ADPGK
AGRN	AHCY	AHSA1	AI348935
AI890903	AI983904	AI984980	AKT1
AL049983	AL109671	AL109716	AL525798
ALG9	ANP32A	AP1S2	AP2B1
AP2S1	AP2S2	AP3D1	APLP2
APOO	APRT	ARMC6	ARPP-19
ASF1B	ATF5	ATP2A2	ATP5D
ATP6V0A1	ATP6V0B	AW051856	BAMBI

BAT2	BE251303	BE547674	BE617588
BE790157	BF691447	BFAR	BIRC5
BPGM	BRD9	BSG	BUB1
C12orf24	C15orf39	C15orf44	C16orf33
C17orf81	C18orf1	C19orf28	C1orf78
C1QL1	C20orf27	C7orf44	C8orf30A
CA6R1769	CABIN1	CALM1	CALU
CAMK1G	CBFB	CCDC92	CCT3
CCT5	CCT7	CD320	CDC16
CDC2	CDK2	CDK2AP1	CDK5R1
CDKN2A	CDS2	CENPF	CEP152
CEP55	CETN2	CHD4	CHMP2A
CHST11	CHST6	CINP	CISD1
CKMT2	CLEC11A	CLEC16A	CLIP2
CLK3	CNOT4	CNP	CNPV3
COL18A1	COMMD4	COPE	CORO1B
COX10	CPSF4	CRTC3	CRYBB2
CSGlcA-T	CSK	CTBP2	CTNND2
CTPS	CUEDC2	CUX1	CYB5B
CYBA	DAG1	DAMM2	DAZAP1
DBF4	DBN1	DDIT4	DENND4B
DHX16	DHX34	DNA2	DONSON
DPM2	DPP8	DPY19L2P2	DTL
DUT	DYNC1H1	DYNC1LI2	E2F1
E2F3	ECM1	EFTUD1	EHMT2
EIF2AK1	ELAVL1	ENO2	ETFA
FABP3	FAM13A1	FAM96B	FARP1
FBXO31	FIS1	FKBP1A	FLJ22222
FLJ22536	FLNA	FLOT1	FLOT2
FOXD1	FOXM1	G6PC3	G6PD
GATAD2A	GBL	GDI1	GIN52

GNB1	GNPDA1	GPR153	GPR153
GPR161	GPRC5B	GPX1	GPX4
GTF2H4	GTF3A	H2AFV	HAGH
HCN2	HEATR2	HEXA	HEXA
HGS	HMBS	HMOX2	HSD17B10
HSPE1	HSPH1	HYOU1	ICMT
IFFO	IFI16	IFI16	IFI6
IFIT1	IFNGR2	IGF2R	IL16
IMP3	IPO13	IQCE	IQCK
ITGA3	ITPKB	ITPR3	IVNS1ABP
KCNAB2	KCNN2	KHSRP	KIAA0101
KIAA0265	KIAA0265	KIAA0329	KIAA0649
KIAA1539	KIF20A	KIF2C	KIT
LARP1	LASS2	LEF1	LOC286434
LOXL1	LPPR4	LRFN4	LRP8
LRRC59	LSM4	LYPLA3	LYST
MAD2L1BP	Magmas	MAN2B1	MARCH2
MARCKS	MAT1A	MBP	MC1R
MDH2	MET	METTL2B	MICAL2
MKLN1	MNX1	MRPL44	MRPS11
MRPS15	MT1F	MYO1C	N36928
N51370	NAV2	NCAPG	NCK2
NDC80	NDUFA13	NDUFA3	NEDD4L
NLK	NME1	NME4	NRF1
NRSN2	NSUN5	NT5DC3	NTHL1
NUP62	OAZ2	OGFOD1	OGFR
OIP5	ORAI2	OVOL3	PANX1
PARD6A	PCBD1	PCDHGC3	PCSK1N
PEG3	PEX6	PFDN6	PGK1
PHC2	PIGB	PIP5K1C	PKMYT1
PLEKHO2	PLK1	PLP1	PLXNA1

PLXNB3	PML	POLG	POLR2I
POM121C	PON2	POU4F1	PPCDC
PPIAL	PPIB	PPM1J	PPP2R1A
PPP2R4	PRKD3	PRR14	PSCD2
PSMB2	PSMB3	PSMC4	PSMD8
PTTG1	QDPR	RAB17	RAB27A
RAB5C	RAB6A	RABL14	RAD23A
RARA	RASGRF1	RASSF1	RBM10
RCC1	REPIN1	RFXANK	RGS12
RHOBTB1	RHOQ	RNASE4	RNASEH2A
RNF19B	RP11-336K24.9	RPP25	RRAGD
RUNX3	RUVBL2	S100A1	SAMHD1
SCAMP2	SDF2L1	SDF4	SEMA4C
SEMA5A	SERP1	SERPINA3	SFXN3
SHCBP1	SHFM1	SHROOM2	SIVA1
SLC2A14	SLC35A2	SLC43A3	SLC6A8
SLC7A5	SMARCA4	SMARCD3	SMN1
SMURF1	SNRPb	SNTB1	SNX1
SOX4	SPG21	SPON2	SPR
ST20	ST3GAL5	STMN1	STOML1
STRN4	SV2A	SYNGR3	SYT11
TBC1D2B	TBCB	TCEB2	TCF3
TFRC	TIMM17B	TIMP2	TMED3
TMEF1	TMEM121	TMEM147	TMEM160
TNFRSF21	TNKS	TOMM34	TPI1
TRAK2	TRIM2	TSPAN3	TUBB3
TUBG1	TUSC2	TXNL4A	TYMS
UBAC1	UBL5	UCK2	USF2
USP11	USP12	VAR5	VKORC1
VRK3	WARS	WDR13	WDR61
WFDC1	WIPI1	YKT6	YWHAB

ZC3H13	ZDHHC7	ZFAND6	ZKSCAN5
ZMPSTE24	ZNF282	ZNF783	ZNF787

Tabelle 3.1: Gene mit erhöhter Expression in GDS1375

ABHD5	ABLIM1	AGA	AHNAK2
AI700518	AI86739	AK021960	AKR1C1
AL050025	ALDH2	ALDH3A2	ALDH9A1
ALDOC	ALOX12	ANXA1	AQP1
ARHGAP19	ARHGEF10L	ARL5A	ARPC5L
ATP2C2	ATP5C1	AU144284	AU15093
AW084068	BAIAP2	BCR	BE965369
BEX4	BF476502	BG546884	BG547855
BLCAP	BMP7	BSPRY	BTG1
C1orf165	C1orf46	C2orf25	C10orf18
C10orf57	C11orf2	C18orf1	C22orf9
CA12	CCNG2	CCRL1	CD1A
CDBA	CDC37L1	CENTD1	CHMP2b
CHP	CIRBP	CITED2	CLDN1
CLTB	CPA4	CPT1B	CREG1
CRLF1	CTDSP2	CX3CL1	CYB5A
CYB5R2	CYFIP1	CYP39A1	DCLK1
DDEFL1	DHRS4	DKK2	DLG1
DLX5	DMD	DNMBP	DSE
EAPP	ECHDC3	EFEMP1	EFS
EGLN3	EHD2	EIF4EBP2P	ELMO3
EMP2	ENPP2	EPM2AIP1	ERCC5
EREG	FABP7	FER1L3	FERMT1
FGF2	FGFR2	FMO5	FRY
FXYD3	FZD10	GALT	GOLSYN
GB111761	GPR177	GRAMD1C	GRHL2
GSN	GSTA4	GSTT1	H15535
HEBP2	HLF	HNRNPM	HSPB2

IL22RA1	IMPA2	IRX4	KCNK7
KIAA0754	KIAA1128	KIAA1305	KLK1
KRT2	LAMB4	LIMCH1	LOC440434
LOC100128334	LOH11CR2A	LRBA	LXN
LY6G6C	LY75	MAK10	MAL
MANSC1	MAP3K5	MAP3K9	MAP4K5
MAST4	MBOAT2	METTL3	METTL7A
MID1	MLLT3	MORC4	MSMB
MYCL1	N4BP2L1	NAP1L2	NCOA4
NDRG1	NDRG2	NFATC1	NFIB
NISCH	NLRP1	NR2C1	P53AIP1
PAK6	PALLD	PCLO	PDLIM1
PER3	PEX7	PGAP1	PLAGL1
PLEKHG3	PNN	POF1B	PPA1
PPP1CC	PRDM15	PRODH	PRPF18
PRSS8	PRSS22	PDS3	PTPRF
RAPGEF4	RAPGEF5	RIOK3	RNF43
RP6-213H19.1	RPL22	RPS28	RTF1
S100A14	SCYL3	SDC1	SDC4
SEMA3F	SEPT8	SERTAD2	SFRS5
SGSM2	SLC25A38	SLC31A2	SMAD1
SMARCA2	SNED1	SOX15	SPATA5L1
STARD5	TASP1	TMEM45A	TMEM87A
TMEM168	TNFRSF25	TNK1	TP63
TPD52L1	TSPAN6	TUBA4A	UBE3A
UHRF1BP1L	VDR	VPS13D	VSNL1
WASF3	WDR37	ZBTB5	ZFAND1
ZNF268	ZNF273		

Tabelle 3.2: Gene mit verminderter Expression in GDS1375

Anschließend wurde mit zwei weiteren Studien untersucht, ob das Gen in Keratinozyten exprimiert wird. Dadurch konnte geprüft werden, ob die unterschiedliche Expression in GDS1375 an der Zellzusammensetzung der verschiedenen Proben liegen kann und zum Beispiel die Keratinozyten für die gemessene Expression verantwortlich sein können. Hierfür wurde zunächst **GDS1505** betrachtet. Der Array zeigt die Expression in je vier Proben normaler Haut, kultivierter Keratinozyten, kultivierter Fibroblasten und dem sogenannten „cultured skin substitute“, also kultivierter Haut, die Fibroblasten und Keratinozyten enthält (siehe Abbildung 3.2).

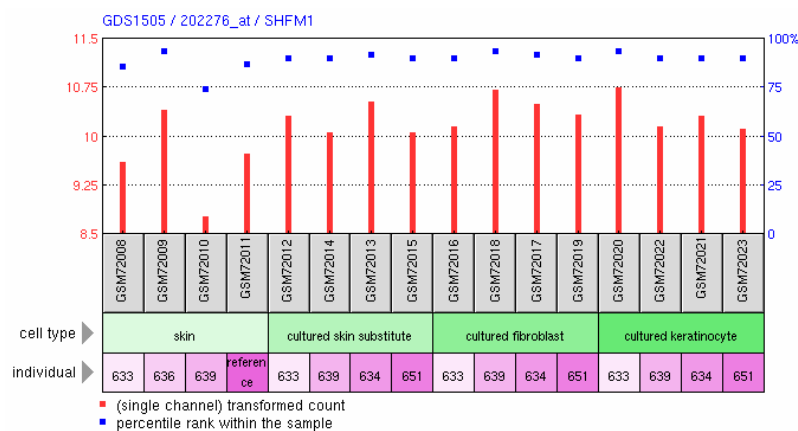


Abbildung 3.2: GDS1505 des Gens SHFM1

Diese Studie musste im Bezug auf die Studie GDS1375 gesehen werden. Bei dort im Melanom im Vergleich zu normaler Haut hochregulierten Genen spielte GDS1505 eine untergeordnete Rolle. Wenn sich jedoch in GDS1375 eine niedrigere Expression des Gens im Melanom als in der normalen Haut zeigte, konnte mit GDS1505 überprüft werden, ob diese hohen Expressionswerte in der Haut an den dort vorhandenen Keratinozyten liegen oder ob das Gen tatsächlich im Melanom niedriger oder gar nicht exprimiert wird.

Zur weiteren Kontrolle wurde **GDS2081** eingesetzt. Diese Studie zeigt den Einfluss eines Jun-Kinase-Inhibitors auf Keratinozyten. Während die ersten vier Proben die Expressionsstärke bei unbehandelten Keratinozyten nach einer, vier, 24 und 48 Stunden zeigen, wurde bei den anderen vier Proben der Jun-Kinase-Inhibitor SP600125 eingesetzt und zu den gleichen Zeitpunkten die Genexpression gemessen (siehe Abbildung

3.3). SP600125 ist ein spezifischer reversibler ATP-kompetitiver Inhibitor für die drei Isoformen der Jun-Kinase. Die Jun-Kinase gehört zu den Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPKs), die unter anderem bei der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung beteiligt sind und eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen. Aktiviert wird die Jun-Kinase durch Zytokine, UV-Strahlung, Hitze und osmotischen Schock (Kyriakis et al., 2001; Miodovnik et al., 2011). Allerdings war für die Analyse dieser Arbeit die Regulation durch die Jun-Kinase unerheblich. Da mit dieser Studie ebenso wie mit GDS1505 untersucht werden sollte, ob die differentielle Expression an der unterschiedlichen Zellzusammensetzung der Proben liegen könnte, wurde für laut GDS1375 im Melanom herunterregulierte Gene auf der linken Seite des Diagramms überprüft, ob das Gen in Keratinozyten exprimiert wird. Wie schon die vorherige Studie spielte auch GDS2081 für im Melanom stärker als in normaler Haut exprimierte Gene eine untergeordnete Rolle.

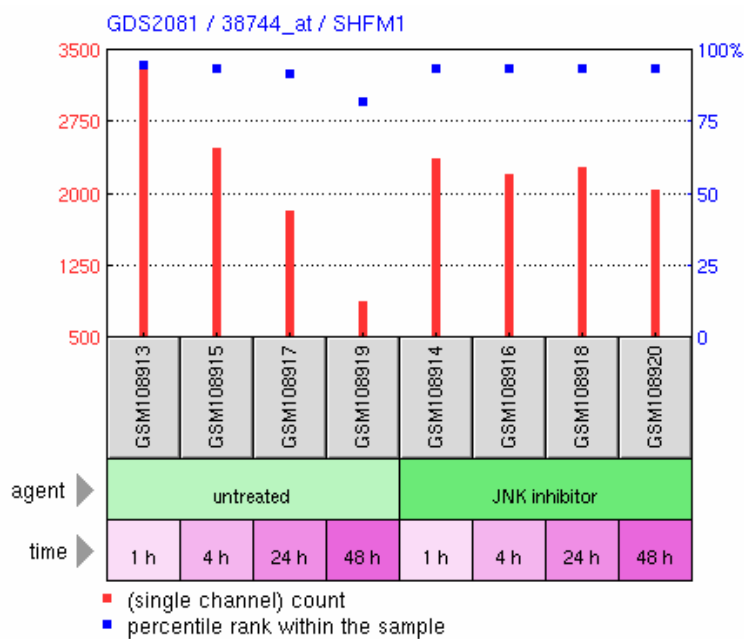


Abbildung 3.3: GDS2081 des Gens SHFM1

Anschließend wurde anhand von drei weiteren Studien (GDS1989, GDS1965 und GDS1314) geprüft, ob das Gen eine differentielle Expression im Vergleich von Melanozyten und Melanomzellen zeigt. Bei **GDS1989** wird, wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, die unterschiedliche Expression des Gens in 18 Gewebeproben dargestellt, die das ganze Spektrum von normaler Haut über benigne und atypische Nävi, *Melanoma in*

situ, vertical-growth-phase (VGP)-Melanome und metastatische Melanome bis hin zu Lymphknotenmetastasen abdecken.

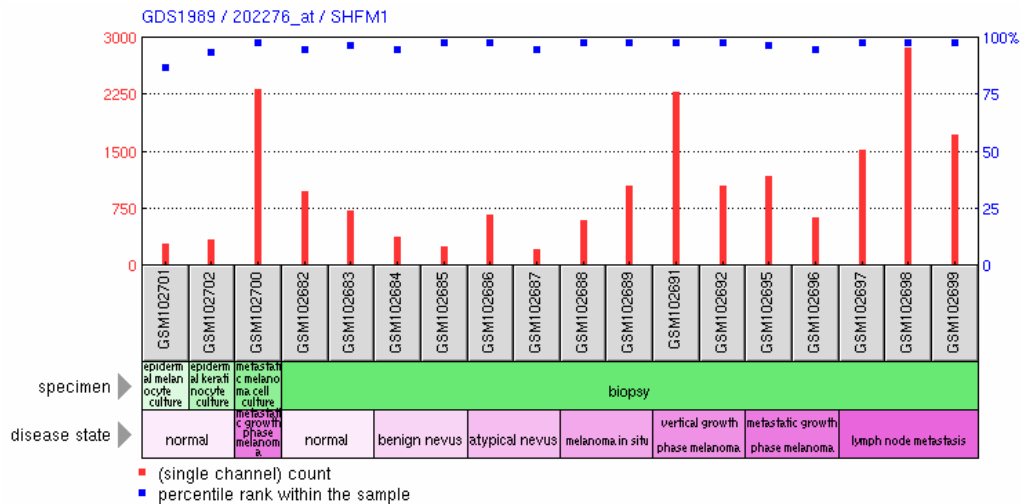


Abbildung 3.4: GDS1989 des Gens SHFM1

Hierbei wurde überprüft, ob sich eine im Zuge der Melanomprogression veränderte Genexpression finden lässt. Für die weitere Analyse wurden die Gene zugelassen, bei denen sich eine unterschiedliche Expression zwischen normaler Haut und bereits entarteten Zellen zeigte. Bei den Genen, die in GDS1375 eine Überexpression im malignen Melanom zeigten, war dabei wichtig, dass sich eine Tendenz zu steigender Expression im Zuge der Melanomentwicklung erkennen ließ, wohingegen bei den Genen, die gemäß GDS1375 im Melanom vermindert exprimiert werden, auch in GDS1989 eine Herunterregulation des Gens im Verlauf vom Nävus zum metastasierenden Melanom zu sehen sein sollte.

Da jedoch die Nävusproben auch Keratinozyten enthalten und sich in den Gewebeproben aus normaler Haut sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten befinden, wurde zur Kontrolle **GDS1965** betrachtet. Diese Studie zeigt die Expressionsprofile von normalen Melanozyten, primären Melanomzellen und metastasierenden Melanomzellen (siehe Abbildung 3.5).

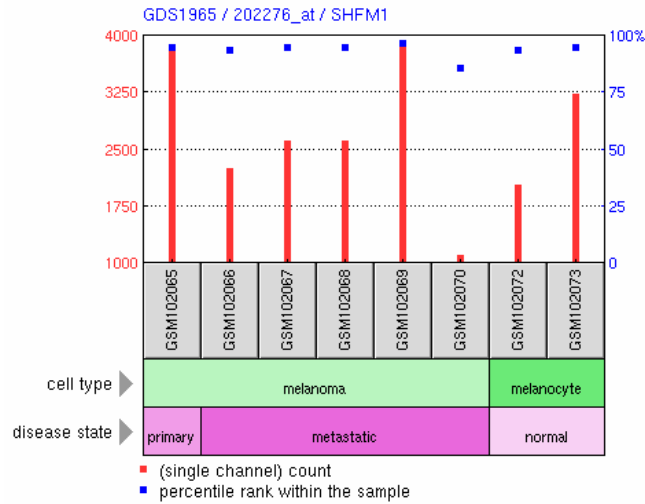


Abbildung 3.5: GDS1965 des Gens SHFM1

Wichtig für die weitere Untersuchung waren die Gene, bei denen sich die Expressionsstärke des Gens in den normalen Melanozyten von der in Melanomzellen unterschied. Außerdem konnten die beiden Studien direkt miteinander verglichen werden, da in beiden Studien die Genexpression in Proben von primären Melanomzellen und bereits metastasierten Melanomzellen gezeigt wird, wobei in den Diagrammen von GDS1989 drei Zelllinien und 15 Gewebeproben zu sehen sind und mit der Studie GDS1965 acht Zelllinien untersucht wurden.

Die Studie **GDS1314** zeigt die Expressionsprofile von fünf Melanomzelllinien: MelJuso, 607B, Skmel 28, A375 und 518A2 (siehe Abbildung 3.6).

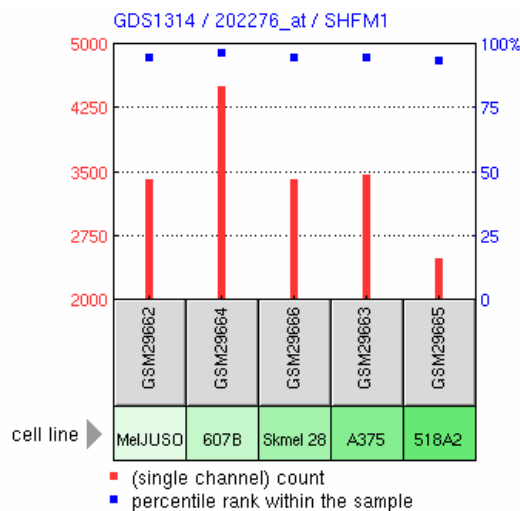


Abbildung 3.6: GDS1314 des Gens SHFM1

Bei dieser Studie wurde überprüft, ob das jeweilige Gen in diesen Melanomzelllinien exprimiert wird. Bei den Genen, bei denen GDS1375 eine Hochregulation im Melanom gezeigt hatte, sollten sich auch hier positive Expressionswerte finden. Im Gegensatz dazu war eine hohe Expressionsstärke bei Genen, die gemäß GDS1375 im Melanom niedrig oder gar nicht exprimiert werden, ein Kriterium, diese Gene aus der weiteren Analyse auszuschließen.

Als letztes Kriterium kam **GDS1761** zum Einsatz. Damit sollte nachgeprüft werden, ob das Gen spezifisch in der Melanomentstehung reguliert wird. Die Diagramme zeigen, wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, Proben aus 60 Zelllinien der sogenannten NCI60 (*National Cancer Institute, USA*) (Shoemaker, 2006), die aus Tumoren verschiedenster Gewebe und Organe stammen und häufig in der Forschung als Modelle für neoplastische Erkrankungen dienen. Anhand dieser Arrays lässt sich erkennen, ob das jeweilige Gen speziell im Melanom exprimiert wird oder ob es zum Beispiel grundsätzlich in malignen entarteten Geweben hoch- oder herunterreguliert ist.

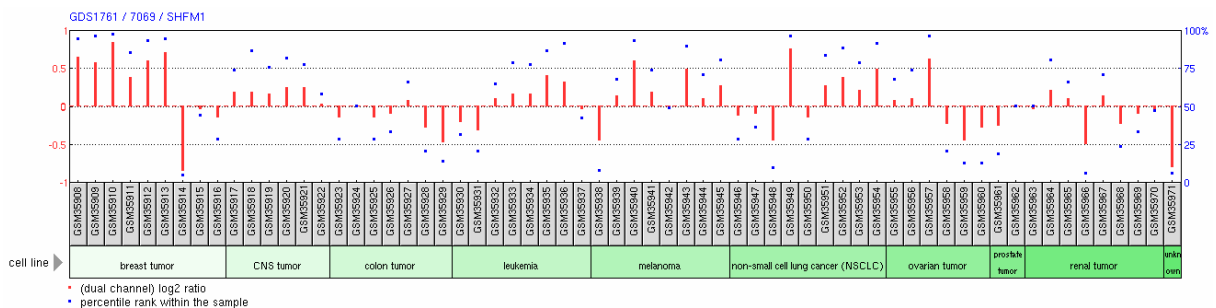


Abbildung 3.7: GDS1761 des Gens SHFM1

Diese Studie war für die weitere Arbeit keine Ausschlussdiagnose. Es konnte allerdings z.T. bestätigt werden, dass das Gen im Melanom verstärkt exprimiert wird.

