

AUS DER DERMATOLOGISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK
DIREKTOR: PROF. DR. MED. MICHAEL LANDTHALER
UND
DEM INSTITUT FÜR GENETIK, NWFIII
DIREKTOR: PROF. DR. RER. NAT. RÜDIGER SCHMITT
DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Molekulare Determinanten des
Melanomwachstums, der Invasion und der
Metastasierung: Eine Analyse basierend auf
RNA-Fingerprinting und cDNA-Arrays**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Gerhard Rumpler
aus Amberg

2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 2. Februar 2001

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. med. Thomas Vogt (med. Fak.)

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

1. Prüfer: Prof. Dr. rer.-nat. Rüdiger Schmitt (NWFIII)

2. Prüfer: PD Dr. med. Thomas Vogt (med. Fak.)

3. Prüfer: Prof. Dr. Schneuwly (NWFIII)

Ersatzperson: Prof. Dr. Will Minuth

für Theresia und Friedrich

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Nukleinsäureextraktion.....	10
2.1.1.	Nukleinsäureextraktion aus Zellen	10
2.1.1.1.	Zellkultur und verwendete <i>in vitro</i> Modelle	11
2.1.2.	Nukleinsäureextraktion aus Gewebestücke von menschlichen	13
	Hauttumoren	
2.1.3.	Nukleinsäureextraktion aus mikrodissezierten Geweben.....	15
	(Kryostatschnitte)	
2.2.	Generierung von cDNA.....	16
2.2.1.	Oligo(dT) geprägte cDNA Synthese	18
2.2.2.	“Random geprägte” cDNA Synthese.....	18
2.3.	RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR).....	18
2.3.1.	Grundlegendes zur Technik	19
2.3.2.	Klonierung von Fragmenten aus Fingerprint-Banden	22
2.3.2.1.	Isolierung von RAP-PCR Produkten aus PAA-Gelen	22
2.3.2.2.	Reamplifizierung der RAP-Fragmente mittels PCR	22
2.3.2.3.	Reinigung der RAP-PCR Produkte mittels SSCP Gelelektrophorese	23
2.3.2.4.	TA-Klonierung der RAP-Fragmente	23
2.3.2.5.	Blau-Weiss-Selektion.....	24
2.3.2.6.	Sequenzierung und Sequenzanalyse	25
2.3.3.	Bestätigung differentieller Expression.....	26
2.3.3.1.	Northernblotanalyse	27
2.3.3.2.	Semiquantitative PCR	28
2.3.3.3.	Reverse Northern Blots.....	29
2.4.	Synthese ds-cDNA aus Nanomengen von RNA	30
2.4.1.	SMART-PCR.....	30
2.4.2.	Differential display/RAP-PCR von SMART cDNA	33
2.5.	cDNA-Arrays	34
2.5.1.	Verwendete cDNA-Arrays	34
2.5.1.1.	Kommerzielle Formate und Arrays des Ressourcenzentrums	34
2.5.1.2.	Herstellung von Arrays mit eigener Auswahl der Target-cDNAs.....	36
2.5.2.	Probengenerierung	37
2.5.3.	Hybridisierung	38
2.5.4.	Autoradiografie (Röntgenfilm u. Phosphoimager).....	40
2.5.5.	Messung und Auswertung der Signalintensitäten	40
2.5.6.	Identifizierung der regulierten Kandidatengene	42
2.5.7.	Bestätigende Verfahren	43

3.	Ergebnisse	44
3.1.	RAP-PCR	44
3.1.1.	RAP-PCR an Gewebematerial.....	44
3.1.1.1.	Differenzielle Genexpression in melanozytären Tumoren	44
	unterschiedlicher Dignität	
3.1.2.	RAP-PCR an Zelllinien der in vitro Modelle.....	48
3.1.2.1.	Differenzielle Genexpression in melanozytären Tumorzellen	
	unterschiedlicher Dignität.....	51
3.1.2.2.	Einzelne Kandidatengene mit differentieller Regulation.....	54
3.2.	SMART-RAP: Möglichkeiten des Differential Displays aus	
	Nanomengen von RNA	58
3.3.	cDNA-Arrays	61
3.3.1.	Differenzielle Genexpression in melanozytären Tumorzellen	
	unterschiedlicher Dignität.....	61
3.3.2.	Bestätigung einzelner Kandidatengene	63
3.3.2.1.	Osteonectin	63
3.3.2.2.	Ubiquitin	63
3.3.2.3.	Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)	65
3.3.2.4.	PMEL17	65
3.3.2.5.	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase.....	65
3.3.2.6.	Kathepsin Z	67
4.	Diskussion.....	67
4.1.	Das maligne Melanom der Haut.....	67
4.1.1.	Klinik und Epidemiologie.....	67
4.1.2.	Diagnostik und Prognostik des malignen Melanoms	69
4.1.3.	Gundlegendes zur Progression auf molekularer Ebene	72
4.2.	Das Paradigma der differentiellen Genexpression.....	80
4.3.	Entwicklung der auf PCR basierenden Verfahren.....	82
4.4.	Revolutionäre Möglichkeiten der Arraytechnik	85
4.5.	Wahl des geeigneten Untersuchungsmaterials	89
4.5.1.	Verwendung von Patientengewebe	89
4.5.2.	Untersuchung an Zellkulturmodellen.....	91
4.6.	Diskussion der Methoden	92
4.6.1.	RNA-arbitrarily primed PCR	92
4.6.2.	cDNA Array Technologie.....	94
4.6.3.	Methodischer Vergleich der Verfahren zur Analyse der	
	Genexpression	97
4.7.	Differenteille Genexpression im Rahmen der Melanomprogression	99
4.7.1.	RAP-Befunde an Geweben und in vitro Modellen.....	101
4.7.1.1.	Entdeckung neuer, seltener cDNA-Sequenzen mithilfe der	
	RAP- PCR	102
4.7.1.2.	cDNA Array Befunde an in vitro Modellen.....	104