Das folgende Flussdiagramm (Abbildung 3.8) gibt einen kurzen Überblick über das Vorgehen bei der Analyse der sieben Studien:

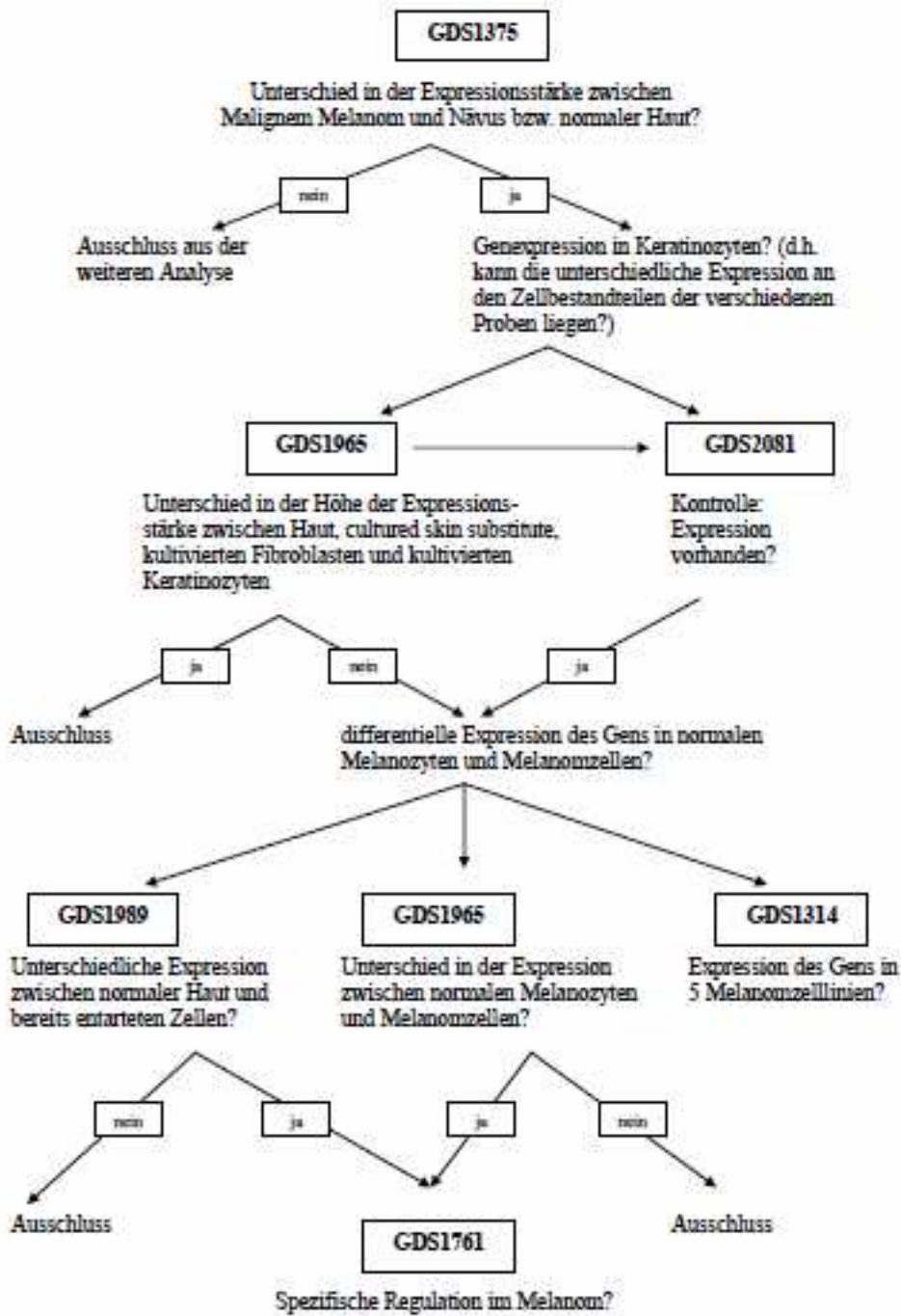


Abbildung 3.8: Flussdiagramm zum Vorgehen bei der Internetrecherche

Nach Analyse dieser sieben Studien ließen 141 Gene auf eine Korrelation mit der Melanomentstehung oder -progression schließen, davon 113 Gene, die in GDS1375 eine Überexpression im Melanom zeigten, und 28 Gene, bei denen diese Studie auf eine verminderte Expression im malignen Melanom schließen ließ (siehe Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4):

ABHD2	ACTN1	ADCY2	ADIPOR2
AKTI1	ANP32A	AP1S2	BRD9
BSG	C19orf28	CBFB	CCDC92
CCT3	CCT5	CDGlcA-T	CDK2
CEP55	CHD4	CHST11	CHST6
COL18A1	COMMD4	COPE	CPSF4
CRTC3	CSK	CYBA	DAMM2
DDIT4	DYNC1H1	DYNC1LI2	EIF2AK1
ENO2	ETFA	FAM96B	FARP1
FLNA	FOXD1	GDI1	GINS2
GPR153	GPX1	HCN2	HEXA
HSPH1	HYOU1	IFI16	IL16
IMP3	ITGA3	ITPKB	ITPR3
KCNN2	KIAA0265	KIT	LARP1
LASS2	LOXL1	LRFN4	LSM4
LYPLA3	LYST	MAT1A	MBP
MC1R	MDH2	MET	MICAL2
MNX1	MYO1C	NAV2	OVOL3
PCDHGC3	PCSK1N	PLEKHO2	PLXNA1
POLG	POM121C	PPCDC	PPIAL
PPIB	PPM1J	QDPR	RAB27A
REPIN1	RPP25	RUNX3	SCAMP2
SEMA4C	SEMA5A	SFXN3	SHFM1
SLC6A8	SLC7A5	SMARCD3	SOX4
ST3GAL5	SV2A	TBC1D2B	TBCB

TCEB2	TMED3	TMEM147	TNFRSF21
TSPAN3	TXNL4A	TYMS	UBL5
USP11	WARS	WFDC1	WIPI1
ZKSCAN5			

Tabelle 3.3: 113 Gene, bei denen gemäß der analysierten Studien eine Überexpression im malignen Melanom vorliegt

ABLIM1	AKR1C1	ALDH2	ALDH3A2
AQP1	BMP7	BSPRY	C1orf46
CA12	CYP39A1	FZD10	HLF
IRX4	KCNK7	KIAA1305	KRT2
LY6G6C	MAL	MAST4	NFIB
POF1B	RP6-213H19.1	S100A14	SCD1
SOX15	TMEM45A	TP63	TUBA4A

Tabelle 3.4: 28 Gene, bei denen gemäß der analysierten Studien eine verminderte Expression im malignen Melanom vorliegt

Für die weitere molekularbiologische Untersuchung wurden schließlich vier Gene ausgewählt, bei denen die zugrunde liegenden Studien auf eine Regulation im malignen Melanom schließen ließen. Diese vier Gene sind KCNN2 (*Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2*), SHFM1 (*Split hand/foot malformation Type 1*), PLXNA1 (*Plexin A1*) und FOXD1 (*Forkhead box D1*). Alle vier Gene werden gemäß der Datenlage im malignen Melanom verstärkt exprimiert, was anschließend im Labor mit molekularbiologischen Methoden überprüft wurde.

Diagramme der vier näher untersuchten Gene:

Im Folgenden werden nun die Diagramme der vier ausgewählten Gene gezeigt.

GDS1375

In den Diagrammen des Arrays GDS1375 finden sich jeweils sieben Proben normaler Haut, 18 Proben von benignen Nävi und 45 Proben aus Zelllinien des malignen Mela-

noms. Anhand der Expressionsstärke lässt sich erkennen, ob das Gen eine differentielle Expression zwischen Nävi und Melanom bzw. zwischen Haut und Nävi aufweist.

Unter den Diagrammen der Internetdatenbank befindet sich jeweils eine grafische Darstellung, in der die Werte der Studie zu Haut, Nävus und Melanom zusammengefasst wurden. Hierbei wurden nur die Werte der roten Balken in den Internetschaubildern berücksichtigt. Aus diesen Diagrammen wurden mithilfe des *GraphPad Prism* Programms die Signifikanzunterschiede zwischen Haut und Nävus, Haut und Melanom und Nävus und Melanom mittels des Mann-Whitney-Tests und des Kruskal-Wallis-Tests ermittelt (Bortz et al., 2008). Zur Veranschaulichung des Signifikanzniveaus wurden gemäß folgender Übereinkunft Sternchen (*) eingefügt: 1 Sternchen (*): $0,05 > p > 0,01$; 2 Sternchen (**): $0,01 > p > 0,001$; 3 Sternchen (***) : $0,001 > p > 0,0001$; 4 Sternchen (****): $p < 0,0001$. Da zwischen verschiedenen Werten die Signifikanzen berechnet und eingetragen wurden, wurde folgende Kennzeichnung vorgenommen: a) Haut vs. Nävus; b) Haut vs. Melanom; c) Nävus vs. Melanom.

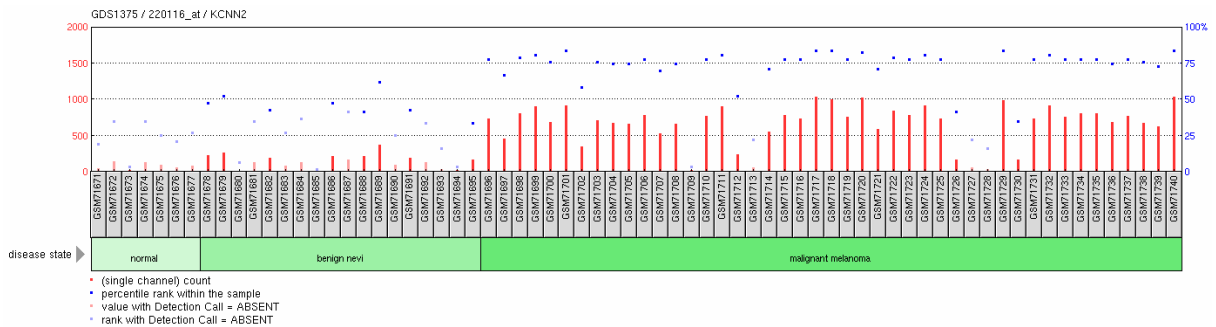


Abbildung 3.9.1: GDS1375 des Gens KCNN2

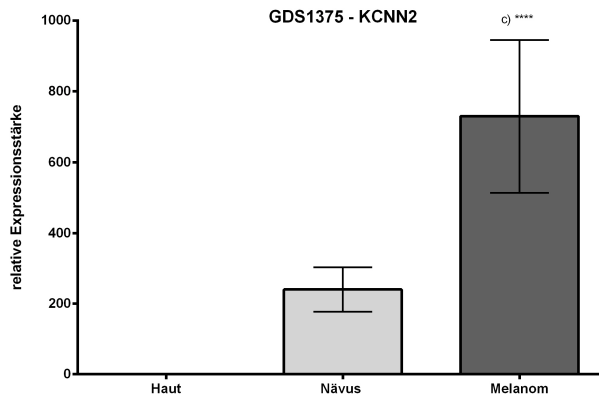


Abbildung 3.9.2: GDS 1375 des Gens KCNN2: Mittelwerte und Standardabweichung

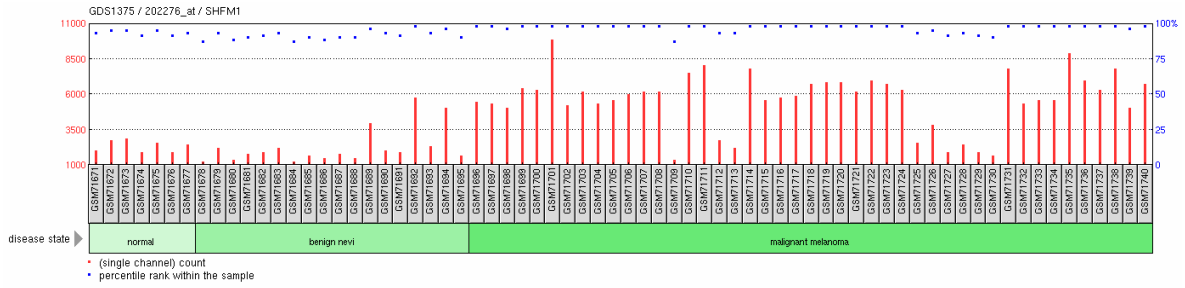


Abbildung 3.10.1: GDS1375 des Gens SHFM1

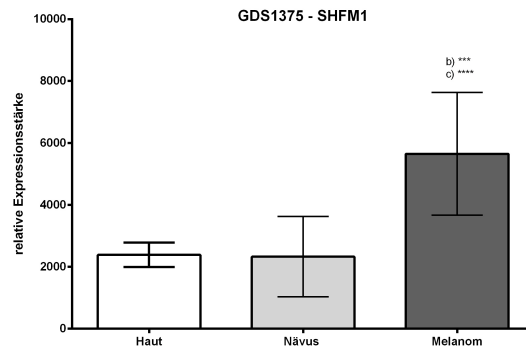


Abbildung 3.10.2: GDS 1375 des Gens SHFM1: Mittelwerte und Standardabweichung

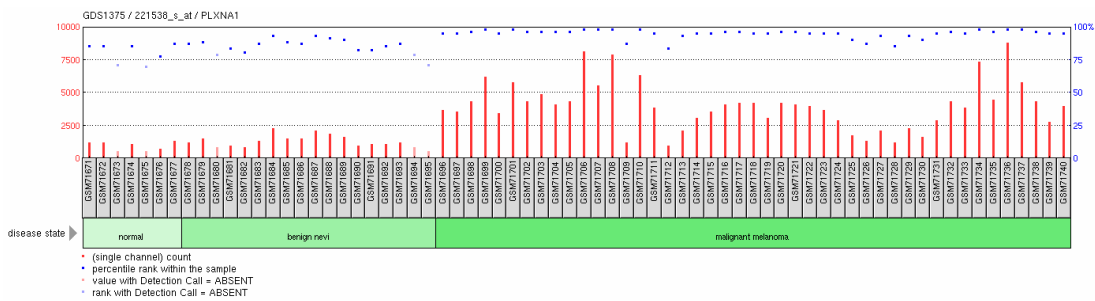


Abbildung 3.11.1: GDS1375 des Gens PLXNA1 (Sonde 221538_s_at)

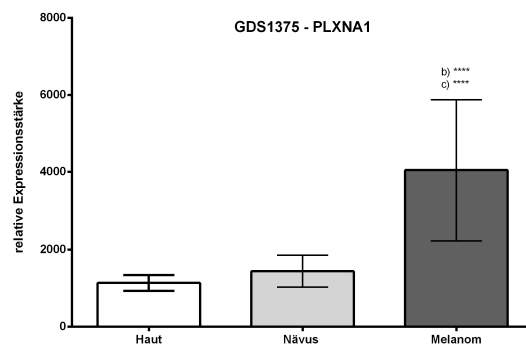


Abbildung 3.11.2: GDS 1375 des Gens PLXNA1: Mittelwerte und Standardabweichung

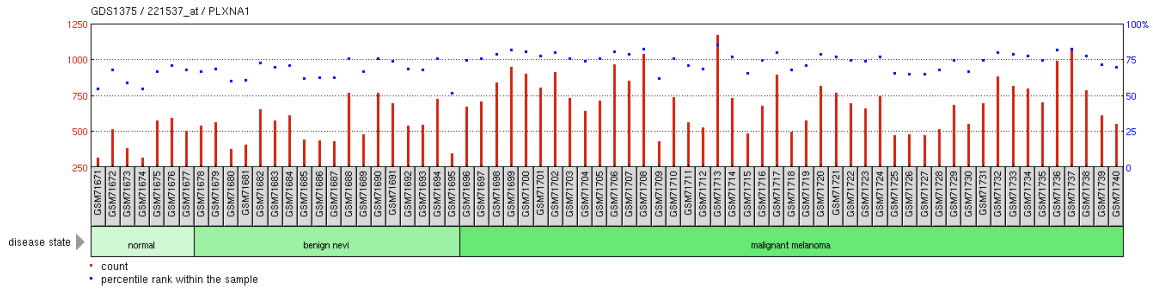


Abbildung 3.12.1: GDS1375 des Gens PLXNA1 (Sonde 221537_at)

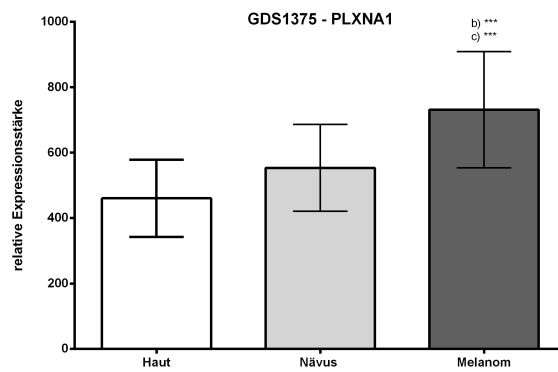


Abbildung 3.12.2: GDS 1375 des Gens PLXNA1: Mittelwerte und Standardabweichung

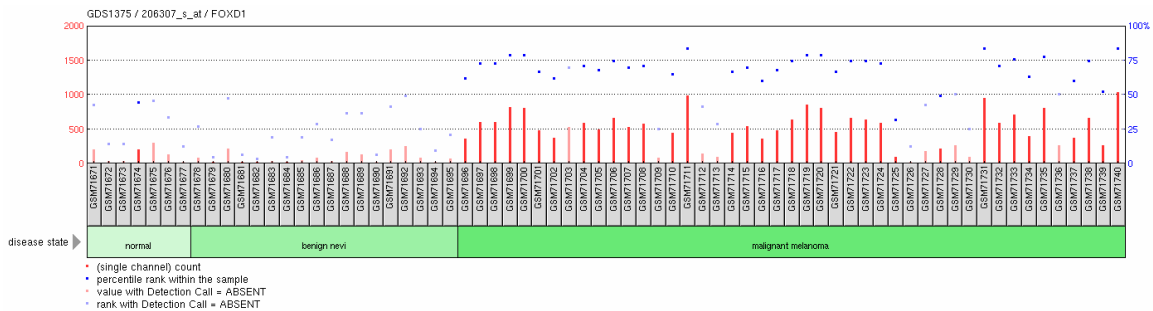


Abbildung 3.13.1: GDS1375 des Gens FOXD1

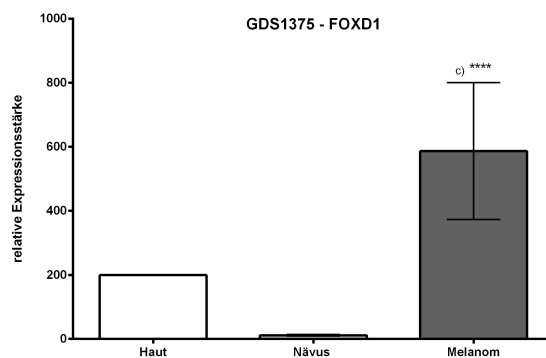


Abbildung 3.13.2: GDS 1375 des Gens FOXD1: Mittelwerte und Standardabweichung

In diesen Diagrammen des GDS1375 fand sich zwischen Haut und Nävus bei keinem der Gene ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Expressionsstärke (p-Wert zwischen 0,10 und 0,18). Das Signifikanzniveau zwischen Haut und Melanom konnte für KCNN2 und FOXD1 aufgrund der zu geringen Werte nicht berechnet werden, für PLXNA1 und SHFM1 ergaben sich jedoch deutlich signifikante Unterschiede (p-Wert PLXNA1 $p=0,0004$ bzw. $p<0,0001$ und p-Wert SHFM1 $p=0,0006$). Zwischen Nävus und Melanom zeigte sich für alle Gene ein deutlich signifikanter Unterschied (p-Wert KCNN2 $p<0,0001$; SHFM1 $p<0,0001$; PLXNA1 $p<0,0001$ bzw. $p=0,0004$; FOXD1 $p<0,0001$).

GDS1505

Mit den Diagrammen der Studie GDS1505 wurde untersucht, ob das Gen in Keratinozyten exprimiert wird. So konnte geprüft werden, ob die unterschiedliche Expression an der Zellzusammensetzung der verschiedenen Proben liegen kann und zum Beispiel die Keratinozyten für die gemessene Expression verantwortlich sein können. Der Array zeigt die Genexpression in je vier Proben normaler Haut, kultivierter Keratinozyten, kultivierter Fibroblasten und dem sogenannten „*cultured skin substitute*“, also kultivierter Haut, die Fibroblasten und Keratinozyten enthält. Auch für diese Studie wurden die einzelnen Werte der untersuchten Zellarten wieder in einem Schaubild zusammengefasst und mittels Mann-Whitney- und Kruskal-Wallis-Test die Signifikanzunterschiede berechnet. Jedoch war die Signifikanz hinsichtlich dieses Array-Experiments nicht aussagekräftig, da mithilfe von GDS1505 lediglich überprüft werden sollte, ob sich eine Expression des jeweiligen Gens in den analysierten Proben finden ließ.

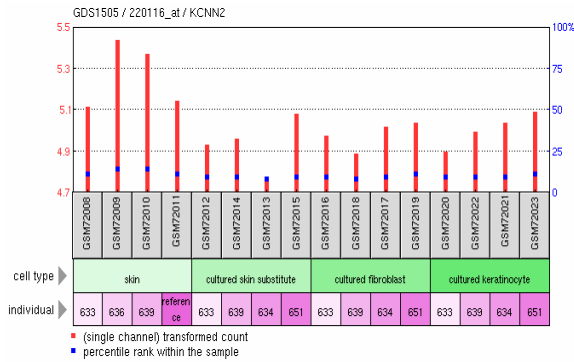


Abbildung 3.14.1: GDS1505 des Gens KCNN2

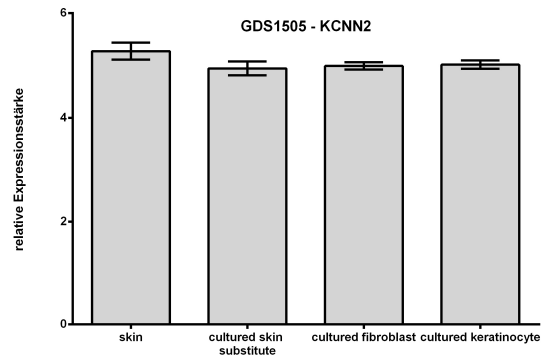


Abbildung 3.14.2: GDS1505 des Gens KCNN2: Mittelwerte und Standardabweichung

Gemäß des Mann-Whitney-Tests finden sich für KCNN2 nur zwischen Haut und dem *cultured skin substitute*, zwischen Haut und den kultivierten Fibroblasten und zwischen Haut und den kultivierten Keratinozyten signifikante Expressionsunterschiede. Die Höhe der Expression zwischen dem *cultured skin substitute* und den Fibroblasten bzw. Keratinozyten ist ebenso wenig wie zwischen Fibroblasten und Keratinozyten signifikant unterschiedlich. KCNN2 war in allen vier untersuchten Proben vorhanden (siehe Abbildung 3.14.2).

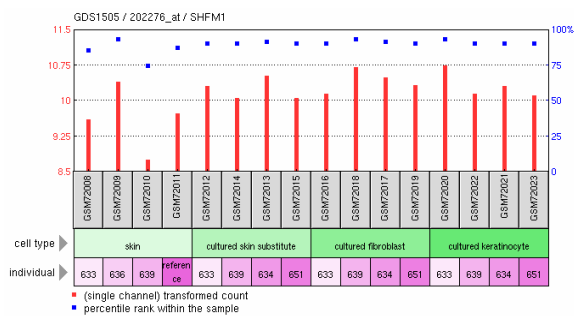


Abbildung 3.15.1: GDS1505 des Gens SHFM1

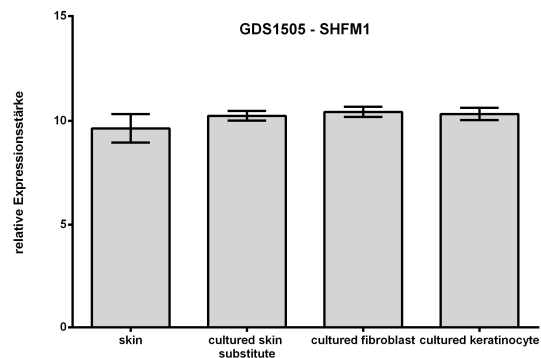


Abbildung 3.15.2: GDS1505 des Gens SHFM1: Mittelwerte und Standardabweichung

Für das Gen SHFM1 (siehe Abbildung 3.15.2) zeigen sich für keine der Gruppen signifikante Expressionsunterschiede im Mann-Whitney- und Kruskal-Wallis-Test, das Gen war jedoch ebenso wie KCNN2 in allen Gruppen vorhanden.

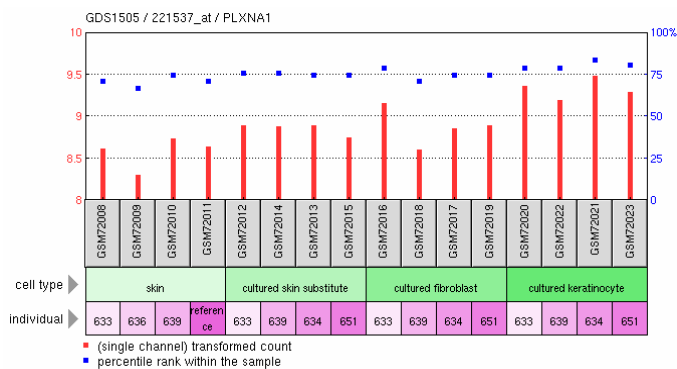


Abbildung 3.16.1: GDS1505 des Gens PLXNA1: (Sonde 221537_at)

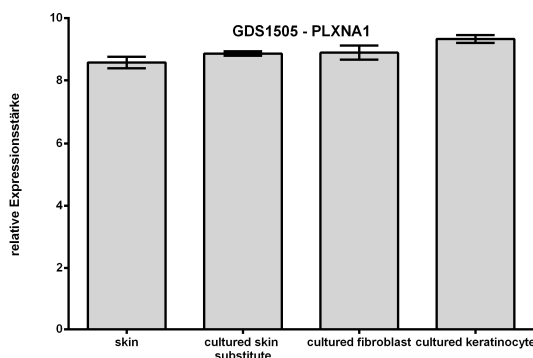


Abbildung 3.16.2: GDS1505 des Gens PLXNA1: Mittelwerte und Standardabweichung

Bei diesem Diagramm des Gens PLXNA1 (Sonde: 221537_at) (Abbildung 3.16.2) ergibt sich im Kruskal-Wallis-Test, der die einzelnen Balken untereinander auf Signifikanz hin überprüft, nur für die Expressionsstärke zwischen Haut und kultivierten Keratinozyten ein signifikanter Unterschied. Eine Expression des Gens konnte in allen untersuchten Gruppen bestätigt werden.

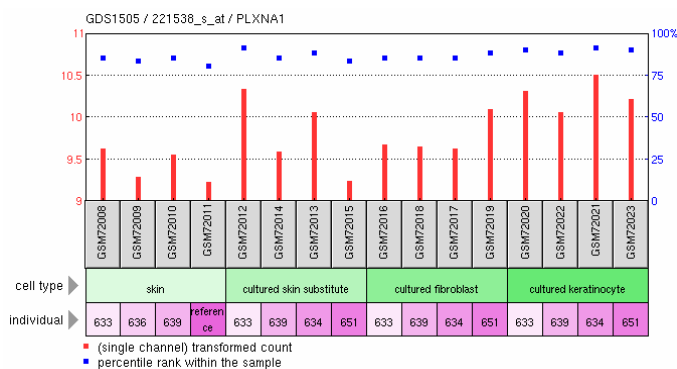


Abbildung 3.17.1: GDS1505 des Gens PLXNA1: (Sonde 221538_s_at)

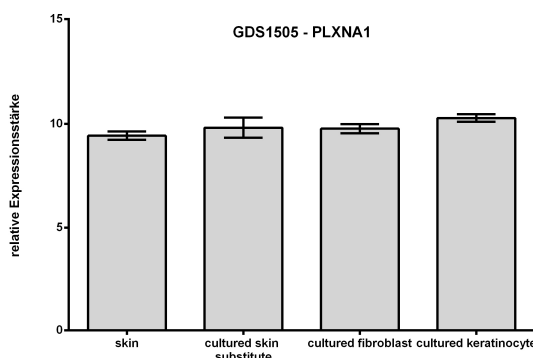


Abbildung 3.17.2: GDS1505 des Gens PLXNA1; Mittelwerte und Standardabweichung

Auch hier (Abbildung 3.17.2) (Sonde 221538_s_at) zeigt sich im Mann-Whitney- und Kruskal-Wallis-Test nur zwischen Haut und kultivierten Keratinozyten ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Expression des Gens PLXNA1, welches in allen Proben vorhanden ist.

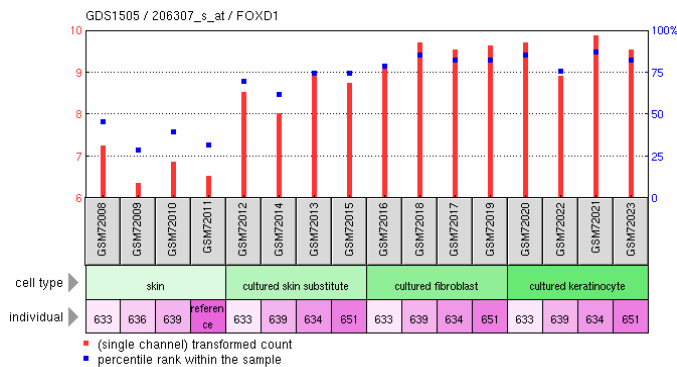


Abbildung 3.18.1: GDS1505 des Gens FOXD1: (Sonde 206307_s_at)

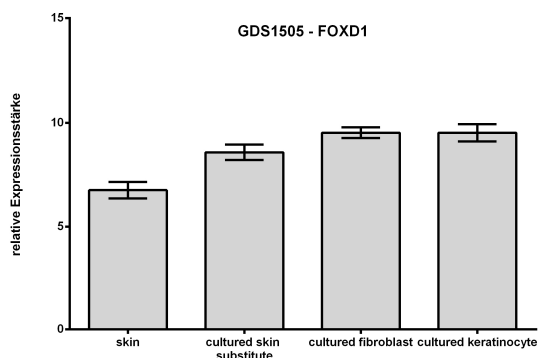


Abbildung 3.18.2: GDS1505 des Gens FOXD1: Mittelwerte und Standardabweichung

Für dieses Diagramm (Abbildung 3.18.2) des Gens FOXD1 (Sonde: 206307_s_at) ergeben sich im Mann-Whitney-Test jeweils signifikante Unterschiede für die Höhe der Expressionsstärke zwischen Haut und allen anderen Proben und zwischen *cultured skin substitute* und Fibroblasten bzw. Keratinozyten. Nur für die Differenz zwischen kultivierten Fibroblasten und Keratinozyten zeigt sich keine Signifikanz. Im Kruskal-Wallis-Test dagegen sind nur die Werte zwischen Haut und kultivierten Fibroblasten und zwischen Haut und kultivierten Keratinozyten signifikant unterschiedlich.

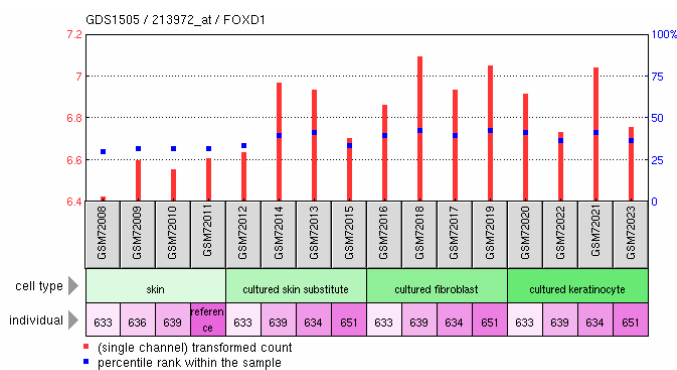


Abbildung 3.19.1: GDS1505 des Gens FOXD1: (Sonde 213972_at)

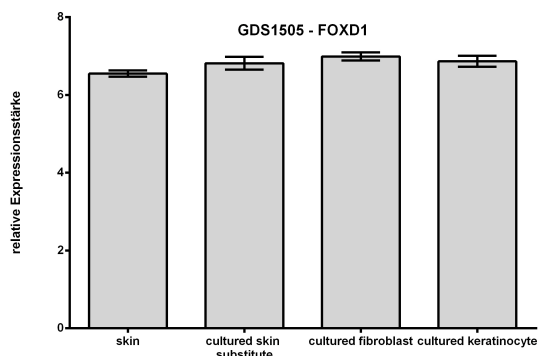


Abbildung 3.19.2: GDS1505 des Gens FOXD1: Mittelwerte und Standardabweichung

Das zweite Diagramm des Gens FOXD1 (Abbildung 3.19.2) (Sonde 213972_at) zeigt im Mann-Whitney-Test signifikante Unterschiede zwischen Haut und den drei anderen Proben, wohingegen der Vergleich zwischen den anderen Proben untereinander keine signifikanten Unterschiede bringt. Mittels Kruskal-Wallis-Test findet sich nur für die Expressionsstärke des Gens in Haut vs. kultivierten Fibroblasten ein signifikanter Unterschied.

GDS2081

Mit der Studie GDS2081 wurde ebenso wie mit GDS1505 untersucht, ob die differentielle Expression an der unterschiedlichen Zellzusammensetzung der Proben liegen könnte. Hierfür wurde vor allem die linke Seite des Diagramms („untreated“) betrachtet. Diese zeigt in vier Proben die Expressionsstärke des Gens in unbehandelten Keratinozyten nach einer, vier, 24 und 48 Stunden. Die jeweils vier Proben wurden in einem Schaubild zusammengefasst und die Expressionsunterschiede zwischen den unbehandelten Keratinozyten und den mit dem Jun-Kinase-Inhibitor behandelten Keratinozyten mittels des Mann-Whitney-Tests auf Signifikanz hin überprüft, wobei sich bei beiden Genen (SHFM1 und FOXD1) kein signifikanter Unterschied zeigte (jeweils $p > 0,99$).

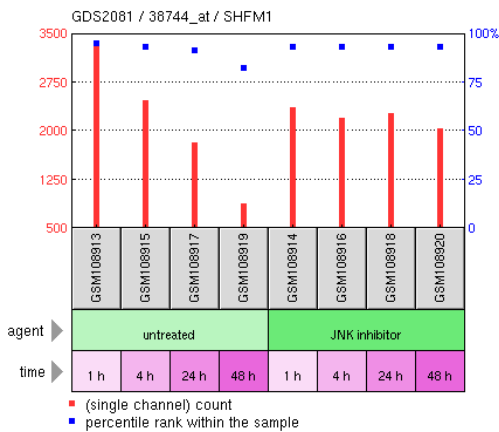


Abbildung 3.20.1: GDS2081 des Gens SHFM1

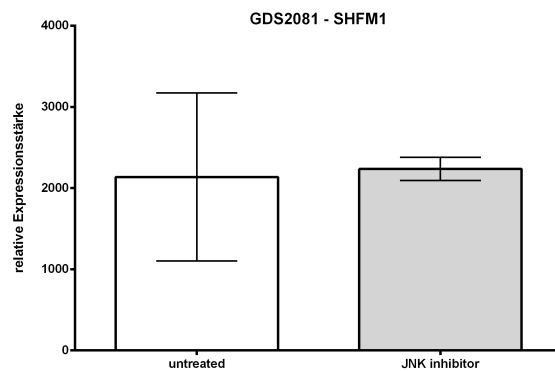


Abbildung 3.20.2: GDS2081 des Gens SHFM1: Mittelwerte und Standardabweichung

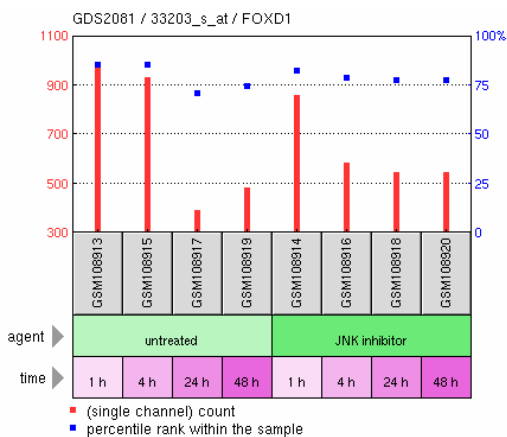


Abbildung 3.21.1: GDS2081 des Gens FOXD1

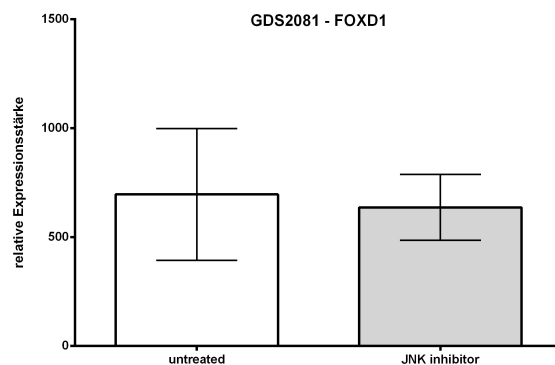


Abbildung 3.21.2: GDS2081 des Gens FOXD1: Mittelwerte und Standardabweichung

GDS1989

In den Diagrammen der Studie GDS1989 wird die unterschiedliche Expression des Gens im Zuge der Melanomprogression dargestellt. Hierbei finden sich je eine Probe aus der Kultur von epidermalen Melanozyten, epidermalen Keratinozyten und des metastasierenden Melanoms. In 15 Gewebeproben finden sich Biopsien von normaler Haut über benigne und atypische Nävi, *Melanoma in situ*, *vertical-growth-phase*-Melanome und metastasierte Melanome bis hin zu Lymphknotenmetastasen. Mithilfe dieser Studie wurde überprüft, ob sich eine im Zuge der Melanomprogression veränderte Genexpression finden lässt.

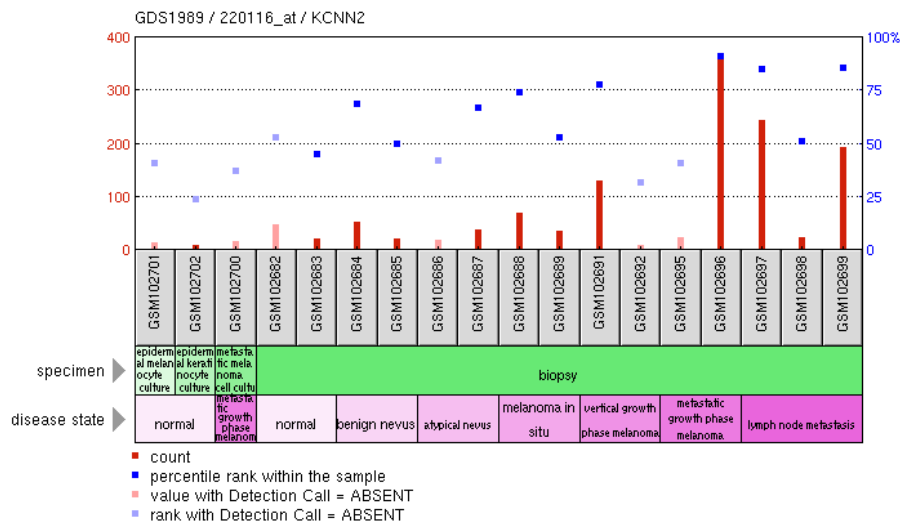


Abbildung 3.22: GDS1989 des Gens KCNN2

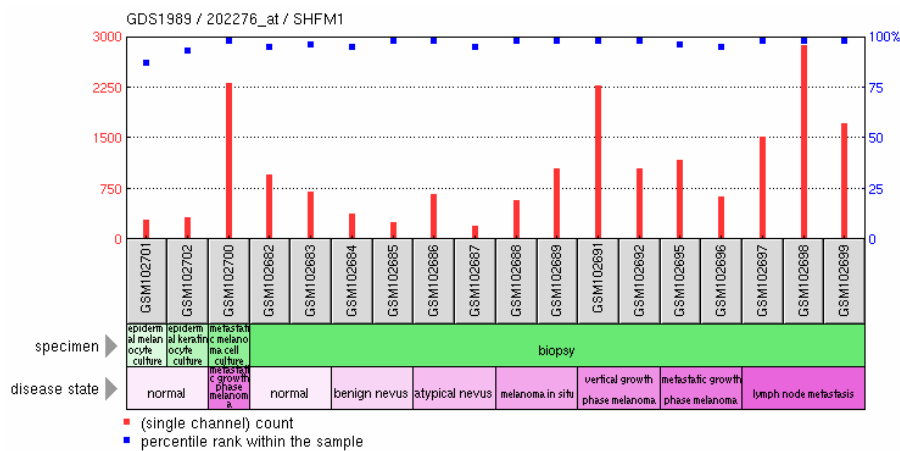


Abbildung 3.23: GDS1989 des Gens SHFM1

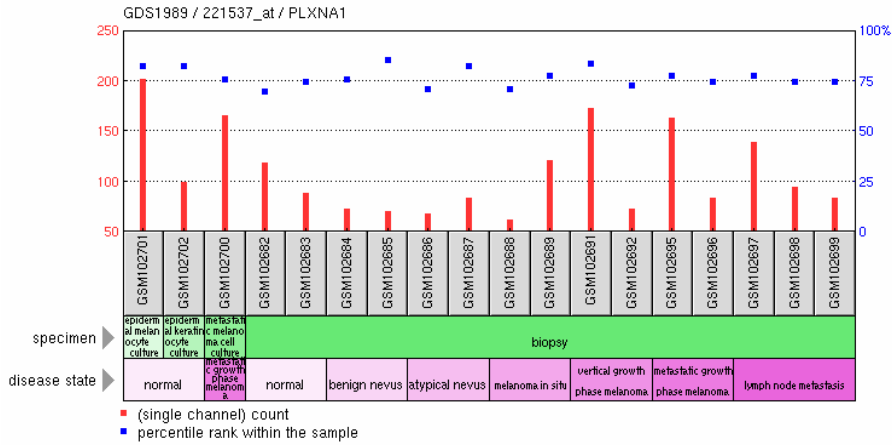


Abbildung 3.24: GDS1989 des Gens PLXNA1 (Sonde 221537_at)

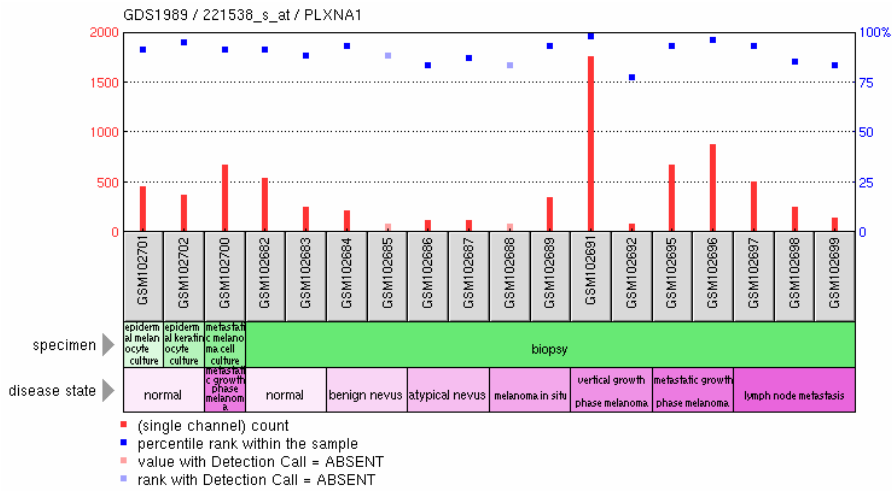


Abbildung 3.25: GDS1989 des Gens PLXNA1 (Sonde 221538_s_at)

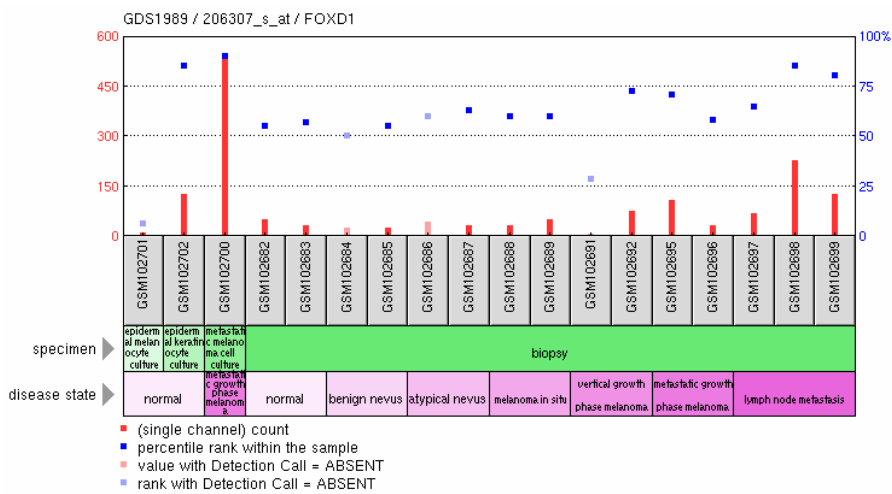


Abbildung 3.26: GDS1989 des Gens FOXD1

GDS1965

Die Studie GDS1965 zeigt die Expressionsprofile von normalen Melanozyten, primären Melanomzellen und metastasierenden Melanomzellen. Für die weitere Untersuchung wichtig waren die Gene, bei denen sich die Expressionsstärke des Gens in den normalen Melanozyten von der in Melanomzellen unterschied. Neben den Internetdiagrammen befindet sich jeweils ein Schaubild, in dem die Werte des Melanoms und die der Melanozyten zusammengefasst wurden. Bei SHFM1 und einem Diagramm des Gens PLXNA1 (Abbildung 3.29.2) fanden sich nicht signifikante Unterschiede zwischen Melanom- und Melanozytenzelllinien (jeweils $p=0,64$). Für die Gene KCNN2, FOXD1 und ein Diagramm des Gens PLXNA1 (Abbildung 3.30.2) ließ sich aufgrund der zu geringen Anzahl an verwertbaren Werten keine Signifikanz berechnen.

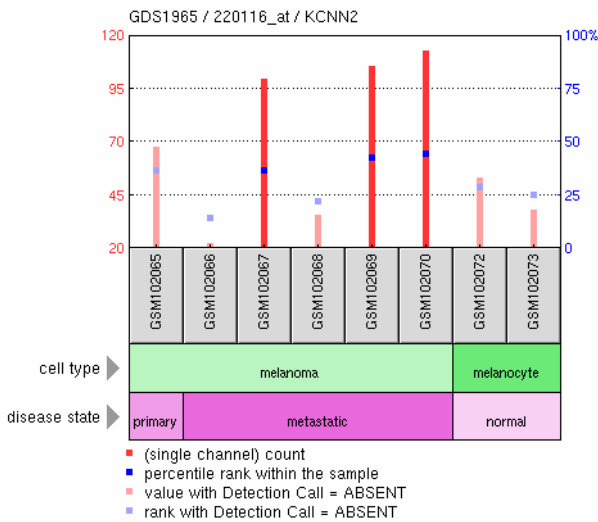


Abbildung 3.27.1: GDS1965 des Gens KCNN2

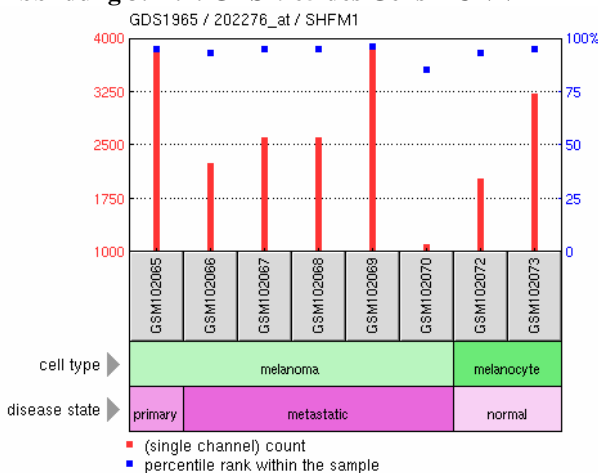


Abbildung 3.28.1: GDS1965 des Gens SHFM1

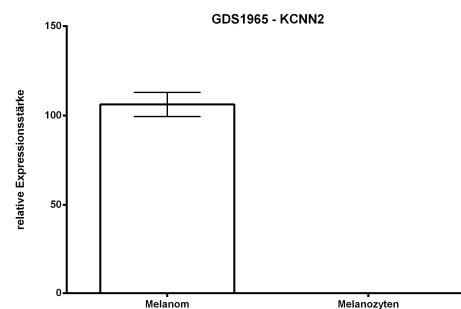


Abbildung 3.27.2: GDS1965 des Gens KCNN2: Mittelwerte und Standardabweichung

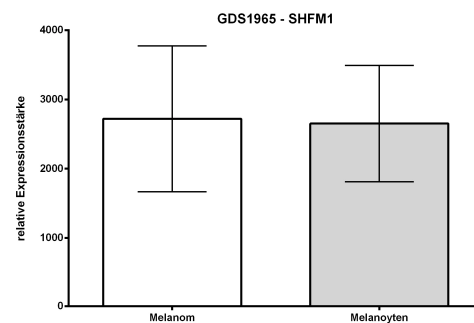


Abbildung 3.28.2: GDS1965 des Gens SHFM1: Mittelwerte und Standardabweichung

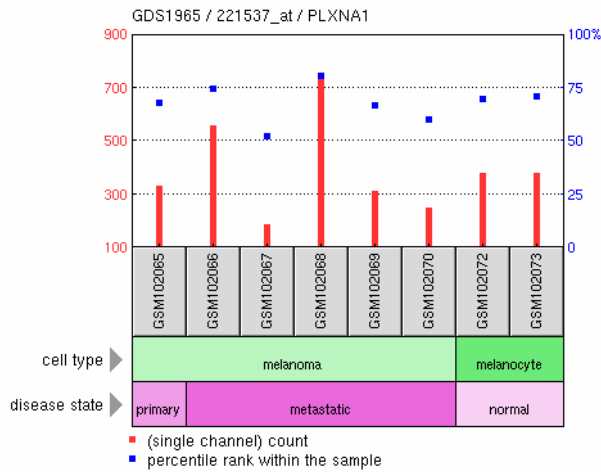


Abbildung 3.29.1: GDS1965 des Gens PLXNA1: (Sonde 221537_at)

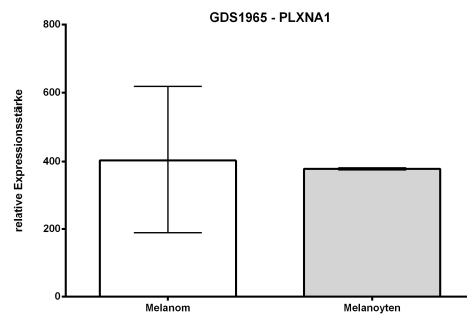


Abbildung 3.29.2: GDS1965 des Gens PLXNA1: Mittelwerte und Standardabweichung

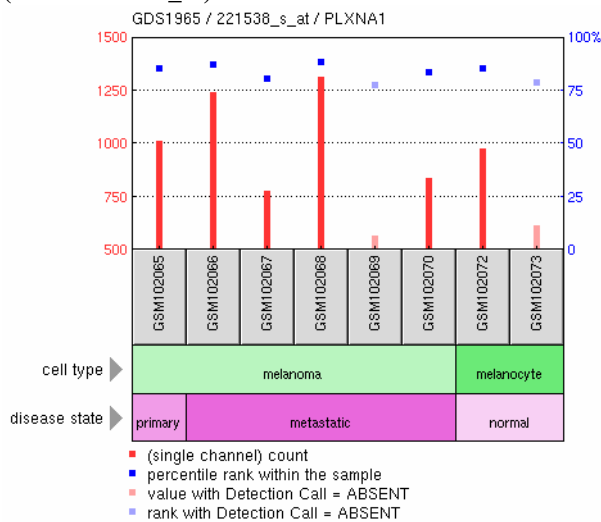


Abbildung 3.30.1: GDS1965 des Gens PLXNA1: (Sonde 221538_s_at)

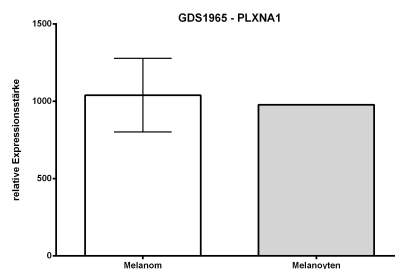


Abbildung 3.30.2: GDS1965 des Gens PLXNA1: Mittelwerte und Standardabweichung

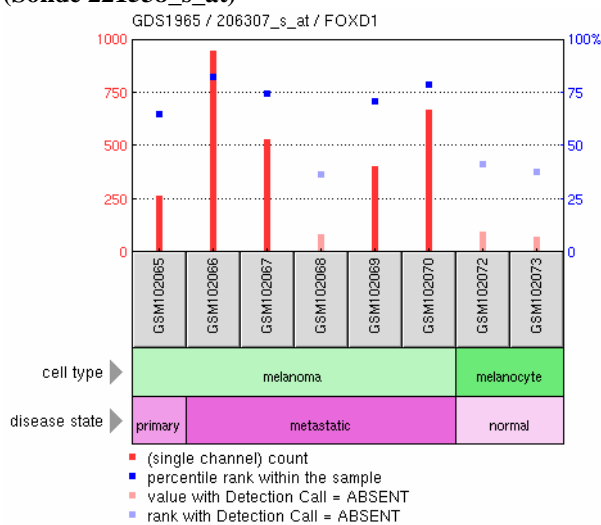


Abbildung 3.31.1: GDS1965 des Gens FOXD1

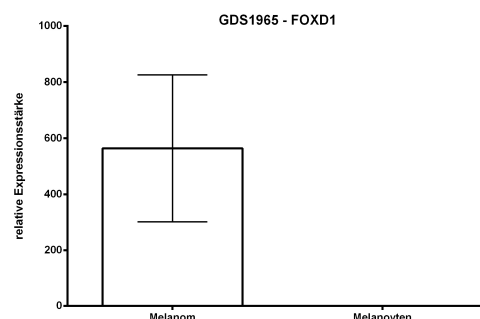


Abbildung 3.31.2: GDS1965 des Gens FOXD1: Mittelwerte und Standardabweichung

GDS1314

In den Diagrammen der Studie GDS1314 sind die Expressionsprofile von fünf Melanomzelllinien zu sehen: Mel Juso, 607B, Skmel 28, A375 und 518A2.

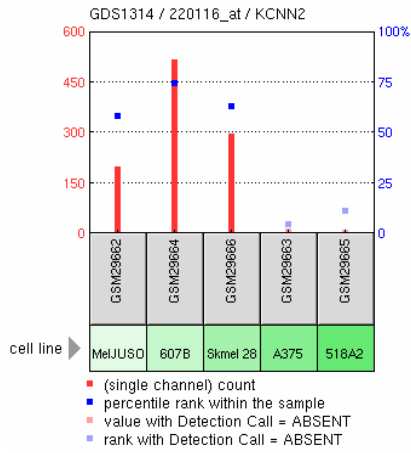


Abbildung 3.32: GDS1314 des Gens KCNN2

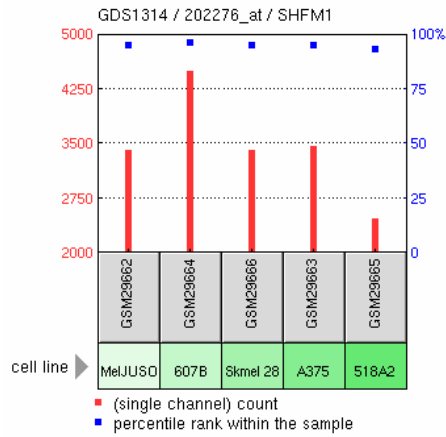


Abbildung 3.33: GDS1314 des Gens SHFM1

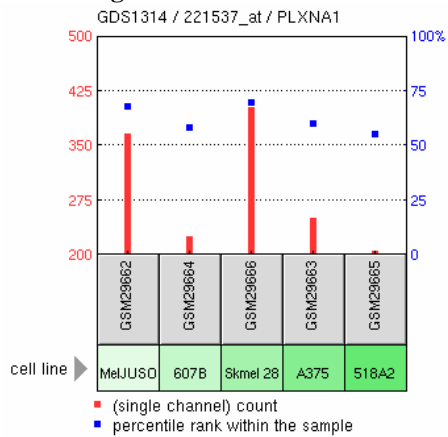


Abbildung 3.34: GDS1314 des Gens PLXNA1: (Sonde 221537_at)

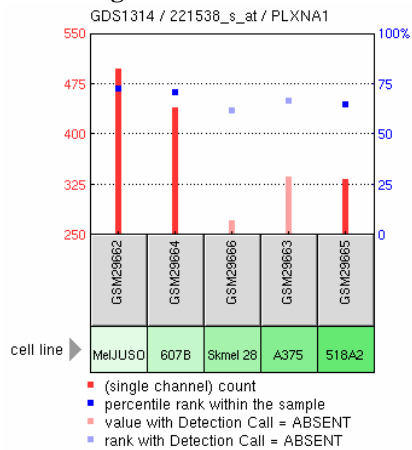


Abbildung 3.35: GDS1314 des Gens PLXNA1: (Sonde 221538_s_at)

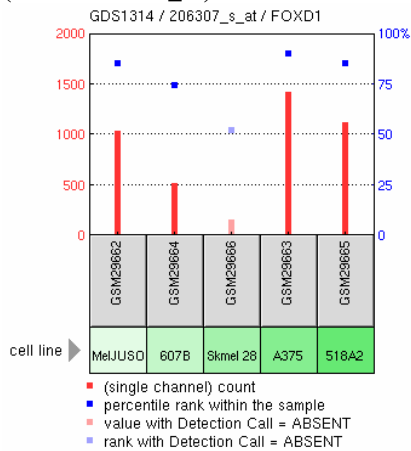


Abbildung 3.36: GDS1314 des Gens FOXD1

GDS1761

Mit der Studie GDS1761 konnte geprüft werden, ob das Gen spezifisch in der Melanomentstehung reguliert wird. Wie bereits beschrieben, zeigen die Diagramme Proben aus 60 Zelllinien der sogenannten NCI60 (*National Cancer Institute, USA*) (Shoemaker, 2006), die aus Tumoren verschiedenster Gewebe und Organe stammen und häufig in der Forschung als Modelle für neoplastische Erkrankungen dienen. Anhand dieser Arrays lässt sich erkennen, ob das jeweilige Gen speziell im Melanom exprimiert wird oder ob es zum Beispiel grundsätzlich in malignen entarteten Geweben hoch- oder herunterreguliert ist.

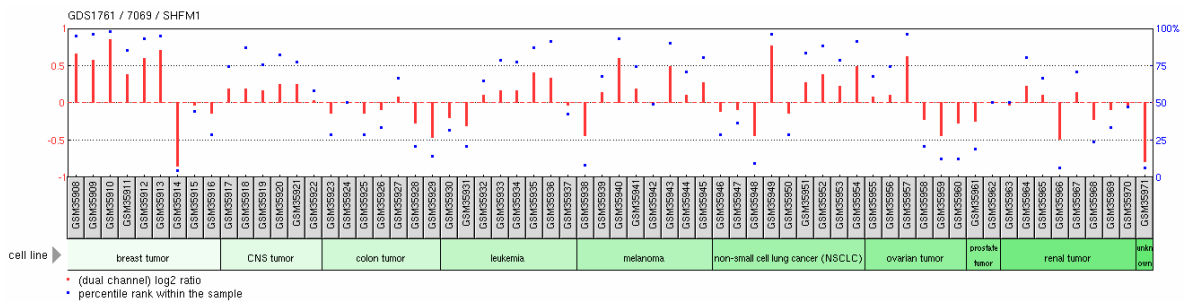


Abbildung 3.37: GDS1761 des Gens SHFM1

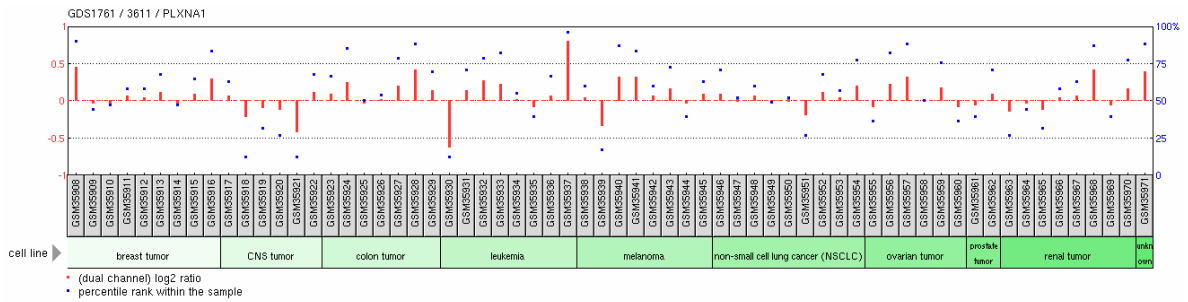


Abbildung 3.38: GDS1781 des Gens PLXNA1

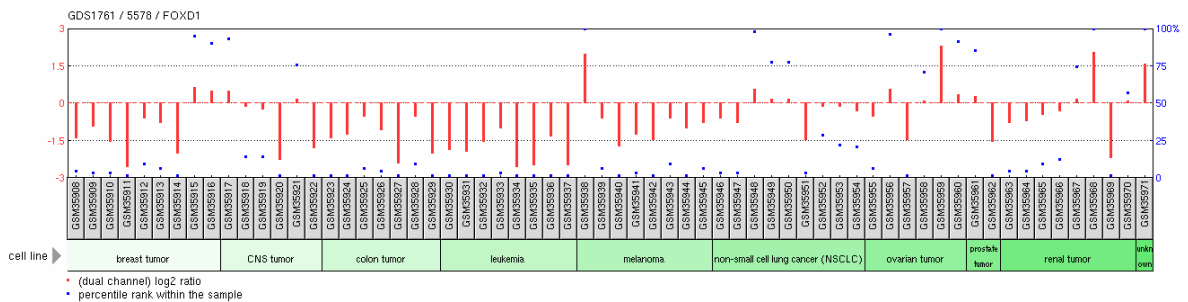


Abbildung 3.39: GDS1761 des Gens FOXD1

3.2 Molekularbiologische Überprüfung der Genexpression ausgewählter Gene

Zunächst erfolgte die Primeretablierung zum Nachweis der Genexpression von KCNN2, SHFM1, PLXNA1 und FOXD1 mittels quantitativer RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) und anschließender Gelelektrophorese. Trotz zahlreicher Läufe mit unterschiedlich eingestellten Denaturierungs-/ Annealing-/ Amplifikations- und Messtemperaturen und der Verwendung mehrerer Primerpaare ließ sich FOXD1 an Melanomzellen nicht etablieren, so dass dieses Gen von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde.

Anschließend wurde per PCR die Konzentration der drei Gene in den Zelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso und Mel Ho (Primärtumor) und in den Zelllinien Sk Mel 28, HTZ 19, Mel Im und Mel Ju von Metastasen gemessen. Als Standard wurde hierbei das „housekeeping gene“ β -Aktin benutzt. Die gemessenen mRNA-Konzentrationen wurden jeweils ins Verhältnis der Konzentration von gesunden Melanozyten, einer NHEM-Probe (normale humane epidermale Melanozyten) gesetzt. Es wurden für jedes Gen zwei Läufe durchgeführt.

Im Folgenden wird zunächst ein Diagramm der Mittelwerte der *Light-Cycler*-Läufe gezeigt. Bei den Läufen mit Proben von Zelllinien wurde hierbei die Probe NHEM P6 gleich 1 gesetzt und die Expressionsstärken der mRNA der anderen Zelllinien dazu ins Verhältnis gesetzt. Nach diesen Diagrammen folgt jeweils ein weiteres Diagramm, in dem die drei Proben der normalen humanen epidermalen Melanozyten, die vier Proben von Zelllinien des Melanom-Primärtumors und vier Proben von Zelllinien von Melanom-Metastasen zusammengefasst und Signifikanzen berechnet wurden. Die hierbei getroffene Veranschaulichung mittels Sternchen (*) entspricht der oben aufgeführten. Folgende Kennzeichnung wurde getroffen: a) NHEM vs. Primärtumor; b) NHEM vs. Metastase; c) Primärtumor vs. Metastase. Bei den Gewebeproben wurden die verschiedenen Werte in Relation zu einer Probe aus normaler Haut (Probe Nr. 30) gesetzt.

Ergebnisse der Läufe der *Light-Cycler*-PCR:

Das folgende Diagramm (Abbildung 3.40.1) zeigt die durchschnittliche mRNA-Expressionsstärke des Gens KCNN2 in den Zelllinien im Bezug auf NHEM P6. Die NHEM P7-Linie wurde aufgrund zu niedriger Werte aus der Berechnung weggelassen.

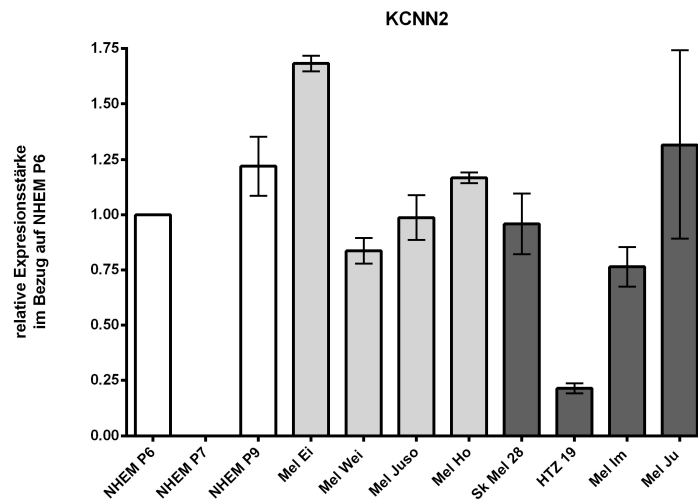


Abbildung 3.40.1: Expression des Gens KCNN2 in Zelllinien (ermittelt durch qRT-PCR): Mittelwerte und Standardabweichung

Das folgende Diagramm (Abbildung 3.40.2) fasst jeweils die drei Proben der normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM P6, P7 und P9), die vier Proben von Zelllinien des Melanom-Primärtumors (Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso und Mel Ho) und vier Proben von Zelllinien von Melanom-Metastasen (Sk Mel 28, HTZ 19, Mel Im, Mel Ju) zusammen. Dadurch lässt sich deutlicher erkennen, ob das Gen spezifisch zwischen normalen Melanozyten, Primärtumor oder Metastasen reguliert wird. Wie aus dem Diagramm hervorgeht, wird KCNN2 im Primärtumor im Vergleich zu normalen Melanozyten nur minimal stärker exprimiert ($p=0,90$). In den Metastasenzelllinien ist die durchschnittliche Expressionsstärke sogar noch niedriger als in den NHEMs. Auch hier ist der Unterschied nicht signifikant ($p=0,10$).

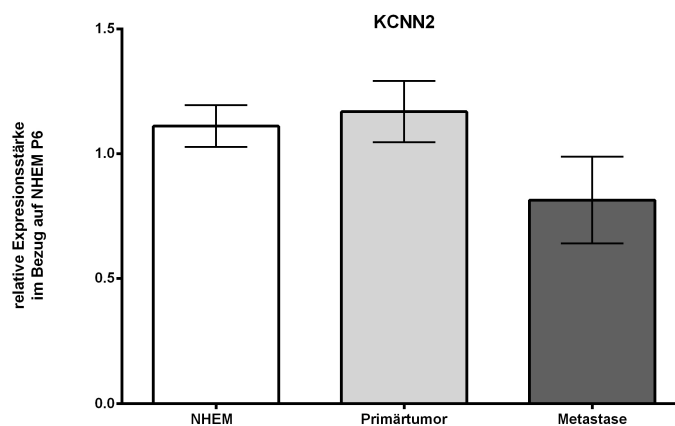


Abbildung 3.40.2: Expression des Gens KCNN2 in Zelllinien (ermittelt durch qRT-PCR): Zusammenfassung zu NHEM, Primärtumor und Metastasen: Mittelwerte und Standardabweichung

Die Abbildung 3.41.1 zeigt die durchschnittliche mRNA-Expressionsstärke des Gens SHFM1 in den Zelllinien NHEM P9, Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso, Mel Ho, Sk Mel 28, HTZ 19, Mel Im und Mel Ju im Bezug auf die mRNA-Expressionsstärke in NHEM P6. Hier wurden die Werte von NHEM P7 ebenfalls wieder aus der Berechnung ausgeschlossen.

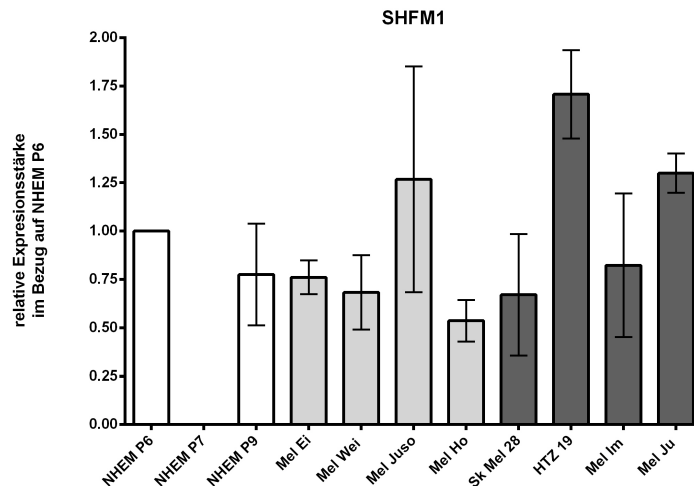


Abbildung 3.41.1: Expression des Gens SHFM1 in Zelllinien (ermittelt durch qRT-PCR): Mittelwerte und Standardabweichung

Auch für diese Läufe des Gens SHFM1 wurden die Mittelwerte der normalen humanen epidermalen Melanozyten, der Zelllinien des Primärtumors und der Metastasenzelllinien zusammengefasst (siehe Abbildung 3.41.2), um eine deutlichere Aussage über die Expression des Gens treffen zu können. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede (p-Wert NHEM vs. Primärtumor $p=0,26$; NHEM vs. Metastase $p=0,43$; Primärtumor vs. Metastase $p=0,23$).

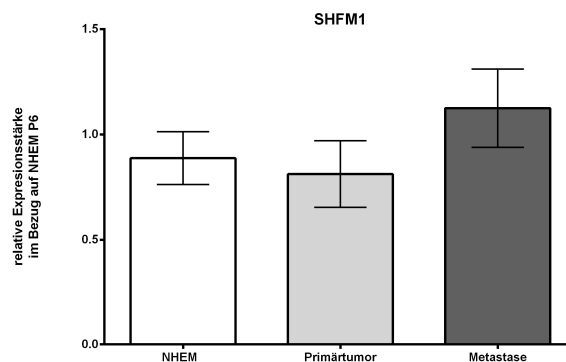


Abbildung 3.41.2: Expression des Gens SHFM1 in Zelllinien (ermittelt durch qRT-PCR): Zusammenfassung zu NHEM, Primärtumor und Metastasen: Mittelwerte und Standardabweichung

Ebenso wie bei KCNN2 und SHFM1 wurde auch bei PLXNA1 die mRNA-Expressionsstärke in den Zelllinien NHEM P7, NHEM P9, Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso, Mel Ho, Sk Mel 28, HTZ 19, Mel Im und Mel Ju im Bezug auf die mRNA-Expression in NHEM P6 gemessen.

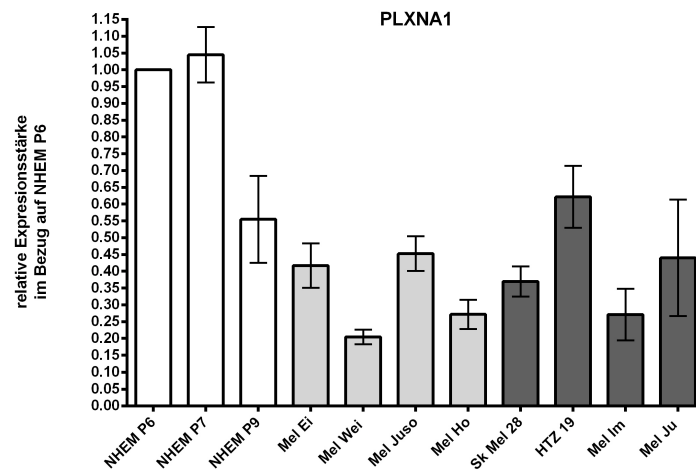


Abbildung 3.42.1: Expression des Gens PLXNA1 in Zelllinien (ermittelt durch qRT-PCR): Mittelwerte und Standardabweichung

Auch für PLXNA1 wurden die einzelnen Zelllinien zusammengefasst (Abbildung 3.42.2). Hierbei zeigt sich eine deutlich ($p=0,003$) höhere Expressionsstärke des Gens in den normalen humanen epidermalen Melanozyten im Vergleich zu den Zelllinien von Primärtumor. Zwischen den NHEM-Proben und den Metastasenzelllinien findet sich ebenfalls ein signifikanter Expressionsunterschied ($p=0,008$).

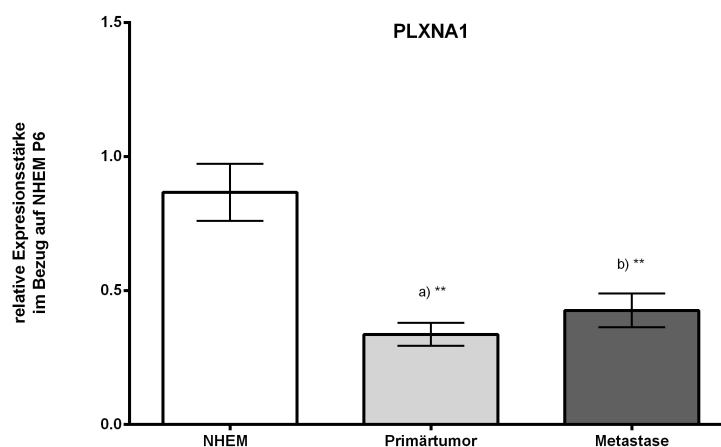


Abbildung 3.42.2: Expression des Gens PLXNA1 in Zelllinien (ermittelt durch qRT-PCR): Zusammenfassung zu NHEM, Primärtumor und Metastasen: Mittelwerte und Standardabweichung

Aufgrund dieser deutlich niedrigeren Expression der mRNA von PLXNA1 in den Zelllinien wurde anschließend die Expression des Gens in 13 Gewebeproben untersucht. Auch hierbei wurden Proben aus normaler Haut mit Proben aus primärem Tumorgewebe und mit Proben aus Metastasen verglichen (siehe Abbildung 3.43.1).

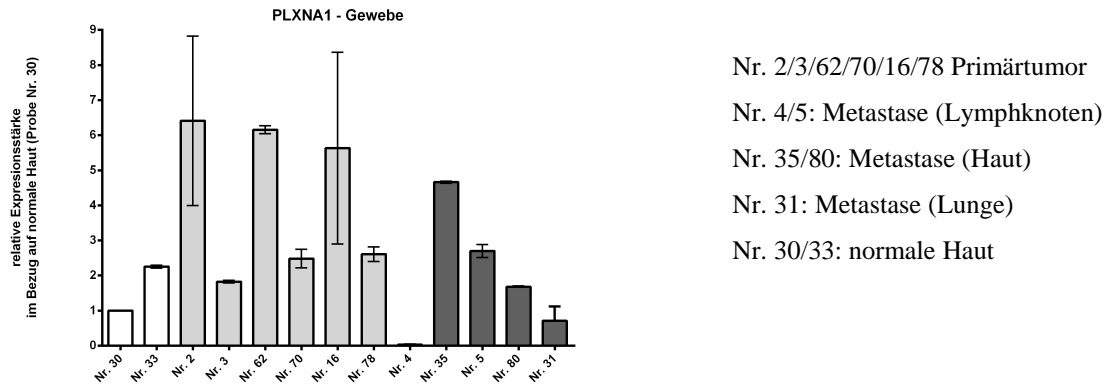


Abbildung 3.43.1: Expression des Gens PLXNA1 im Gewebe (ermittelt durch qRT-PCR): Mittelwerte und Standardabweichung

Im Gegensatz zu den Zelllinien weist PLXNA1 bei den Gewebeproben eine höhere Genexpression in den Proben des Primärtumors auf (siehe Abbildung 3.43.2). Das mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelte Signifikanzniveau zeigt dennoch keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen normaler Haut und Primärtumor ($p=0,158$) oder Metastasen ($p=0,823$) oder zwischen Primärtumor und Metastasen ($p=0,095$).

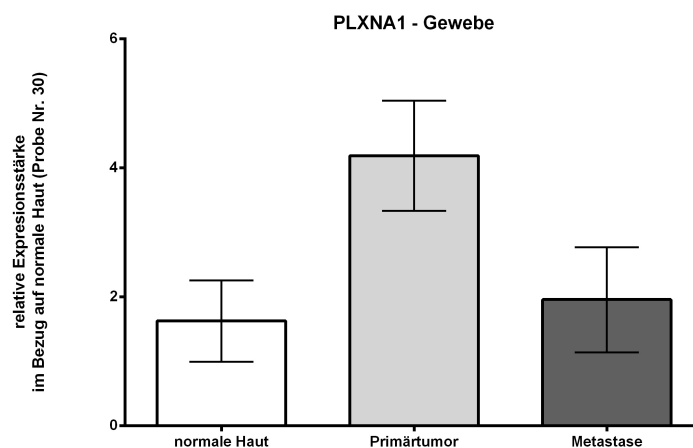


Abbildung 3.43.2: Expression des Gens PLXNA1 im Gewebe (ermittelt durch qRT-PCR): Zusammenfassung zu normaler Haut, Primärtumor und Metastasen: Mittelwerte und Standardabweichung

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.3.1 KCNN2

Dieses Gen ließ aufgrund der Datenlage der Internetdatenbank GEO Profiles auf eine positive Korrelation bei der Entstehung des malignen Melanoms schließen. Bereits in GDS1375 ließ sich eine deutlich höhere Expression des Gens im malignen Melanom als in normaler Haut oder benignen Nävioproben erkennen. Die Studie GDS1505 zeigte eine etwas höhere Expression des Gens in den Proben der normalen Haut, während die Expressionsstärke in den Proben der kultivierten Keratinozyten, kultivierten Fibroblasten und dem sogenannten „*cultured skin substitute*“ im Durchschnitt ähnlich hoch war. Wie bereits erwähnt, spielte diese Studie für KCNN2 jedoch nur eine untergeordnete Rolle, da mit ihr vor allem bei niedrig exprimierten Genen überprüft werden sollte, ob die erhöhte Expression in der Haut in GDS1375 an der Herstellung und den Zellbestandteilen der Proben liegen kann. Aufgrund der verstärkten Expression im Melanom in GDS1375 war diese Überprüfung für KCNN2 daher nicht unbedingt nötig. Das Diagramm der Studie GDS1989 zeigte vor allem in späteren Stadien des Melanomwachstums erhöhte Werte: besonders in den Proben des vertikalen Wachstums, der Metastasierungsphase und in den Lymphknotenmetastasen konnten hohe Expressionsstärken gemessen werden. Die erhöhte Expression ließ sich mit der Studie GDS1965 bestätigen, auch hier fanden sich erhöhte Werte in Proben des malignen Melanoms im Gegensatz zu normalen Melanozyten. Da die Balken der Melanozyten-Expressionsstärke im Internetdiagramm rosafarben sind, somit den Status „*absent*“ tragen und daher in dieser Arbeit außer Acht gelassen wurden, ließ sich keine Signifikanz zwischen Melanom und Melanozyten berechnen. Doch selbst bei Einbeziehung dieser Balken fällt ein deutlicher Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen auf. Im Diagramm der Studie GDS1314 zeigte sich eine Expression des Gens in den Zelllinien Mel Juso, 607B und Sk Mel 28. Diese Studie war kein Ausschlusskriterium, aber es konnte überprüft werden, ob das Gen in diesen Zelllinien exprimiert wird.

Die Studienlage wies das Gen KCNN2 als ein im Melanom höher exprimiertes Gen aus. Diese erhöhte Expression konnte mithilfe molekularbiologischer Methoden in der anschließenden Laboruntersuchung jedoch nicht grundsätzlich bestätigt werden. Die durchschnittlichen mRNA-Expressionswerte von Primärtumor- und Metastasenzelli-

nien unterschieden sich nicht signifikant von den NHEM-Linien. Allerdings konnte bei einigen Zelllinien für sich genommen durchaus ein signifikanter Unterschied gefunden werden. Die Primärtumorzelllinie Mel Ei zum Beispiel hat einen Expressionswert von 1,682, während die Metastasenzelllinie HTZ19 nur eine Expression von 0,215 in Relation zu der NHEM P6-Linie aufweist. Möglicherweise wird das Gen also nur in bestimmten Zelllinien spezifisch reguliert. Für diese Überlegungen lässt sich die Studie GDS1314 heranziehen. Wie bereits beschrieben, wurde in diesem Arrayexperiment die Expression von KCNN2 in fünf Zelllinien gemessen. Zwei der fünf Zelllinien, Mel Juso und Sk Mel 28, wurden auch bei der eigenen Überprüfung im Labor mittels RT-PCR verwendet. Im Diagramm dieser Studie konnte eine Expression des Gens in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Bei den eigenen Untersuchungen mittels PCR fand sich ebenfalls eine Genexpression in diesen beiden Zelllinien, allerdings war diese Expression mit Werten von 0,99 bzw. 0,96 relativ zur NHEM P6-Expression nicht deutlich von dieser verschieden.

3.3.2 SHFM1

In der Studie GDS1375 zeigte sich auch für SHFM1 eine signifikant höhere Expression des Gens im malignen Melanom als in normaler Haut und benignen Nävi. Das Gen wurde also für die weitere Analyse als im Melanom höher exprimiert betrachtet. Daher war auch für SHFM1 die Untersuchung mittels GDS1505 und GDS2081 von untergeordneter Bedeutung. In beiden Diagrammen zeigten sich außerdem keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Proben. Im Diagramm der Studie GDS1989 ließ sich bereits in den Zellkulturproben eine deutlich erhöhte Expression im metastasierten Melanom im Vergleich zu Melanozyten- und Keratinozytenkultur erkennen. In den Gewebeproben, die die verschiedenen Progressionsstufen von normaler Haut über benignen und atypischen Nävus, *Melanoma in situ*, Melanom in vertikaler und metastatischer Wachstumsphase bis hin zu Lymphknotenmetastasen widerspiegeln, fand sich eine Tendenz zu höheren Werten im Laufe der Tumورprogression. Allerdings ist dies kein kontinuierlicher Anstieg der Expression, sondern es finden sich dazwischen auch immer wieder kleinere Gruppen mit niedrigeren Expressionswerten, zum Beispiel bei den beiden Proben aus der Metastasierungsphase des Melanoms. Obwohl die Studie GDS1375 eine signifikant höhere Expression im Melanom zeigte und auch GDS1989

auf eine höhere Expression von SHFM1 im Verlauf der Tumorprogression hinwies, ließ sich mittels GDS1965 kein deutlicher Unterschied zwischen Melanozyten- und Melanomzelllinien feststellen ($p=0,64$). In GDS1314 ließ sich jedoch in allen fünf untersuchten Melanomzelllinien eine starke Expression von SHFM1 nachweisen. In der letzten analysierten Studie, GDS1761, werden verschiedene Tumorentitäten miteinander verglichen. Hierbei fanden sich im Melanom sowie in einigen anderen Tumoren positive Expressionswerte. Die höchste Expression zeigte sich in den Brustkrebszelllinien. Wie weiter unten beschrieben, ist bereits eine Assoziation der erhöhten SHFM1-Expression mit dem Auftreten des Mamma-Carcinoms bekannt.

Mit Ausnahme der Studie GDS1965 fanden sich in allen analysierten Studien deutliche Hinweise auf eine erhöhte Expression des Gens SHFM1 im Melanom. Dies ließ sich in der folgenden molekularbiologischen Untersuchung allerdings nicht bestätigen. Es zeigte sich zwar eine geringfügig höhere Expression in den Metastasen als in Primärtumor und normalen Melanozyten; dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

3.3.3 PLXNA1

Ebenso wie bei KCNN2 und SHFM1 zeigte sich auch bei PLXNA1 aufgrund der Interdaten von GEO Profiles eine höhere Genexpression im Melanom. In der ersten Studie GDS1375 fand sich bereits eine signifikant höhere Expression des Gens in den Zelllinien des malignen Melanoms im Gegensatz zu den Zelllinien von normaler Haut und von benignen Nävi. In GDS1505 zeigte sich tendenziell eine etwas höhere Genexpression des Gens in den Proben der kultivierten Keratinozyten. Wie schon bei den beiden anderen Genen spielte die Analyse dieser Studie jedoch eine untergeordnete Rolle, da das Gen gemäß GDS1375 in der Haut niedriger exprimiert wird als im malignen Melanom. Für GDS1989 ließen sich zwei Experimente mit verschiedenen Sonden finden: Das erste Diagramm zeigte eine erhöhte Genexpression vor allem in der Probe der epidermalen Melanozytenzellkultur und in der Probe der Zellen eines metastasierten Melanoms. Während sich in den Biopsieproben eines benignen und eines atypischen Nävus eine geringe Expressionsstärke fand, stieg diese in Proben aus Biopsien des vertikal wachsenden Melanoms und des metastasierenden Melanoms auf zum Teil das Doppelte an. Das zweite vorhandene Diagramm der Studie GDS1989 konnte dies bestätigen. Auch hier zeigten sich deutlich erhöhte Werte der Genexpression in Biopsiepro-

ben aus vertikal wachsendem und metastasierendem Melanom im Vergleich zu benignen und atypischen Nävusproben. Allerdings fiel die Genexpression im Verlauf der Tumorprogression danach auch wieder ab. Auch für die Studie GDS1965 fanden sich aufgrund von zwei verwendeten Sonden zwei Diagramme: Das erste Diagramm der Studie GDS1965 wies für das Gen PLXNA1 in drei von sechs Proben des Melanoms höhere Expressionswerte als in den normalen Melanozyten auf. Im zweiten Diagramm ließ sich das in zwei Proben erkennen. Die statistische Auswertung ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede bei den Mittelwerten der beiden Gruppen. Für die Studie GDS1314 fanden sich erneut zwei Diagramme in der Datenbank. In den fünf dort analysierten Zelllinien war PLXNA1 in allen bzw. in drei Zelllinien exprimiert. In der Studie GDS1761 sieht man die Genexpression in zehn verschiedenen Tumorentitäten. Hierbei zeigten sich für das Gen PLXNA1 erhöhte Expressionswerte in Zelllinien aus Brustkrebs, Kolontumoren, Leukämie, Melanom, Ovarial- und Nierentumor. Allerdings waren bei diesen Tumoren nie alle untersuchten Zelllinien betroffen.

Aufgrund dieser Studien wurde das Gen PLXNA1 als ein im Melanom höher exprimiertes Gen betrachtet. Die Untersuchung mithilfe molekularbiologischer Methoden im Labor konnte diese erhöhte Expression jedoch nicht bestätigen. In beiden *LightCycler*-Läufen zeigte sich sowohl in den Zelllinien des Primärtumors als auch in den Zelllinien der Metastasen eine im Vergleich zu NHEM (normale humane epidermale Melanozyten) signifikant erniedrigte Expressionsstärke. Diese Daten lassen also im Gegensatz zu der Datenbankanalyse eher auf eine negative Korrelation des Gens bei der Melanomentstehung schließen. Um diese These zu überprüfen wurden anschließend Gewebeproben auf ihren Gehalt an mRNA mithilfe der PCR untersucht. Hierbei wurde erneut der Wert der normalen Haut gleich 1 gesetzt. Es zeigten sich - mit einer Ausnahme in einer Lymphknotenmetastase - jedoch erhöhte Werte. Zusammenfassend fanden sich in den Gewebeproben signifikant höhere Werte im Primärtumor als in den Metastasen und in normaler Haut, wohingegen es kaum einen Expressionsunterschied zwischen Haut und Metastasen gab.

4 Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden anhand der Internetdatenbank GEO Profiles des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Gene gesucht, die eine Korrelation mit der Melanomentstehung oder -progression aufweisen. Wie bereits geschildert, wurden hierfür sieben Studien dieser Online-Datenbank des NCBI im Hinblick auf eine Assoziation mit der Melanompathogenese untersucht. Von den Genen, die anhand der Analyse der Datenbank als im Melanom reguliert gefunden wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Gene KCNN2, SHFM1 und PLXNA1 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Für alle drei Gene war bislang noch keine spezifische Regulation im Melanom bekannt.

Anschließend wurde experimentell untersucht, ob der gefundene Zusammenhang für diese drei Gene nachgewiesen oder widerlegt werden kann. Hierfür wurde die Expressionsstärke der Gene in Melanozyten, primären Melanomzellen, metastasierten Melanomzellen und z.T. in Gewebeproben mittels quantitativer *real-time* PCR gemessen.

In einem letzten Punkt soll kurz auf die Herangehensweise dieser Arbeit eingegangen werden. Hierbei geht es darum, ob die gewählte Methode zulässt, anhand der veröffentlichten Daten auf eine Korrelation der Gene mit der Melanomentstehung zu schließen und ob eine solche Datenbank ein valider Ausgangspunkt für derartige Fragestellungen sein kann.

4.1 KCNN2 (*potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2*)

4.1.1 Allgemeine Funktionen von KCNN2

Das Gen KCNN2 (*potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2*) kodiert für den gleichnamigen Calcium-abhängigen K⁺-Kanal, auch bekannt als SK2. Weitere Namen des Gens sind hSK2, SKCA2 und Kca2.2. Es ist ein Mitglied der sogenannten KCNN-Genfamilie der Kaliumkanal-Gene,

der neben diesem *small-conductance calcium activated channel*, auch der *intermediate*- (IK) und *large-conductance* (BK)-Typus angehören (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Durch das auf dem langen Arm des Chromosoms 5 gelegene Gen KCNN2 wird ein Protein kodiert, das eine Rolle bei der Signalübertragung in Neuronen spielt. Hierbei folgt auf ein Aktionspotential eine Nachhyperpolarisation, die für einige Sekunden anhalten und grundlegende Folgen für die Signalübertragung der Nervenzelle haben kann. Jede Komponente der Nachhyperpolarisation wird durch verschiedene Kaliumkanäle, die durch Calcium aktiviert werden, vermittelt. Das SK2-Protein ist ein integrales Membranprotein, das mit drei anderen Untereinheiten einen spannungsabhängigen und durch Calcium aktivierbaren Kanal formt. Es wird vor der Membranhyperpolarisation aktiviert und reguliert wahrscheinlich die neuronale Erregbarkeit, indem es an der lang-samen Komponente der Nachhyperpolarisation mitwirkt (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.1.2 Rolle von KCNN2 in Melanomzellen unter hypoxischen Bedingungen

Die Analyse der Online-Datenbank GEO Profiles zeigte für KCNN2 eine deutlich gesteigerte Expression im Melanom im Gegensatz zu normalen Melanozyten. In den eigenen experimentellen Untersuchungen dagegen zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Melanom- und Melanozytenzelllinien. Daher ist es interessant zu wissen, was andere Forschungsgruppen über das Gen im Zusammenhang mit dem malignen Melanom bereits herausfanden.

Tajima et al. untersuchten die Rolle der Calcium-abhängigen Kaliumkanäle in Melanomzellen unter hypoxischen Bedingungen (Tajima et al., 2006). Als Folge eines unzureichenden und unkontrollierten Wachstums von Blutgefäßen entwickeln viele Tumore eine hypoxische Umgebung. Diese sauerstoffarmen Regionen gehen in der Regel mit einer schlechteren Prognose und verminderten Überlebensraten einher. Durch verschiedene Mechanismen wird die Malignität durch Hypoxie erhöht. Zum einen wird die Expression von angiogenetischen Zytokinen gefördert. Außerdem kommt es zu einer Selektion von Tumorzellen mit verminderter Sensitivität auf Radio- und Chemotherapie. Zusätzlich kommt es zu einer Steigerung von Migration und Metastasierungsbereitschaft (Brizel et al., 1996). Reguliert werden diese Prozesse vor allem durch die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF). Diese sind heterodimere Komplexe mit einer Sauerstoff-sensitiven α -Protein-Untereinheit und einer stabilen β -Untereinheit. Unter Hypo-

xie kommt es zu einer verstärkten Expression von HIF-1 α . Diese Überexpression führt über eine Erhöhung des VEGF zu verstärkter Angiogenese und trägt damit zur Tumorphogenese bei (Ohh et al., 2000). Dass es im Melanom zu einer solchen durch HIF-1 α induzierten Angiogenese kommen kann, wurde in Melanomzelllinien bereits bestätigt (Iervolino et al., 2002; Trisciuoglio et al., 2010).

In Tumorzellen kontrollieren Kaliumkanäle das Ruhemembranpotential. Durch die Öffnung dieser Kanäle kommt es zur Membran-Hyperpolarisation, die für Zellen nötig ist, um von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus zu gelangen. Durch eine Blockade der Kaliumkanäle kommt es über eine Membran-Depolarisation zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase. Tajima et al. konnten in IGR1-Zelllinien, die als Model für das hochmaligne Melanom gelten, nachweisen, dass durch hypoxische Bedingungen diese Calcium-abhängigen Kaliumkanäle hochreguliert werden und die Zellproliferation gesteigert wird. Die mittleren Kaliumströme waren unter hypoxischen Bedingungen um das 2- bis 3-fache höher als bei Zellen unter normoxischen Bedingungen. Auch die Zellgröße stieg in der sauerstoffarmen Umgebung signifikant um 20-30 % (Tajima et al., 2006).

Auch Allen et al. untersuchten die Rolle von KCNN2 unter hypoxischen Bedingungen. Hierbei wurde die Rolle der *small-conductance* Kaliumkanäle in hippocampalen Neuronen näher betrachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte SK2-Kanal-Aktivität protektiv auf Neurone wirkt, denen eine transiente globale Ischämie zum Beispiel nach einer kardiopulmonalen Reanimation nach plötzlichem Herzstillstand vorausging. Durch pharmakologischen Erhalt der Kaliumkanäle konnte diese neuroprotektive Wirkung verlängert werden (Allen et al., 2011).

Sowohl Tajima als auch Allen fanden eine Erhöhung der SK2-Kanäle unter hypoxischen Bedingungen. Diese Hochregulation der Kanäle sorgte in beiden Fällen für eine Protektion der Zellen in der hypoxischen Umgebung. Während Tajima et al. dies in Melanomzelllinien untersuchten, maßen Allen et al. die KCNN2-Genexpression in Neuronen. Daher stellt sich die Frage, inwiefern sich die beiden Ergebnisse miteinander vergleichen lassen und ob es einen möglichen Zusammenhang gibt. Sowohl Melanomzellen als auch Neurone sind embryonalgeschichtlich neuroektodermalen Ursprungs. Es

wäre also denkbar, dass die Genexpression aufgrund der gleichen embryonalgeschichtlichen Abstammung der Zellen ähnlich ist.

Interessant ist außerdem, dass die von Allen et al. untersuchten hippocampalen Neurone neben NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) in der synaptischen Membran liegen (Allen et al., 2011). Die NMDA-Rezeptoren sind Rezeptoren für den Neurotransmitter Glutamat, der eine wichtige Rolle im ZNS spielt. Jedoch konnte für Glutamat auch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und Homöostase der Haut über NMDA-Rezeptoren in der Epidermis nachgewiesen werden. Verschiedene Subgruppen der NMDA-Rezeptoren werden außerdem verstärkt in Melanozyten exprimiert. Diese Signalvermittlung mittels Glutamat befähigt die Melanozyten zu Differenzierung und Proliferation (Hoogduijn et al., 2006).

Wie bereits erwähnt, findet sich bei Melanomen häufig ein sauerstoffarmes Umfeld, das die Malignität des Tumors erhöht. Die beiden Publikationen legen also zusammenfassend nahe, dass aufgrund des Sauerstoffmangels in der Umgebung von Melanomen die Anzahl der SK2-Kanäle erhöht wird. Diese verstärkte KCNN2-Genexpression wäre damit mit den analysierten Studien der Datenbank GEO Profiles zu vereinbaren, da sich hierbei auch eine Erhöhung der KCNN2-Genexpression fand.

Bei den eigenen Untersuchungen mittels qRT-PCR wurde die KCNN2-Genexpression unter normoxischen Bedingungen gemessen. Hierbei fand sich wie bereits geschildert keine verstärkte Expression im Bezug auf die NHEM-Linien. In weiteren Untersuchungen könnte jedoch überprüft werden, ob es unter hypoxischen Bedingungen zu einer verstärkten Expression kommt. Die beiden oben zitierten Publikationen schildern bereits, dass der Sauerstoffmangel zu einer gesteigerten Anzahl der SK2-Kanäle führte. Die Array-Experimente der Datenbank GEO Profiles wurden zwar nicht explizit unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt, aber bei Gewebeproben besteht dennoch die Möglichkeit, dass diese aufgrund der zum Teil langen Dauer zwischen Gewebeentnahme und Bearbeitung im Labor hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind. Daher lässt sich durchaus vermuten, dass die Melanompathogenese durch Hypoxie vorangetrieben wird. Es ist außerdem denkbar, dass die Malignität gesteigert wird, da ja beschrieben wurde, dass die Zellproliferation unter hypoxischen Bedingungen gesteigert ist. Damit wäre das Potential zu verstärktem Tumorwachstum und der Entstehung von Metastasen gegeben.

4.2 SHFM1 (*split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1*)

4.2.1 Allgemeine Funktionen von SHFM1

Das Gen SHFM1 (*split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1*) ist auch unter den Namen DSS1, ECD, SEM1, SHFD1, SHSF1 und Shfdg1 bekannt und liegt auf Chromosom 7. Ursprünglich wurde es vor allem als mögliches Gen bei der Entstehung der autosomal-dominanten Form der so genannten Spalthand-Spaltfuß-Malformation gesehen. Die auch als Ektrodaktylie bezeichnete Krankheit kommt in den USA mit einer Häufigkeit von 1:8000 bis 1:25000 vor und wird autosomal-dominant vererbt (Zlotogora, 1994). Neben fehlenden oder miteinander verwachsenen Fingern oder Zehen kommen auch urogenitale, kraniofaziale oder die Haut betreffende Fehlbildungen vor.

Das Protein ist bei vielen zellulären Prozessen beteiligt, darunter zum Beispiel bei Zellentwicklung, Differenzierung, DNA-Reparatur, homologer Rekombination, der Stabilität des Genoms, bei Proliferation, Transformation und dem Proteinabbau (Wei et al., 2008).

4.2.2 Mögliche Induktion der Melanogenese durch Interaktion von SHFM1 mit p53

Das Gen SHFM1 wurde als stabilisierende Komponente des 26S-Proteasoms identifiziert, wo es bei der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse eine Rolle spielt. Durch das Proteasom werden über den kontrollierten Abbau von Zellzyklus-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressorproteinen, Onko- und Membranproteinen zelluläre Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Transformation reguliert. Das aus zwei Untereinheiten (19S RP und 20S CP) bestehende 26S-Proteasom spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Anzahl vieler Proteine, indem es diese Ubiquitin-abhängig abbaut (Hershko et al., 1998).

Wei und Kollegen konnten zeigen, dass SHFM1 über eine bestimmte Untereinheit des 19S RP an das Proteasom bindet. Dieser Komplex aus SHFM1 und Proteasom bindet an p53 für den Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Ausschaltung des endogenen SHFM1 mithilfe von siRNA zu einem Anstieg des Tumorsuppressors p53 führt. Andererseits führte die Überexpression des SHFM1-

Proteins auch zu einer signifikanten Erhöhung des Ubiquitin-vermittelten p53-Protein-Abbaus (Wei et al., 2008).

Das Tumorsuppressorgen p53 wird häufig als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es als Transkriptionsfaktor DNA-Reparaturmechanismen einleitet sowie Zellen durch Hemmung des Zellzyklus an der unkontrollierten Proliferation hindern kann (Stiewe, 2007). Während in den meisten Fällen *Missense*-Mutationen des Gens zur Tumorbildung führen, findet man im malignen Melanom nur in unter zehn Prozent Mutationen des Gens. Meist liegt p53 im Melanom als Wildtyp-Gen vor. Stattdessen findet man hier häufiger eine Expressionsminderung des Gens (Box et al., 2008). Dies passt auch zu den von Wei et al. gefundenen Ergebnissen, dass die Expression von p53 im Melanom vermindert ist. Kommt es also durch eine Überexpression des SHFM1-Gens zu einem verstärkten p53-Abbau, hat dies zur Folge, dass weder ein Anhalten des Zellzyklus zur DNA-Reparatur noch die geregelte Apoptose möglich sind. Da die Zellen sich dann ungehindert teilen können, kann es so zur Tumorbildung kommen. Für einige Tumorentitäten ist bereits bekannt, dass sie durch Schäden oder verringerte Expression des p53-Gens entstehen. Es ist also möglich, dass es durch die SHFM1-Überexpression zu einem verstärkten p53-Abbau kommt. Im Rahmen der Analyse der Internetdatenbank fand sich eine verstärkte SHFM1-Expression bei der Melanomentstehung und Melanomprogression. Bei einem daraus resultierenden Mangel an p53 wären eine geregelte Apoptose sowie ein geregelter Zellzyklus nicht mehr adäquat möglich. Als Folge dessen könnte es zu einer Induktion der Melanomentstehung oder -progression kommen.

4.2.3 Schwächung der Reparaturmechanismen der Zellen durch Mangel an SHFM1

Eine weitere wichtige Rolle des Gens SHFM1 zeigte sich im Bezug auf BRCA2, das eine wichtige Rolle bei familiär bedingtem Brustkrebs spielt. BRCA2 ist ein Tumorsuppressorgen, das bei einem hohen Anteil der familiären Mammakarzinome mutiert ist. Die Tumor-supprimierende Aktivität des BRCA2-Proteins kommt wahrscheinlich durch seine Rolle bei der homologen rekombinanten Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zustande. Außerdem ist es beteiligt an Prozessen, die für die Stabilität des Genoms wichtig sind, wie z.B. die Kontrolle des Zellzyklus (Li et al., 2006). SHFM1 bindet eng an die sogenannte BRCA2-DNA/DSS1-Bindedomäne

(BRCA2-DBD), die aus fünf strukturell verschiedenen Domänen besteht (Kristensen et al., 2010).

Bislang bekannt war, dass die Depletion von SHFM1 in Mäusestammzellen mittels RNA-Interferenz gehäuft mit Chromosomenbrüchen assoziiert ist und sowohl in diesen Stammzellen als auch in Brustkrebszellen das Zellwachstum stark beeinträchtigt ist. Daher ließ sich folgern, dass SHFM1 nötig für die rekombinante Reparatur durch das BRCA2-Protein ist (Gudmundsdottir et al., 2004). Kristensen et al. konnten in ihrer Arbeit die Effekte von fehlendem SHFM1 auf die Reparaturmechanismen in humanen Zellen messen. Die Forschungsgruppe konnte zeigen, dass die Depletion von SHFM1 durch RNA-Interferenz die Reparaturmechanismen in humanen Zellen stark schwächt.

Wie genau SHFM1 zur Tumor-supprimierenden Aktivität von BRCA2 beiträgt, ist weiterhin nicht sicher geklärt. Es ist möglich, dass SHFM1 BRCA2 stabilisiert und dessen Abbau verhindert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass bei einem Schritt der durch BRCA2 vermittelten homologen rekombinanten Reparatur Proteasome nötig sind, bei deren Rekrutierung SHFM1 hilft (siehe auch 4.2.2). Als dritte Möglichkeit führten Kristensen et al. an, dass SHFM1 benötigt wird, um den BRCA2-RAD51-Komplex zu aktivieren oder zu regulieren (Kristensen et al., 2010).

Diese Ergebnisse lassen sich allerdings nicht mit den durch die Internetanalyse gewonnenen Ergebnissen vereinbaren. Zwar ist in beiden Fällen eine Expressionsänderung von SHFM1 mit dem Tumorwachstum assoziiert. Während bei den von Kristensen et al. veröffentlichten Daten allerdings ein Mangel des SHFM1-Proteins zur Tumorphathogenese beitrug, ließen die anhand GEO Profiles gewonnenen Ergebnisse eher an eine notwendige stärkere Expression bei der Tumorentstehung denken. Dies kann natürlich daran liegen, dass die Genexpression in verschiedenen Zellarten gemessen wurde. Gudmundsdottir et al. untersuchten die Reparaturmechanismen in Bezug auf SHFM1 in Stammzellen und Brustkrebszellen. Kristensen et al. maßen die SHFM1-Expression in einer humanen Fibrosarkom-Zelllinie. Die analysierten Datenbankarrays beruhten hingegen auf Melanomgewebeproben oder Melanomzelllinien. Für eine mögliche Beteiligung des BRCA2-Gens bei der Entstehung von Melanomen gibt es jedoch einige Hinweise. Easton et al. fanden in einer groß angelegten Studie unter Familien mit einer BRCA2-Mutation auch ein statistisch erhöhtes Risiko für das kutane maligne Melanom (Easton et al., 1999). Besonders beim Aderhautmelanom scheint BRCA2 eine wichtige

Rolle zu spielen. In einer Studie zu Zweitkarzinomen bei Aderhautmelanom-Patienten fand sich bei über 20 % der Patienten ein Mammakarzinom, das wiederum stark mit einer BRCA2-Mutation assoziiert ist (Cruz et al., 2011).

4.2.4 Veränderungen der Kontaktinhibition in epidermalen Zellen durch SHFM1

Wei et al. untersuchten den Einfluss des Gens SHFM1 in der frühen Karzinogenese von Hauttumoren bei Mäusen (Wei et al., 2003). Die Mäuse entwickelten Hyperplasien in Keratinozyten nach Exposition mit dem Tumorpromotor TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), die sich zu benignen Papillomen oder malignen Tumoren wie Spindelzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen weiterentwickelten. Nach der TPA-Exposition wurden neun Gene isoliert, die durch die TPA-Behandlung in der Haut dieser Mäuse verstärkt exprimiert wurden. Unter diesen Genen befand sich auch SHFM1, das von der Forschergruppe anschließend genauer untersucht wurde. Das Gen wurde nach der TPA-Exposition 3,5-fach verstärkt in der hyperplastischen Haut exprimiert. Die RNA-Transkription war in TPA-vermittelten Papillomen etwa 2,5-fach und in malignen Tumoren wie Spindelzelltumoren und Plattenepithelkarzinomen bis zu 7,5-fach im Vergleich zu normaler Haut erhöht. Durch die SHFM1-Überexpression wurde die neoplastische Transformation in präneoplastischen epidermalen Zellen gesteigert. Dies wird durch SHFM1-vermittelte Veränderungen der normalen Kontaktinhibition in epidermalen Zelllinien bewirkt. Außerdem kam es zu schnelleren Wachstumsraten der Zellen, in denen SHFM1 verstärkt exprimiert wurde. Zusammenfassend konnten Wei und Kollegen zeigen, dass das Gen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der TPA-induzierten Hautkarzinogenese und bei der zellulären Transformation von Keratinozyten-Progenitorzellen spielt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die verstärkte Expression von SHFM1 in präneoplastischen epidermalen Zellen das Zellwachstum fördert und den Prozess der neoplastischen Transformation steigert. Daraus lässt sich schließen, dass das Gen möglicherweise ein wichtiger Bestandteil bei der Entstehung von Hauttumoren ist (Wei et al., 2003).

TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), auch als PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) bekannt, ist ein häufig verwendetes Molekül, das die Proteinkinase C aktiviert. Es ist ein sehr potenter Tumorpromotor, z.B. bei der Hautkarzinogenese in Maus-Modellen und wird daher in der Forschung sehr häufig eingesetzt (Fürstenberger et al.,

1981). Die von Wei et al. beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass durch TPA die SHFM1-Expression deutlich anstieg und benigne Papillome, Spindelzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome entstanden. Hierbei wurde durch TPA das Zellwachstum gefördert und die Transformation der Zellen gesteigert. Auch für die Induktion der Melanomentstehung wird TPA verwendet. Es ist also denkbar, dass durch TPA in Melanozyten ähnliche Vorgänge wie in den von Wei et al. untersuchten Zellen induziert werden. Möglicherweise löst TPA auch in Melanozyten eine verstärkte SHFM1-Expression aus. Dies würde zur Analyse der *Affymetrix-Arrays* von GEO Profiles passen. Auch hier fand sich eine verstärkte Expression von SHFM1 in den Tumorzellen. Folglich könnte es auch hier zu Veränderungen in der Kontaktinhibition der Zellen, damit einhergehender Transformation der Zellen und so zur Tumorentstehung kommen.

4.2.5 Chromosomale Instabilität durch Ausschalten von SHFM1

Neben dem malignen Melanom gibt es weitere Arten von Hautkrebs, unter denen das Plattenepithelkarzinom der Haut als zweithäufigster Tumor eine große Rolle einnimmt. Das Risiko, an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken, wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, unter anderem durch Exposition bezüglich bestimmter Karzinogene, kumulative UV-Strahlung, geographische Lokalisation, Häufigkeit innerhalb der Familie, virale Infektionen, Immunsuppression und genetische Faktoren.

Venza et al. untersuchten Genmutationen, die im Plattenepithelkarzinom der Haut und dessen Vorläuferläsionen häufig vorkamen. Unter diesen Mutationen sind zum Beispiel das als Tumorsuppressorgen bekannte p53 und auch SHFM1. Mutationen von p53 verursachen eine Instabilität des Genoms. Das Ausschalten des SHFM1-Proteins führte zu chromosomaler Instabilität. Dies wurde wahrscheinlich durch die nicht mehr richtig stattfindende homologe Rekombination bei DNA-Doppelstrangbrüchen verursacht. Bei der genaueren Untersuchung der SHFM1-Genmutation im Plattenepithelkarzinom schien der c.143 G>A Aminosäureaustausch eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese Variante wurde bei Patienten mit dieser karzinomatösen Entartung der Haut deutlich häufiger als bei gesunden Probanden gefunden. Da ca. 70 % der Fälle mit einer p53-Mutation die SHFM1 G>A Variante aufwiesen, lässt sich folgern, dass diese Mutation möglicherweise zu somatischen p53-Mutationen prädisponiert (Venza et al., 2010).

Venza et al. konnten also ebenso wie Wei et al. eine Assoziation einer SHFM1-Genmutation mit einem tumorösen Geschehen der Haut nachweisen. Allerdings war hierbei eine Verminderung des SHFM1-Proteins mit chromosomaler Instabilität und erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms verbunden. Die Analyse der Internetdatenbank dagegen wies jedoch auf eine Assoziation mit der Melanomentstehung bei verstärkter SHFM1-Genexpression hin. Es stellt sich also die Frage, warum es zu diesen Differenzen in der Wirkung von SHFM1 kommt. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Gen abhängig davon, in welchen Zellen es exprimiert wird, sowohl tumorinduzierende als auch -supprimierende Wirkung haben kann. Das Plattenepithelkarzinom der Haut, bei dem eine verminderte oder fehlerhafte SHFM1-Expression zum Tumorwachstum führte, geht von Plattenepithel aus. Das maligne Melanom entsteht hingegen aus entarteten Melanozyten. Es ist jedoch auffällig, dass sowohl das Plattenepithelkarzinom der Haut als auch das maligne Melanom zum Teil sehr ähnliche Risikofaktoren besitzen. Bei beiden Tumorentitäten spielt z.B. die Exposition gegenüber UV-Strahlung eine wichtige Rolle. Daher gibt es drei mögliche Überlegungen: Einerseits könnte es sein, dass SHFM1 tatsächlich aufgrund noch nicht genauer bekannter Faktoren im Plattenepithel vermindert exprimiert wird und somit die Pathogenese fördert, während im Melanom genau das Gegenteil der Fall ist und eine verstärkte Expression zur Tumorprogression beiträgt. Die zweite Option besteht darin, dass es zwar zu einer differentiellen Expression von SHFM1 in den genannten Tumorentitäten kommt, dieses Gen aber *per se* keine relevante Rolle bei der Tumorphathogenese spielt. Außerdem muss bedacht werden, dass Venza et al. vor allem auf die c.143 G>A Mutation untersuchten und die Veränderungen bezüglich des Tumorwachstums bei diesem Polymorphismus beobachteten. Daher besteht eine weitere Überlegung darin, dass es bei genau dieser Mutation zu einer verminderten Genexpression und folgender Tumorentstehung kommt, während dahingegen andere Mutationen möglicherweise das Gegenteil bewirken.

4.3 PLXNA1 (*Plexin A1*)

4.3.1 Allgemeine Funktionen von PLXNA1

Das auf dem Chromosom 3 gelegene Gen PLXNA1 kodiert für das Transmembranprotein Plexin A1, das zur Familie der Plexine gehört. Diese Familie besteht aus neun Mitgliedern, die in vier Subfamilien gegliedert werden können. Anhand der Struktur ihrer extrazellulären Domäne lassen sich vier Mitglieder der Familie A (A1-4) von drei der Familie B (B1-3) und jeweils einem der Familien C (C1) und D (D1) unterscheiden (Ji et al., 2009).

Plexine sind sogenannte Semaphorin-Rezeptoren, da sie über eine Cystein-reiche extrazelluläre Domäne lösliche oder membrangebundene Semaphorine binden können (Tamagnone et al., 1999). Außerdem besitzen sie eine PSI-Domäne (Plexin, Sema, Integrin), auf die eine IPT-Domäne (*Ig-like, plexins and transcription factors*) folgt (O'Connor et al., 2008).

Die Semaphorin-Familie besteht aus sieben Klassen: Klasse-1- und -2-Semaphorine kommen in Wirbellosen vor, während die Klassen 3 bis 7 in Vertebraten auftreten. Zusätzlich existiert noch die Klasse V der Semaphorine, die in Viren gefunden wird (Tamagnone et al., 2000). Während die membrangebundenen Semaphorine direkt an die Semaphorin-Domäne der Plexine binden können, brauchen die löslichen Klasse-3-Semaphorine hierfür die Molekülgruppe der Neuropiline als Korezeptoren. Bei dieser Klasse der Semaphorine kann man wiederum bis heute sieben bekannte Semaphorine unterscheiden (Sema3A-G). Sema3A bindet nur Neuropilin 1, während Sema3F und Sema3G vor allem Neuropilin 2 binden. Sema3B, Sema3C und Sema3D binden sowohl Neuropilin 1 als auch 2. Sema3E benötigt als einziges Semaphorin der Klasse 3 kein Neuropilin als Korezeptor für die Signalübermittlung, sondern kann direkt an Plexin D1 binden (Ji et al., 2009; Gaur et al., 2009).

Da Plexine die Fähigkeit besitzen, Tyrosinkinaserzeptoren wie MET, RON, HER2 und KDR aktivieren zu können, liegt die Vermutung nahe, dass diese Proteine die Invasions- und Metastasierungsbereitschaft von Krebszellen beeinflussen können (Balakrishnan et al., 2009).

Im Folgenden sollen nun kurz die bereits bekannten Funktionen der Plexine, vor allem Plexin A1, in der Tumorentstehung und -progression dargestellt werden.

4.3.2 Rolle von Plexin A1 bei Angiogenese und Tumorpheriferation

Zhao et al. zeigten, dass sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinexpression von Plexin A1 in der entarteten Magenschleimhaut bei Magenkarzinomen im Vergleich zu normaler Magenmukosa signifikant erhöht ist (Zhao et al., 2007). Hierzu ermittelten sie von je 20 Patienten mit bzw. ohne Magenkarzinom die Plexin A1 mRNA-Expressionsstärke und die Proteinexpression von Semaphorin 6D mittels semi-quantitativer RT-PCR und Western Blot. Plexin A1 ist ein Semaphorin-Rezeptor des membrangebundenen Sema6D. Die Expressionsstärke war im Tumorgewebe deutlich höher als in der normalen Magenschleimhaut. Auch bei der Expressionshöhe mittels Western Blot und Immunhistochemie zeigte sich ein signifikant höheres Ergebnis im Vergleich zum nicht entarteten Gewebe. Weiterhin fand sich ein Zusammenhang zwischen Plexin A1-Expression und dem Proliferationsindex der Tumorzellen. Dieser Index stieg sowohl bei verstärkter Plexin A1-mRNA-Expression als auch bei gesteigerter Proteinexpression signifikant an. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch die Dichte der Mikrogefäße im Tumorgewebe deutlich mit einer verstärkten PLXNA1-mRNA- bzw. Protein-Expression zunahm. (Zhao et al., 2007).

Diese Ergebnisse wurden von Zhao et al. im Magenkarzinom gefunden. Bei der Tumorpherogenese generell spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle. Die Tumorzellen benötigen ebenso wie alle anderen lebenden Zellen eine ausreichende Gefäßversorgung zum Überleben. Außerdem können Tumore über den Blutweg Tochterzellen entsenden und so in andere Teile des Organismus metastasieren. Ein erhöhter Proliferationsindex, wie er von Zhao et al. gefunden wurde, steigert ebenso die Malignität des Tumors. Zum einen kann der Tumor selbst dadurch wachsen und an Größe zunehmen, zum anderen wird die Metastasierungsbereitschaft gefördert. Es wäre durchaus denkbar, dass auch bei anderen Tumorentitäten eine erhöhte Plexin A1-Expression zu gesteigerter Proliferation und Angiogenese führt. Ob im malignen Melanom möglicherweise auch PLXNA1 durch Proliferationssteigerung und Steigerung der Angiogenese zur Tumorpherogenität beiträgt, könnte daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die Ergebnisse der Datenbankanalyse deuten jedenfalls darauf hin, dass PLXNA1 im Melanom verstärkt exprimiert wird. Bei den eigenen Untersuchungen in den Zelllinien war die PLXNA1-mRNA-Expression zwar signifikant erniedrigt im Vergleich zu den normalen Melanozyten, in der Untersuchung in den Gewebeproben zeigte sich jedoch auch

hier eine verstärkte Expression des Gens in den Tumorproben verglichen mit den Proben aus normaler Haut. Dies könnte die These stützen, dass eine erhöhte PLXNA1-Expression durch gesteigerte Proliferation und Angiogenese zur Melanomentstehung oder Metastasierung beiträgt.

4.3.3 Erhöhung der Aktivität des VEGF-Rezeptors und Aktivierung des NFκB-Weges

Catalano et al. konnten zeigen, dass in Asbest-assoziierten malignen pleuralen Mesotheliomen häufig Sema6D und dessen Rezeptor Plexin A1 exprimiert werden, welche ein Überlebensprogramm auslösen, das das Wachstum der Tumorzellen des Mesothelioms fördert (Catalano et al., 2009). In diesen Zellen ist Plexin A1 mit dem VEGF-Rezeptor-2 komplexiert (*Vascular Endothelial Growth Factor*), dessen Tyrosinkinase-Rezeptoren in einem NFκB-abhängigen Weg dieses Überlebensprogramm der Tumorzellen kontrollieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Sema6D Plexin A1-abhängig die Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors-2 fördert, was für die NFκB-Transkriptionsaktivität nötig ist, die das Tumorzellüberleben vermittelt. Plexin A1 fördert also das Tumorüberleben, indem es die Aktivität von VEGF-Rezeptor-2 erhöht und den NFκB-Weg aktiviert. Die Expression sowohl von Sema6D als auch von Plexin A1 wird durch die Asbestfasern induziert und die Asbest-vermittelte Überexpression von Plexin A1 in nichtmalignen mesothelialen Zellen verhindert den Zelltod. Die Plexine der Gruppe A vermitteln zusammen mit Neuropilinen Signale in einem Komplex mit Klasse-3-Semaphorinen. Des Weiteren sind die Plexine der Subfamilie A auch die Rezeptoren für Klasse-6-Semaphorine wie Sema6A und 6D, die die VEGF-Rezeptor-2 vermittelte Signaltransduktion vermitteln. Außerdem ist die maligne Transformation mit einer hohen Expression von Plexin A1 und Sema6D assoziiert, welches möglicherweise die inhibitorischen Effekte des Tumorsuppressormoleküls Sema3D antagonisiert und so das Tumorzellüberleben fördert (Catalano et al., 2009).

Auch im malignen Melanom gibt es eine Regulation des NFκB-Weges. Das NFκB-Protein, das als Transkriptionsfaktor die Transkription verschiedener Gene reguliert, hat vor allem drei große Rollen: Zum einen ist es bei der Genese einer proinflammatorischen Antwort bei Infektionskrankheiten beteiligt. Außerdem ist es ein wichtiger Anti-

Apoptose-Faktor, indem es die Transkription einiger Anti-Apoptose-Proteine induziert. Darüber hinaus fördert das Protein die Expression von Cyclin-D1, einem wichtigen Bestandteil des Zellzyklus, und vermittelt darüber das Zellwachstum (Madonna et al., 2012). McNulty et al. konnten zeigen, dass einige Komponenten der NFκB-Familie in dysplastischen Nävi und Melanomzellen im Vergleich zu normalen Nävi und gesunden Melanozyten verstärkt exprimiert werden (McNulty et al., 2004).

Das Molekül VEGF wird durch Tumor-assoziierte Makrophagen bei der Tumorprogression verstärkt sezerniert. Vor allem bei niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen in der Umgebung von Tumoren wird der Wachstumsfaktor vermehrt exprimiert. Daher lässt sich eine Hochregulation des VEGF sowohl während der Melanomentstehung als auch im Stadium der Metastasierung finden (Salven et al., 1997; Roda et al., 2012).

Es lässt sich hierbei also die Vermutung aufstellen, dass Plexin A1 auch im malignen Melanom die Aktivität des VEGF-Rezeptors erhöht und den NFκB-Weg aktiviert. Ob jedoch tatsächlich eine verstärkte PLXNA1-Expression für die gesteigerte NFκB- und VEGF-Aktivierung verantwortlich ist, müsste in weiteren Untersuchungen geprüft werden. Diese verstärkte Plexin A1-Expression und damit einhergehende Tumorproliferation ließe sich jedoch auf jeden Fall mit den Ergebnissen der Internetanalyse der Datenbank GEO Profiles vereinbaren, die ebenfalls eine gesteigerte Expression des Gens im Melanom aufwies.

4.3.4 Rolle der Plexine im malignen Melanom

Wie bereits erwähnt, gehört Plexin A1 zur sogenannten Plexin-Familie, die aus neun Mitgliedern besteht. Diese neun Plexine kann man aufgrund ihrer Struktur der extrazellulären Domäne in vier Subfamilien gliedern. Balakrishnan et al. untersuchten die Rolle aller Plexine der Plexin-Gen-Familie im malignen Melanom (Balakrishnan et al., 2009). Hierbei ließ sich anhand von PCR-Untersuchungen eine deutlich gesteigerte Expression (2- bis 11-fach) von PLXNA4 in vielen Melanomproben im Vergleich zu normalem Gewebe nachweisen. Dieses Gen gehört aufgrund der ähnlichen extrazellulären Domäne zur gleichen Plexin-Subfamilie wie PLXNA1. In keiner der 24 Proben des malignen Melanoms war ein Rückgang der PLXNA4-Expression zu verzeichnen. Die Untersuchung der Region, die das Gen PLXNA4 beinhaltet, zeigte, dass sich hier auch das

Onkogen BRAF befindet. Von diesem ist bereits bekannt, dass es im malignen Melanom mutiert ist und verstärkt aktiviert wird (siehe Einleitung). Durch zahlreiche Amplifikationen und Sequenzierungen konnte bestätigt werden, dass die Mutation des PLXNA4-Gens sowohl in der extrazellulären als auch in der zytoplasmatischen Domäne der Plexin-Rezeptoren auftritt. Balakrishnan und Kollegen konnten zeigen, dass die Migration von Zellen, die das Wildtyp-PLXNA4-Gen exprimieren, stark inhibiert ist, während dagegen bei Tumorzellen, die das mutierte PLXNA4-Gen tragen, diese Inhibition fehlt (Balakrishnan et al., 2009).

Wie bereits erwähnt, können Plexine Tyrosinkinase-Rezeptoren wie z.B. MET aktivieren. Von MET ist bekannt, dass es im malignen Melanom verstärkt exprimiert wird. Es wird von Melanozyten exprimiert und beeinflusst die Transformation dieser Zellen sowie den Übergang in ein metastasierendes Stadium (Beuret et al., 2007; Cruz et al., 2003). Es wäre daher denkbar, dass es aufgrund einer verstärkten PLXNA4 Expression zu einer darauf folgenden verstärkten Aktivierung dieses Tyrosinkinase-Rezeptors kommt. Als Folge der MET-Aktivierung kommt es zur Transformation der Melanozyten zu Melanomzellen und die Metastasierungsbereitschaft steigt. So würde eine erhöhte PLXNA4-Expression letztlich die maligne Transformation der Melanozyten initiieren und die Tumorphathogenese fördern. Balakrishnan et al. wiesen die erhöhte Expression von Plexin A4 im Melanom nach. Jedoch besitzen Plexine allgemein die Eigenschaft, Tyrosinkinase-Rezeptoren zu aktivieren. Es ist also durchaus denkbar, dass der gleiche oder ein ähnlicher Weg auch über eine erhöhte Plexin A1-Expression, wie sie durch die Datenbankanalyse suggeriert wird, zustande kommt und so die Melanopathogenese gefördert wird.

4.3.5 Genexpression von Plexin A1 in weiteren Tumorarten

Müller et al. untersuchten die Rolle von Plexin A1, Sema3A und Neuropilin-1 (Np-1) im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (Müller et al., 2007). Hierfür wurde mittels qRT-PCR die mRNA-Expression gemessen. Es zeigte sich, dass diese im malignen Gewebe sowohl für Sema3A als auch für Np-1 und Plexin A1 erhöht war im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe. Des Weiteren wurde ein Einfluss der Expression dieser Proteine auf das Überleben der Patienten geprüft. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl eine erniedrigte Sema3A mRNA-Expression als auch eine niedrige Plexin A1

mRNA-Expression signifikant mit einem längeren Überleben korrelierten. Während die Patienten mit niedrigen Plexin A1 mRNA-Expressionsstärken im Durchschnitt 27 Monate überlebten, waren es bei Patienten mit hohen Plexin A1-mRNA-Expressionsstärken nur durchschnittlich sechs Monate. Allerdings ließ sich keine Korrelation der Expressionsstärke mit Tumordifferenzierung, Tumorgröße oder Schmerzen nachweisen (Müller et al., 2007).

Rieger et al. untersuchten die Expression der Semaphorine einschließlich ihrer Rezeptoren, der Neuropiline und Plexine in menschlichen malignen Gliomzellen. Hierbei wurde die Expression von Neuropilin 1 und 2 und der Plexine A1, A2 und B1 in zwölf Gliomzelllinien anhand von RT-PCR und Immunoblot untersucht. Es zeigte sich, dass Plexin A1 in neun von zwölf Zelllinien, und Plexin A2 und B1 in jeweils acht von zwölf Zelllinien exprimiert werden. Da in allen zwölf Zelllinien mindestens ein Plexin exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Plexine zusammen mit dem Semaphorin-Neuropilin-Komplex eine wichtige Rolle in der Interaktion von Gliomzellen mit dem Zentralen Nervensystem spielen (Rieger et al., 2003).

Durch die erhöhten Plexin A1-Werte im Pankreaskarzinom und in Gliomzellen und die durch die Internetanalyse und mittels PCR gewonnenen Werte bei Melanomgewebeproben, lässt sich nun die Vermutung aufstellen, dass Plexin A1 möglicherweise grundsätzlich in maligne entartetem Gewebe verstärkt exprimiert wird. Auch in der analysierten Studie GDS1761 zeigten sich, wie bereits erwähnt, für dieses Gen in fast allen dort untersuchten Tumorentitäten positive Expressionswerte. Man könnte allerdings auch vermuten, dass die maligne Transformation mit der embryonalen Entwicklung der Zellarten zusammenhängt. Wie beschrieben, wurde PLXNA1 in Gliomzellen und im Pankreaskarzinom verstärkt exprimiert. Diese Zellen sind embryonalgeschichtlich neuroektodermalen Ursprungs. Auch Melanoblasten sind Abkömmlinge des Neuroektoderms, da sie während der Embryonalentwicklung von der Neuralleiste in die Epidermis einwandern. Es wäre also denkbar, dass die Genexpression und damit assoziiertes Tumorstadium mit der embryonalgeschichtlichen Abstammung der Zellen zusammenhängen. Hierbei wäre es folglich interessant zu prüfen, ob eine verstärkte

PLXNA1-Expression auch in anderen neuroektodermalen Zellen zu finden ist und ob dies dann mit einer verstärkten Tumorgenese einhergeht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weder Semaphorine, für die Plexine als Rezeptoren dienen, noch Neuropiline auf ihre Expression im Melanom hin untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass z.B. Sema3A als Tumorsuppressorprotein in Melanomen gilt. In Mausmodellen zeigte sich bei verstärkter Sema3A-Expression eine signifikante Inhibition von Zellmotilität, Invasivität und Proliferation, sowie eine Suppression von Tumorstadium, Angiogenese und Metastasierung. Ein Grund hierfür ist die kompetitive Wirkung von Sema3A und VEGF. Beide Moleküle sind Liganden für Neuropilin-1. Bindet nun Sema3A statt VEGF an Neuropilin-1, so kann VEGF seine angiogenetische Wirkung nicht mehr entfalten (Chakraborty et al., 2012). In weiteren Untersuchungen könnte daher geprüft werden, ob auch diese für Plexin A1 wichtigen Molekülgruppen bei der Melanomentstehung verstärkt exprimiert werden und so zur Tumorentstehung beitragen.

4.4 Diskussion der Methode der Analyse einer Internetdatenbank als Quelle für melanomrelevante Gene

4.4.1 Gene mit bereits bekannter Regulation im Melanom

Durch die Analyse verschiedener *Affymetrix Microarrays* der Internetdatenbank GEO Profiles wurden Gene ausgewählt, die aufgrund der oben genannten Kriterien in den untersuchten Array-Experimenten auf eine Assoziation mit dem malignen Melanom schließen ließen. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, fanden sich nach erfolgter Analyse 113 Gene, bei denen gemäß der sieben untersuchten Studien eine Überexpression im Melanom vorliegt, sowie 28 Gene, die aufgrund der Studien eine verminderte Expression im malignen Melanom aufweisen (siehe Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). Für die molekularbiologische Untersuchung wurden Gene gewählt, bei denen noch keine Regulation im Melanom bekannt war. Es ließen sich jedoch auch einige Gene finden, zu

denen bereits Informationen zu einer Regulation im Melanom vorliegen. Auf diese Gene soll im Folgenden kurz näher eingegangen werden.

Ein wichtiges Gen, für das schon lange gesicherte Informationen zu einer Veränderung im Melanom vorliegen, ist das **MC1R**-Gen (Melanocortin-1-Rezeptor) (siehe auch Einleitung). Gemäß der Analyse der GEO Profiles Datenbank ist dieses Gen im Melanom hochreguliert. Es kodiert für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der auf der Oberfläche von Melanozyten in Haut- und Haarfollikeln exprimiert wird. Bei UV-Exposition kommt es zu einer Aktivierung des MC1-Rezeptors und daraufhin zur Produktion von schwarzem Eumelanin, das zur Bräunung der Haut führt und Schutz vor DNA-Schäden bietet. Neben dem UV-protektiven Eumelanin gibt es auch noch das rotgelbe Pheomelanin, das eine Rolle bei UV-induzierten Hautschäden spielt, indem es freie Radikale generiert. Durch Genmutationen, die zu einem Funktionsverlust des Melanocortin-1-Rezeptors führen, kommt es zu einer Abnahme der Eumelanin-Produktion und einer damit einhergehenden Zunahme der kanzerogenen Pheomelanin-Produktion. Diese Polymorphismen des MC1R-Gens sind daher assoziiert mit rötlicher Haarfarbe, heller Haut mit schlechter Bräunungstendenz und einem höheren Risiko für die Entwicklung eines malignen Melanoms (Quint et al., 2012; Beaumont et al., 2009; Demenais et al., 2010).

Ein weiteres Gen, das bei der Internetanalyse unter den 113 verstärkt exprimierten Genen zu finden war, und über das bereits Informationen zu einer Regulation im Melanom vorliegen ist **ITGA3** (Integrin, Alpha 3). Das durch dieses Gen kodierte Protein gehört zur Familie der Integrine. Dies sind heterodimere Membranproteine, die aus einer α -Kette und einer β -Kette bestehen und als Zelladhäsionsmoleküle fungieren. Penna et al. fanden einen bislang unbekanntem Signalweg, der durch die Mikro-RNA miR-214 koordiniert wird und unter anderem auch ITGA3 enthält. Durch diesen Weg wird die Metastasierung des Melanoms gesteigert, da Migration, Invasion und das Melanomzellüberleben gefördert werden (Penna et al., 2011).

Des Weiteren befand sich **MET** unter den im Melanom stärker exprimierten Genen der Internetanalyse. Das Proto-Onkogen kodiert für einen Rezeptor für den *Hepatocyte Growth Factor* HGF. Dies ist eine Tyrosinkinase, die bei Melanozytenwachstum und Melanomentwicklung beteiligt ist. MET wird von Melanozyten exprimiert und beein-

flusst die Transformation dieser Zellen sowie den Übergang in ein metastasierendes Stadium. Außerdem spielt HGF eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Melanoms mit der Mikroumgebung (Beuret et al., 2007). MET wird in vielen verschiedenen malignen Neoplasien verstärkt exprimiert, darunter unter anderem in Adenokarzinomen des Kolons, Pankreas und der Ovarien, sowie in Sarkomen und Schilddrüsenkarzinomen. Auch im malignen Melanom findet sich eine Überexpression des MET-Gens (Cruz et al., 2003).

Ein weiteres Gen, das durch die Internetanalyse als im Melanom hochreguliert gefunden wurde, ist **CDK2** (*Cyclin-Dependent Kinase 2*). Das durch dieses Gen kodierte Protein gehört zur Familie der Seronin/Threonin-Kinasen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Bisher wurde CDK2 als ein wichtiger Regulator des Übergangs der G1- in die S-Phase des Zellzyklus gesehen (Tetsu et al., 2003). Du et al. konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor MITF (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*, siehe Einleitung) die CDK2-Expression spezifisch in Melanozyten reguliert. Sowohl in aus Gewebe entnommenen primären Melanomzellen als auch in Melanomzelllinien korrelieren die Höhe der Expression von CDK2 und MITF eng miteinander. Du und Kollegen zeigten, dass das Gen essentiell für das Melanomwachstum ist und eine mittels siRNA erreichte Depletion sowohl die Zellzyklus-Progression als auch die Proliferation der Melanomzellen verhindert (Du et al., 2004).

Ein Gen, das gemäß der Internetanalyse als ein im Melanom niedriger exprimiertes Gen gefunden wurde, ist **BMP7** (*Bone Morphogenetic Protein 7*). Es gehört zur Superfamilie der *Transforming Growth Factors*. Rothhammer et al. konnten jedoch eine erhöhte Expression des Gens in verschiedenen Melanom-Zelllinien aufzeigen. Auch *in vivo* zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression sowohl in den Primärtumor- als auch in den Metastasen-Gewebeproben (Rothhammer et al., 2005). Im Gegensatz dazu zeigten Na et al. eine Inhibition der Proliferation von Melanomzellen durch BMP7. In den hier untersuchten Zelllinien reduzierte das Gen die Migrationsfähigkeit der Melanomzellen und die Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin. Die biologischen Effekte von BMP7 scheinen also zu variieren und zellspezifisch zu sein. Daher hat das Protein wahrscheinlich zum Teil protumorigenetische als auch antitumorigenetische Effekte (Na et al., 2009).

Durch die Internetanalyse wurden also einige Gene detektiert, die erwiesenermaßen eine Assoziation mit dem malignen Melanom haben. Dies spricht dafür, dass es mit der verwendeten Methode möglich ist, melanomrelevante Gene aus dieser Datenbank herauszufiltern. Bei allen oben beschriebenen Genen außer BMP7 konnte sich auch die gemäß GEO Profiles zu erwartende Expression durch die Literaturangaben bestätigen lassen. Bei BMP7 fand sich durch die Internetanalyse der Studien eine verminderte Expression im Melanom, während die Literaturangaben sich hierbei unterscheiden. Eine Assoziation zum Melanom wiesen jedoch sowohl Rothhammer et al. als auch Na et al. nach. Trotz der Tatsache, dass durch die beschriebene Methode melanomrelevante Gene gefunden werden konnten, ist natürlich weiterhin fraglich, ob grundsätzlich alle dieser Gene detektiert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht weiter untersucht, ob sich unter den Genen, die aufgrund der gewählten Kriterien aus der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden, weitere mit dem malignen Melanom assoziierte Gene befinden. Möglicherweise wurden bereits nach der ersten analysierten Studie (GDS1375) Gene ausgeschlossen, die dort keinen deutlichen Expressionsunterschied zwischen Melanom und normaler Haut oder Nävus aufwiesen und trotzdem über eine Regulation im Melanom verfügen. Dies könnte anhand weiterer Untersuchungen überprüft werden. Außerdem wurden durch die Analyse der Internetdatenbank auch Gene detektiert, bei denen zumindest bei aktuellem Forschungsstand keine Regulation im Melanom bekannt ist. Zum Beispiel bei den Genen ABHD2, MNX1 und PPIAL, die sich auch in Tabelle 3.3 befinden, ist – zumindest bislang – überhaupt keine Assoziation zum malignen Melanom bekannt.

4.4.2 *Affymetrix Microarrays als Ausgangspunkt der Analyse*

Die untersuchten Studien beruhen auf der Analyse verschiedener *Affymetrix Microarray* Experimente. Diese „*GeneChips*“ erlauben es, gleichzeitig die Expression mehrerer tausend Gene zu messen. Da die *Microarray*-Technologie jedoch aufgrund ihrer Komplexität und vielen möglichen Fehlerquellen zu unerwünschter Varianz bei den Ergebnissen führen kann, ist es wichtig, die Qualität der Daten einschätzen zu können (Heber et al., 2006). Stetig steigende Datenmengen und zunehmende Komplexität der Daten führten dazu, dass Brazma et al. bereits 2001 eine standardisierte Mindestinformation

über die *Microarray*-Experimente forderten, um so die Interpretation und Verifizierung der veröffentlichten Daten zu ermöglichen. Diese „*Minimum Information About a Microarray Experiment*“ (MIAME) fordert genormte Angaben über das experimentelle Design, das Design des Arrays hinsichtlich verwendeter Art des Arrays und Beschreibung jedes Elements, über die verwendeten Proben und deren Benennung, das Prozedere und die Parameter bei der Hybridisierung, Angaben über die Messungen und die Normierung und Kontrollen (Brazma et al., 2001). Als Ergänzung zu MIAME und um bei der Suche die Daten besser zugänglich und vergleichbarer zu machen und die Daten auf den neuesten Stand zu bringen, stellten Cahan et al. die SMART-Kriterien (*Standard Microarray Reporting Template*) auf (Cahan et al., 2007). Aufgrund der steigenden Verwendung von *Microarrays* und damit einhergehenden Zweifeln an der Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit wurde 2006 von der *US Food and Drug Administration* (FDA) das so genannte MAQC-Projekt (*MicroArray Quality Control*) initiiert. Anhand von sieben verschiedenen *Microarray*-Plattformen, darunter auch die in dieser Arbeit analysierten *Affymetrix Microarrays*, wurden über 12.000 Gene anhand von 1.327 *Microarrays* untersucht und die Genexpressionsstärken gemessen. Es zeigte sich, dass bei einem mittleren Variationskoeffizienten für die Signaldetektion von 5-15 % und einer Übereinstimmungsrate von 80-95 % hinsichtlich der qualitativen Detektion der Signale die durch *Microarrays* gewonnenen Ergebnisse wiederholbar, reproduzierbar und innerhalb der untersuchten Plattformen vergleichbar waren (MAQC Consortium, 2006).

4.4.3 Mögliche Ursachen der Differenzen zwischen der Analyse der *Affymetrix Microarrays* und den eigenen experimentellen Untersuchungen

Wie bereits erwähnt, war eine Fragestellung dieser Arbeit, ob es möglich ist, aufgrund veröffentlichter Daten Gene in Internetdatenbanken herauszufiltern, die eine Korrelation mit der Melanomentstehung oder -entwicklung aufweisen. Für die drei näher untersuchten Gene konnte die molekularbiologische Untersuchung in Zelllinien bei keinem der drei Gene die durch die Internetanalyse vermutete höhere Expression im malignen Melanom bestätigen. Während sich bei KCNN2 und SHFM1 überhaupt keine signifikanten Unterschiede zwischen den NHEM-Proben und Primärtumor bzw. Metastasen zeigte, fand sich bei PLXNA1 sogar eine signifikant niedrigere Genexpression. Ande-

rerseits ließ sich eine erhöhte Expression in den Primärtumor-Gewebeproben finden. Diese Ergebnisse stimmen jedoch auch nur bedingt mit den analysierten Array-Experimenten überein. Bei der Internetanalyse zeigte sich auch bei den Arrays, bei denen die Genexpression in Zelllinien (z.B. GDS1375, GDS1314) gemessen wurde, eine erhöhte PLXNA1-Expression. Auch in der Studie GDS1989, die die Expression des Gens sowohl in Zelllinien als auch in Gewebeproben darstellt, finden sich für PLXNA1 neben erhöhten Werten vor allem in den späteren Stadien der Melanomprogression (vertikale Wachstumsphase, Metastasierungsstadium) auch erhöhte Werte in der Zellkultur mit metastasierenden Melanozyten.

Daher stellt sich die Frage, ob und wie sich die Differenzen zwischen der Internetanalyse und den eigenen experimentellen Ergebnissen erklären lassen.

Wie bereits erwähnt, beruhen die untersuchten Studien auf der Analyse verschiedener *Affymetrix Microarray* Experimente. Diese „*GeneChips*“ erlauben es, gleichzeitig die Expression mehrerer tausend Gene zu messen. Wie das MAQC-Projekt zeigte, kommt es jedoch trotz verschiedenster Normierungen wie MIAME zu einem Variationskoeffizienten für die Signaldetektion von 5-15 % und einer Übereinstimmungsrate von 80-95 % bezüglich einer qualitativen Detektion der Signale. Für die enorme Menge der untersuchten *Microarrays* sind derartige Prozentangaben sicher ein sehr gutes Ergebnis, allerdings muss bedacht werden, dass dies daher trotzdem bedeutet, dass es noch zu einer Fehlerrate von bis zu 20 % kommen kann. In den eigenen Untersuchungen wurde für die Detektion der Genexpression die qRT-PCR verwendet. Diese Methode liefert im Vergleich mit den „*GeneChips*“ genauere Werte, da für jedes Gen eigene Primer, die speziell für das zu detektierende Gen angefertigt wurden, verwendet werden.

Eine weitere Möglichkeit, warum es zwischen der Internetanalyse und den eigenen experimentellen Ergebnissen zu Differenzen kam, besteht darin, dass es innerhalb der verschiedenen untersuchten Melanozyten- oder Tumorzelllinien genetische Unterschiede gibt. Dies zeigt beispielsweise die näher betrachtete Studie GDS1314. Hierbei wurde, wie bereits erwähnt, in fünf verschiedenen Melanomzelllinien die Genexpression gemessen. Es zeigte sich dabei bei allen drei näher untersuchten Genen eine deutliche Varianz hinsichtlich der Expressionsstärke in den einzelnen Zelllinien. Von diesen fünf Linien wurden bei den eigenen molekularbiologischen Untersuchungen mittels PCR nur

die Zelllinien SkMel 28 und Mel Juso überprüft. Auch bei den eigenen Ergebnissen findet sich eine enorme Varianz in der Expression der Gene innerhalb der einzelnen Gruppen. Bei KCNN2 z.B. fanden sich im Vergleich zu NHEM P6 deutlich erniedrigte Werte in der Metastastenzelllinie HTZ 19, während die Werte bei Mel Ju deutlich höher als der NHEM-Wert waren. Über alle Metastastenzelllinien gemittelt ergab sich daher kein signifikanter Unterschied zu den Melanozyten, wohingegen die einzelnen Zelllinien dennoch deutlich verschieden waren. Ähnliche Feststellungen lassen sich auch für die anderen Gene treffen. Sehr deutlich zeigt sich dies auch z.B. bei den untersuchten Gewebeproben für das Gen PLXNA1. Hier schwanken die Expressionswerte für die einzelnen untersuchten Metastasenproben zwischen 4,66 und 0,03 im Bezug auf normale Haut. Über alle fünf Metastasenproben gemittelt ergab sich daher kein signifikanter Unterschied zu normaler Haut. Die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Expression des Gens könnten also an den genetischen Unterschieden innerhalb der einzelnen Zelllinien oder Gewebeproben liegen.

Möglicherweise liegen die Unterschiede bezüglich der Expressionsstärke zwischen den einzelnen Zelllinien auch an der Art der Materialien. Auch der für PLXNA1 gefundene Widerspruch zwischen der Expressionsstärke in den Zelllinien und in den Gewebeproben ließe sich eventuell dadurch erklären. Während die Zelllinien häufig über Jahre im Labor gezüchtet werden, kommen die Gewebeproben meist direkt vom operierten Präparat. Bei der Zellkultur werden verschiedene Wachstumsfaktoren und andere Medien zugesetzt, um die Zellen zu erhalten und zu vermehren. Dadurch kann es jedoch auch zu Veränderungen innerhalb der Zellpopulation kommen, die dann für die unterschiedlichen Werte in verschiedenen experimentellen Versuchen verantwortlich sein können.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass in allen drei untersuchten Genen der erwartete Zusammenhang mittels Expressionsmessung in den Zelllinien nicht nachgewiesen werden konnte. Da jedoch im Rahmen dieser Arbeit lediglich drei von 8.000 Genen näher betrachtet wurden, lässt sich nur bedingt eine allgemeingültige Aussage über die Herangehensweise oder eine Bewertung der Validität der Datenbank treffen. Außerdem konnte für PLXNA1 die erhöhte Expression des Gens in Gewebeproben bestätigt werden. Da diese Proben die tatsächliche Expression von Genen im untersuchten Gewebe widerspiegeln, ist dieses Ergebnis daher höher einzustufen als die Messungen in den

Zelllinien. Dies zeigt, dass die verwendete Methode zumindest bedingt geeignet ist, um Gene zu identifizieren, die eine Korrelation mit dem Melanom aufweisen.

5 Literaturverzeichnis

Allen D., Nakayama S., Kuroiwa M., Nakano T., Palmateer J., Kosaka Y., Ballesteros C., Watanabe M., Bond C.T., Luján R., Maylie J., Adelman J.P., Herson P.S. SK2 channels are neuroprotective for ischemia-induced neuronal cell death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31(12): 2302-12, 2011

Amiri K.I., Richmond A. Role of nuclear factor- κ B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24(2): 301-13, 2005

Baeuerle P.A., Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12: 141-79, 1994

Balakrishnan A., Penachioni J.Y., Lamba S., Bleeker F.E., Zanon C., Rodolfo M., Vallacci V., Scarpa A., Felicioni L., Buck M., Marchetti A., Comoglio P.M., Bardelli A., Tamagnone L. Molecular profiling of the “plexinome” in melanoma and pancreatic cancer. *Hum Mutat.* 30(8): 1167-74, 2009

Balch C.M., Soong S.J., Atkins M.B., Buzaid A.C., Cascinelli N., Coit D.G., Fleming I.D., Gershenwald J.E., Houghton A. Jr., Kirkwood J.M., McMasters K.M., Mihm M.F., Morton D.L., Reintgen D.S., Ross M.I., Sober A., Thompson J.A., Thompson J.F. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J Clin.* 54(3): 131-49, 2004

Balch C.M., Soong S.J., Gershenwald J.E., Thompson J.F., Reintgen D.S., Cascinelli N., Urist M., McMasters K.M., Ross M.I., Kirkwood J.M., Atkins M.B., Thompson J.A., Coit D.G., Byrd D., Desmond R., Zhang Y., Liu P.Y., Lyman G.H., Morabito A. Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 19(16): 3622-34, 2001

Barrett T., Suzek T.O., Troup D.B., Wilhite S.E., Ngau W.C., Ledoux P., Rudnev D., Lash A.E., Fujibuchi W., Edgar R. NCBI GEO: mining millions of expression profiles – database and tools. *Nucleic Acids Res.* 33: D562-66, 2005

Baxevanis A.D., Landsman D. The HMG-1 Box Protein family: classification and functional relationships. *Nucleic Acids Res.* 23(9): 1604-13, 1995

Beaumont K.A., Liu Y.Y., Sturm R.A. The melanocortin-1 receptor gene polymorphism and association with human skin cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 88: 85-153, 2009

Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer and Metastasis Rev.* 18(1): 15-30, 1999

Bertz J., Haberland J., Husmann G., Kaatsch P., Katalinic A., Kraywinkel K., Wolf U. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe, Westkreuz-Druckerei, Berlin, 2010

Bloethner S., Scherer D., Drechsel M., Hemminki K., Kumar R. Malignant melanoma – a genetic overview. *Actas Dermosifiliogr.* 100 Suppl. 1: 38-51, 2009

Borden E.C. (Hrsg.) Melanoma. Biologically Targeted Therapeutics. Humana Press, Totowa, 2002

Bailin P.L., Meine J.S., Poblete-Lopez C. Management of Primary Malignant Melanoma

Tuthill R.J. A Pathologist's Perspective on Prognostic Features of Malignant Melanoma

Bortz J., Lienert G.A. Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung. Springer-Verlag, Heidelberg, 2008

Bosserhoff A.K. Melanoma Inhibitory Activity (MIA): an important molecule in melanoma development and progression. *Pigment Cell Res.* 18(6): 411-16, 2005

Bosserhoff A.K., Hein R., Bogdahn U., Buettner R. Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J Biol Chem.* 271(1): 490-95, 1996

Bosserhoff A.K., Kaufmann M., Kaluza B., Bartke I., Zirngibl H., Hein R., Stolz W., Buettner R. Melanoma-inhibitory activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res.* 57(15): 3149-53, 1997

Box N.F., Terzian T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21(5): 525-33, 2008

Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball C.A., Causton H.C., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege F.C., Kim I.F., Markowitz V., Matese J.C., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet.* 29(4): 365-71, 2001

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 172(5): 902-08, 1970

Brizel D.M., Scully S.P., Harrelson J.M., Layfield L.J., Bean J.M., Prosnitz L.R., Dewhirst M.W. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 56(5): 941-43, 1996

Cahan P., Rovegno F., Mooney D., Newman J.C., St Laurent G. 3rd, McCaffrey T.A. Meta-analysis of microarray results: challenges, opportunities, and recommendations for standardization. *Gene.* 401(1-2): 12-18, 2007

Catalano A., Lazzarini R., Di Nuzzo S., Orciari S., Procopio A. The plexin-A1 receptor activates vascular endothelial growth factor-receptor 2 and nuclear factor-kappaB to mediate survival and anchorage-independent growth of malignant mesothelioma cells. *Cancer Res.* 69(4): 1485-93, 2009

Chakraborty G., Kumar S., Mishra R., Patil T.V., Kundu G.C. Semaphorin 3A suppresses tumor growth and metastasis in mice melanoma model. *PLoS One.* 7(3): e33633, 2012

Chin L. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell.* 125(7): 1269-81, 2006

Chinnadurai G. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(9): 1593-1607, 2007

Clark W.H., Elder D.E., Guerry D., Epstein M.N., Greene M.H., Van Horn M. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 15(12): 1147-65, 1984

Clark W.H., Fromm L., Bernardino L.A., Mihm M.C. The histogenesis and biologic behaviour of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 29(3): 705-26, 1969

Cruz C., Teule A., Caminal J.M., Blanco I., Piulats J.M. Uveal melanoma and BRCA1/BRCA2 genes: a relationship that needs further investigation. *J Clin Oncol.* 29(34): e827-29, 2011

Cruz J., Reis-Filho J.S., Silva P., Lopes J.M. Expression of c-met tyrosine kinase receptor is biologically and prognostically relevant for primary cutaneous malignant melanomas. *Oncology.* 65(1): 72-82, 2003

Deménais F., Mohamdi H., Chaudru V., Goldstein A.M., Newton Bishop J.A., Bishop D.T., Kanetsky P.A., Hayward N.K., Gillanders E., Elder D.E., Avril M.F., Azizi E., van Belle P., Bergman W., Bianchi-Scarrà G., Bressac-de Paillerets B., Calista D., Carrera C., Hansson J., Harland M., Hogg D., Höiom V., Holland E.A., Ingvar C., Landi M.T., Lang J.M., Mackie R.M., Mann G.J., Ming M.E., Njauw C.J., Olsson H., Palmer J., Pastorino L., Puig S., Randerson-Moor J., Stark M., Tsao H., Tucker M.A., van der Velden P., Yang X.R., Gruis N., Melanoma Genetics Consortium Association of MC1R Variants and Host Phenotypes With Melanoma Risk in CDKN2A Mutation Carriers: A GenoMEL Study. *J Natl Cancer Inst.* 102(20): 1568–83, 2010

Du J., Widlund H.R., Horstmann M.A., Ramaswamy S., Ross K., Huber W.E., Nishimura E.K., Golub T.R., Fisher D.E. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell.* 6(6): 565-76, 2004

Fisher D.E. (Hrsg.) Advances in Melanoma. Elsevier Inc., Philadelphia, 2009

Berger M.F., Levi A.G. Applications of Genomics in Melanoma Oncogene
Discovery

Udayakumar D., Tsao H. Melanoma Genetics: An Update on Risk-Associated
Genes

Fritsch P. Dermatologie, Venerologie. 2. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, 2004

Fürstenberger G., Berry D.L., Sorg B., Marks F. Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(12): 7722-26, 1981

Gaur P., Bielenberg D.R., Samuel S., Bose D., Zhou Y., Gray M.J., Dallas N.A., Fan F., Xia L., Lu J., Ellis L.M. Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 15(22): 6763-70, 2009

Gazel A., Banno T., Walsh R., Blumenberg M. Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 281(29): 20530-41, 2006

Gille J., Swerlick R.A. Integrins: role in cell adhesion and communication. *Ann N Y Acad Sci.* 797: 93-106, 1996

Gudmundsdottir K., Lord C.J., Witt E., Tutt A.N., Ashworth A. DSS1 is required for RAD51 focus formation and genomic stability in mammalian cells. *EMBO Rep.* 5(10): 989-93, 2004

Guo H.B., Stoffel-Wagner B., Bierwirth T., Mezger J., Klingmüller D. Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer.* 31A(11): 1898-1902, 1995

Halaban R., Langdon R., Birchall N., Cuono C., Baird A., Scott G., Moellmann G., McGurie J. Basic Fibroblast Growth Factor from Human Keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol.* 107(4): 1611-19, 1988

Heber S., Sick B. Quality assessment of Affymetrix GeneChip data. *OMICS.* 10(3): 358-68, 2006

Hengge U.R., Dummer R. (Hrsg.) Malignes Melanom. Standards und Innovationen in Diagnostik und Therapie. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 2006

Dummer R., Beyeler M. Klinische Formen des Melanoms

Itin P.H., Fistarol S.K. Anlagebedingte Risikofaktoren für die Entwicklung des malignen Melanoms

Näher H., Enk A. Stadieneinteilung beim malignen Melanom

Pföhler C., Tilgen W. Epidemiologie

Pföhler C., Tilgen W. Verhaltensbedingte Risikofaktoren

Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67: 425-79, 1998

Hoek K., Rimm D.L., Williams K.R., Zhao H., Ariyan S., Lin A., Kluger H.M., Berger A.J., Cheng E., Trombetta E.S., Wu T., Niinobe M., Yoshikawa K., Hannigan G.E., Halaban R. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.* 64(15): 5270-82, 2004

Hofmann W.-K. (Hrsg.) Gene expression profiling by microarrays. Cambridge University Press, New York, 2006

Homepage von Bio Davidson:

www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chip/chip.html

Homepage des GraphPad Prism Programms: <http://www.graphpad.com>

Homepage des NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Homepage des NIH: <http://www.nih.gov>

Homepage des NLM: <http://www.nlm.nih.gov>

Hoogduijn M.J., Hitchcock I.S., Smit N.P., Gillbro J.M., Schallreuter K.U., Genever P.G. Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression of MiTF. *Pigment Cell Res.* 19(1): 58-67, 2006

Humphries M.J. Integrin Structure. *Biochem Soc Trans.* 28(4): 311-39, 2000

Iervolino A., Triscioglio D., Ribatti D., Candiloro A., Biroccio A., Zupi G., Del Bufalo D. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *FASEB J.* 16(11): 1453-55, 2002

Ji J.D., Ivashkiv L.B. Roles of semaphorins in the immune and hematopoietic system. *Rheumatol Int.* 29(7): 727-34, 2009

Kim M., Gans J.D., Nogueira C., Wang A., Paik J.H., Feng B., Brennan C., Hahn W.C., Cordon-Cardo C., Wagner S.N., Flotte T.J., Duncan L.M., Granter S.R., Krasagakis K., Garbe C., Oranos C.E. Cytokines in human melanoma cells: synthesis, autocrine stimulation and regulatory functions: an overview. *Melanoma Res.* 3(6): 425-33, 1993

Kristensen C.N., Bystol K.M., Li B., Serrano L., Brenneman M.A. Depletion of DSS1 protein disables homologous recombinational repair in human cells. *Mutat Res.* 694(1-2): 60-64, 2010

Kuphal S., Bauer R., Bosserhoff A.K. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24(2): 195-222, 2005

Kyriakis J.M., Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81(2): 807-69, 2001

Lázár-Molnar E., Hegyesi H., Tóth S., Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 12(6): 547-54, 2000

Levy C., Khaled M., Fisher D.E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med.* 12(9): 406-14, 2006

Li G., Satyamoorthy K., Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 61(9): 3819-25, 2001

Li J., Zou C., Bai Y., Wazer D.E., Band V., Gao Q. DSS1 is required for the stability of BRCA2. *Oncogene.* 25(8): 1186-94, 2006

Madonna G., Ullman C.D., Gentilcore G., Palmieri G., Ascierto P.A. NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma. *J Transl Med.* 10: 53, 2012

Marshall J.F., Rutherford D.C., Happerfield L., Hanby A., McCartney A.C., Newton-Bishop J., Hart I.R. Comparative analysis of integrins *in vitro* and *in vivo* in uveal and cutaneous melanomas. *Br J Cancer* 77(4): 522–29, 1998

MAQC Consortium. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol.* 24(9): 1151-61, 2006

McNulty S.E., del Rosario R., Cen D., Meyskens F.L. Jr., Yang S. Comparative expression of NFkappaB proteins in melanocytes of normal skin vs. benign intradermal naevus and human metastatic melanoma biopsies. *Pigment Cell Res.* 17(2): 173-80, 2004

Meyle K.D., Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet.* 126(4): 499-510, 2009

Midovnik M., Koren R., Ziv E., Ravid A. The inflammatory response of keratinocytes and its modulation by vitamin D: the role of MAPK signaling pathways. *J Cell Physiol.* 227(5): 2175-83, 2012

Moll I. (Hrsg.) Dermatologie. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010

Müller H.J., Röder T. Der Experimentator. Microarrays. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2004

Müller M.W., Giese N.A., Swiercz J.M., Ceyhan G.O., Esposito I., Hinz U., Büchler P., Giese T., Büchler M.W., Offermanns S., Friess H. Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 121(11): 2421-33, 2007

Na Y.R., Seok S.H., Kim D.J., Han J.H., Kim T.H., Jung H., Lee B.H., Park J.H. Bone morphogenetic protein 7 induces mesenchymal-to-epithelial transition in melanoma cells, leading to inhibition of metastasis. *Cancer Sci.* 100(11): 2218-25, 2009

Norris W. Eight cases of melanosis with pathological and therapeutical remarks on that disease. Longman, Brown, Green, Longman and Roberts, London, 1857

Nuber U.A. (Hrsg.) DNA Microarrays. Taylor & Francis Group, Abingdon, 2005

O'Connor B.P., Ting J.P. The evolving role of semaphorins and plexins in the immune system: Plexin-A1 regulation of dendritic cell function. *Immunol Res.* 41(3): 217-22, 2008

Ohh M., Park C.W., Ivan M., Hoffman M.A., Kim T.Y., Huang L.E., Pavletich N., Chau V., Kaelin W.G. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol.* 2(7): 423-27, 2000

Okamoto I., Pirker C., Bilban M., Berger W., Losert D., Marosi C., Haas O.A., Wolff K., Pehamberger H. Seven novel and stable translocations associated with oncogenic gene expression in malignant melanoma. *Neoplasia.* 7(4): 303-711, 2005

Penna E., Orso F., Cimino D., Tenaglia E., Lembo A., Quaglino E., Poliseno L., Haimovic A., Osella-Abate S., De Pittà C., Pinatel E., Stadler M.B., Provero P., Bernengo M.G., Osman I., Taverna D. microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *EMBO J.* 30(10): 1990-2007, 2011

Poser I., Bosserhoff A.K. Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histol Histopathol.* 19(1): 173-88, 2004

Poser I., Golob M., Weidner M., Buettner R., Bosserhoff A.K. Down-regulation of COOH-terminal binding protein expression in malignant melanomas leads to induction of MIA expression. *Cancer Res.* 62(20): 5962-66, 2002

Potti A., Hille R.C., Koch M. Immunohistochemical determination of HER-2/neu overexpression in malignant melanoma reveals no prognostic value, while c-Kit (CD117) overexpression exhibits potential therapeutic implications. *J Carcinog.* 2(1): 8, 2003

Quint K.D., van der Rhee J.I., Gruis N.A., Ter Huurne J.A., Wolterbeek R., van der Stoep N., Bergman W., Kukutsch N.A. MC1R Variants in High Melanoma Risk Patients are Associated with Specific Dermoscopic ABCD Features. *Acta Derm Venereol.* 92(6): 587-92, 2012

Rieger J., Wick W., Weller M. Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins. *Glia.* 42(4): 379-89, 2003

Roda J.M., Wang Y., Sumner L.A., Phillips G.S., Marsh C.B., Eubank T.D. Stabilization of HIF-2 α Induces sVEGFR-1 Production from Tumor-Associated Macrophages and Decreases Tumor Growth in a Murine Melanoma Model. *J Immunol.* 189(6): 3168-77, 2012

Rodeck U. Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development. *Cancer Metastasis Rev.* 12(3-4): 219-26, 1993

Ross D.T., Scherf U., Eisen M.B., Perou C.M., Rees C., Spellman P., Iyer V., Jeffrey S.S., Van de Rijn M., Waltham M., Pergamenschikov A., Lee J.C., Lashkari D., Shalon D., Myers T.G., Weinstein J.N., Botstein D., Brown P.O. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 24(3): 227-35, 2000

Rothhammer T., Poser I., Soncin F., Bataille F., Moser M., Bosserhoff A.K. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res.* 65(2): 448-56, 2005

Rubin R., Strayer D.S. Rubin's Pathology. Clinicopathologic foundations of medicine. 5. Ausgabe, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2008

Salven P., Heikkilä P., Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br J Cancer.* 76(7): 930-34, 1997

Sebastian G., Stein A. Das maligne Melanom der Haut. 2. Auflage, Uni-med Verlag AG, Bremen, 2006

Shih I.M., Herlyn M. Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma. *In vivo* 8(1): 113-23, 1994

Shih I.M., Herlyn M. Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol.* 100(2 Suppl): 196S-203S, 1993

Shoemaker R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screening. *Nat Rev Cancer.* 6(10): 813-23, 2006

Silye R., Karayiannakis A.J., Syrigos K.N., Poole S., van Noorden S., Batchelor W., Regele H., Sega W., Boesmueller H., Krausz T., Pignatelli M. E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 186(4): 350-55, 1998

Smiley A.K., Klingenberg J.M., Aronow B.J., Boyce S.T., Kitzmiller W.J., Supp D.M. Microarray analysis of gene expression in cultured skin substitutes compared with native human skin. *J Invest Dermatol.* 125(6): 1286-1301, 2005

Smith A.P., Hoek K., Becker D. Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas. *Cancer Biol Ther.* 4(9): 1018-29, 2005

Stahlecker J., Gauger A., Bosserhoff A., Büttner R., Ring J., Hein R. MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer Res.* 20(6D): 5041-44, 2000

Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 7(3): 165-68, 2007

Tajima N., Schönherr K., Niedling S., Kaatz M., Kanno H., Schönherr R., Heinemann S.H. Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1alpha and the von Hippel-Lindau protein. *J Physiol.* 571(Pt 2): 349-59, 2006

Talantov D., Mazumder A., Ju J.X., Briggs T., Jiang Y., Backus J., Atkins D., Wang Y. Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. *Clin Cancer Res.* 11(20): 7234-42, 2005

Tamagnone L., Artigiani S., Chen H., He Z., Ming G.I., Song H., Chedotal A., Winberg M.L., Goodman C.S., Poo M., Tessier-Lavigne M., Comoglio P.M. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell.* 99(1): 71-80, 1999

Tamagnone L., Comoglio P.M. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol.* 10(9): 377-83, 2000

Tetsu O., McCormick F. Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell.* 3(3): 233-45, 2003

Trisciuglio D., Gabellini C., Desideri M., Ziparo E., Zupi G., Del Bufalo D. Bcl-2 regulates HIF-1alpha protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90. *PLoS One*. 5(7): e11772, 2010

Ugurel S. Serummarker des malignen Melanoms. *Hautarzt*. 56(2): 173-86, 2005

Van Groningen J.J., Bloemers H.P., Swrat G.W.: Identification of melanoma inhibitory activity and other differentially expressed messenger RNAs in human melanoma cell lines with different metastatic capacity by messenger RNA differential display. *Cancer Res.*, 55(24): 6237-43, 1995

Venza M., Catalano T., Visalli M., Venza I., Lentini M., Curia M.C., Mariani-Costantini R., Teti D. Association of the DSS1 c.143G>A polymorphism with skin squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 130(6): 1719-25, 2010

Wei S.J., Trempus C.S., Cannon R.E., Bortner C.D., Tennant R.W. Identification of Dss1 as a 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive gene expressed in keratinocyte progenitor cells, with possible involvement in early skin tumorigenesis. *J Biol Chem*. 278(3): 1758-68, 2003

Wei S.J., Williams J.G., Dang H., Darden T.A., Betz B.L., Humble M.M., Chang F.M., Trempus C.S., Johnson K., Cannon R.E., Tennant R.W. Identification of a specific motif of the DSS1 protein required for proteasome interaction and p53 protein degradation. *J Mol Biol*. 383(3): 693-712, 2008

Woodman S.E., Davies M.A. Targeting KIT in melanoma: a paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics. *Biochem Pharmacol*. 80(5): 568-74, 2010

Zhao X.Y., Chen L., Li Y.H., Xu Q. PlexinA1 expression in gastric carcinoma and its relationship with tumor angiogenesis and proliferation. *World J Gastroenterol*. 13(48): 6558-61, 2007

Zlotogora J. On the inheritance of the split hand/split foot malformation. *Am J Med Genet.* 53(1): 29-32, 1994

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung(en)
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Akral lentiginöses Melanom
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BRD	Bundesrepublik Deutschland
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A/B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B
cm	Zentimeter
cDNA	complementary DNA / copy DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente
CtBP1	C-terminal binding protein 1
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinacid, deutsch: Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
et al.	et alii (“unter anderem”)
etc.	et cetera
FAMMM	Familial Atypical Multiple Mole Melanoma (atypisches

	Nävussyndrom)
FDA	Food and Drug Administration
for	forward
FOXD1	Forkhead box D1
G	Guanin
g	Gramm
GEO	Gene Expression Omnibus
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxie-induzierbare Faktoren
HMG	High mobility group
IL	Interleukin
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
K ⁺	Kalium
k	Kilo
KCNN2	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2
l	Liter
LC	Light Cyclers
LDH	Laktatdehydrogenase
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
m	Milli
m	Meter
M	Mol, molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MAQC	MicroArray Quality Control
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
MGP	Metastatic Growth Phase
MGSA	Melanoma Growth Stimulatory Activity
MIA	Melanoma Inhibitory Activity
MIAME	Minimum Information About a Microarray Experiment
min	Minute(n)

MITF	Microphthalmia-Associated Transcription Factor
mm/mm ²	Millimeter/ Quadratmillimeter
mRNA	messenger RNA
μ	Mikro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCI	National Cancer Institute
NEDD9	Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9
NFκB	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells
NHEM	normale humane epidermale Melanozyten
NIH	National Institute of Health
NLM	National Library of Medicine
nm	Nanometer
NM	Noduläres Melanom
NMDA	N-Methy-D-Aspartat
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma, deutsch: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, deutsch: Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PLXNA1	Plexin A1
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
rev	reverse
RGP	Radial Growth Phase, deutsch: radiale Wachstumsphase
RNA	Ribonucleinacid, deutsch: Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
sek	Sekunde(n)
SHFM1	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1
siRNA	Small interfering RNA

SMART	Standard Microarray Reporting Template
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
TNM	System zur Tumor-Stadieneinteilung (T: Tumordicke, N: Node = Lymphknoten, M: Metastase)
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
U/min, UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VGP	Vertical Growth Phase, deutsch: vertikale Wachstumsphase
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff für die gute Betreuung dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank für die vielen Gespräche, Erklärungen, Anregungen und Hilfestellungen während der letzten Jahre!

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg durchführen zu können.

Vielen Dank auch an Jennifer Schmidt, meiner Laborbetreuerin, die mich mit dem Laborleben vertraut gemacht hat und mir geduldig alles gezeigt und erklärt hat.

Danke auch an Alex, ohne den ich vielleicht immer noch nicht mit der Gelelektrophorese fertig wäre, Susanne für ein immer offenes Ohr und viele Hilfestellungen und an das ganze restliche Laborteam.

Vielen Dank auch an Frau Anne-Kathrin Merz für die Statistik-Notfallsprechstunde und ihre Hilfe bei der Auswahl der richtigen Signifikanztests.

Ganz besonders danken möchte ich auch meinen beiden Mitstreitern Susi und Markus für die ständige Hilfe, Motivation und vor allem auch für die Freundschaft in den letzten Jahren.

Vielen vielen Dank auch an Kathi für die große Hilfe bei der Formatierung und an Johanna für das ausführliche und fachmännische Korrekturlesen.

Allen Freunden gilt mein Dank dafür, dass sie sich unentwegt meine Probleme anhörten und mich immer wieder motiviert haben.

Zuletzt ein großer Dank an meine Familie für das häufige Ausdrucken von halbfertigen Versionen und Papern, fürs Korrekturlesen, für die Hilfe bei so mancher Abbildung und natürlich dafür, dass sie mir das Studium und damit auch diese Promotion überhaupt erst ermöglicht haben.

8 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Sonja Maria Hetterich
Geburtsdatum: 24. Februar 1986
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: ledig

Schullaufbahn

1992 – 1996 Grundschule Arnstein
1996 – 2005 Johann-Schöner-Gymnasium, Karlstadt
2005 Allgemeine Hochschulreife

Studium

2005 – 2012 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
08/2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Würzburg, den 20.02.2013

Sonja Hetterich

ERKLÄRUNG ZUM PROMOTIONSVERFAHREN

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Name: Hetterich
Vorname: Sonja
geb. am: 24.02.1986
in: Würzburg

Ich erkläre,

- dass ich den **Doktorgrad der Medizin** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des **medizinischen Doktorgrades** zugelassen bin
- dass ich die **medizinische Doktorprüfung** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)