4.8.	Bestätigte molekulare Determinanten der Melanomprogression im Einzelnen	104
4.8.1.	Osteonectin/SPARC	105
4.8.2.	Ubiquitin	107
4.8.3.	Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)	110
4.8.4.	PMEL17	111
4.8.5.	NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase	113
4.8.6.	Kathepsin Z	114
4.9.	Targetvalidierung zur prognostisch-diagnostischen und therapeutischen Anwendung: Ausblick und experimentelle Neuansätze	116
5.	Zusammenfassung	118
6.	Literaturverzeichnis	121
7.	Anhang	131
	Abkürzungen	131
	Danksagung	132
	Lebenslauf	133
	Erklärung	134

1. Einleitung

Bis heute stützt sich die Diagnostik und Prognostik des malignen Melanoms auf histologische und histopathologische Befunde. Die Unterscheidung zwischen gutartigen melanozytären Nävi und malignen Melanomen anhand morphologischer Kriterien ist jedoch oftmals nicht eindeutig (Farmer E et al., 1996). Zwar konnte die klinische „Treffsicherheit“ durch technische Entwicklungen wie beispielsweise die Dermatoskopie erhöht werden (Nachbar F et al., 1994; Stolz W et al., 1994), in bestimmten Fällen ist eine eindeutige Diagnose aber selbst für einen erfahrenen Dermatologen nicht zweifelsfrei möglich (Farmer E et al., 1996). Die frühzeitige Diagnose und Entfernung des Primärtumors ist jedoch nach wie vor die wichtigste Waffe im Kampf gegen fatale klinische Verläufe und für eine erfolgreiche Behandlung des Melanoms essentiell. Entsprechend werden viele Läsionen, die suspekt erscheinen, exzediert mit allen damit verbundenen Risiken und Kosten. Anschließend muss der Pathologe die Differenzierung anhand des als Goldstandard geltenden histologischen Bildes vornehmen. Allerdings, in Analogie zur Klinik, ist hier die Morphologie ebenfalls in vielen Fällen zweifelhaft und Arzt und Patient werden mit der Unsicherheit einer fraglichen Diagnose und Prognose belastet (Farmer E et al., 1996). Diagnostisch aussagefähige molekulare Marker sind bisher genauso wenig etabliert wie prognostisch relevante biologische Merkmale.

Das führt zu einem weiteren Problem: Die Entwicklung neuer, kombinierter Immuno-Chemotherapien in den letzten Jahren hat zu einer Verbesserung der Überlebenschance von Patienten mit Hochrisikomelanomen geführt. Die meisten Therapien, z.B. die hochdosierte α -Interferon-Therapie, sind mit dem Risiko gelegentlich massiver Nebenwirkungen belastet (Schafer M et al., 1999). Überflüssige adjuvante Therapien sollten daher vermieden werden. Dies setzt jedoch eine möglichst genaue Einschätzung der Prognose des Melanoms voraus. Bislang werden hierfür histopathologische Kriterien wie Tumordicke und Eindringtiefe, definiert durch den sogenannten Clark-Level, herangezogen (Clark WH, Jr. et al., 1984). Bei sehr dicken Melanomen (> 4 mm) verliert die Tumordicke an Signifikanz. Da auch dünne Melanome mit vermeintlich geringerem Metastasierungsrisiko gelegentlich tödliche Verläufe zeigen, bleibt die prospektive Einschätzung des klinischen Verlaufes oftmals unsicher.

Aufgrund dieser Situation bildet die Suche nach neuen diagnostisch-prognostisch validen Markern auf molekularer Ebene einen Schwerpunkt der dermatoonkologischen Forschung.

In seiner klassischen Arbeit von 1984 postulierte Wallace Clark erstmals, dass die Progression des malignen Melanoms schrittweise erfolgt und über mehrere Zwischenstufen führt (Clark WH, Jr. et al., 1984). Er unterteilte die Gesamtheit melanozytärer Läsionen aufgrund histomorphologischer Merkmale in distinkte Untergruppen, die sich im Sinne der Progression von klar benigne (melanozytärer Návus) hin zu klar maligne (metastasierfähiges Melanom) einordnen lassen. In neueren Untersuchungen, basierend auf molekulargenetischen Methoden, wurde inzwischen bestätigt, dass diese morphologisch definierte Progression des malignen Melanoms mit grundlegenden und vielschichtigen Veränderungen der Genexpression einhergeht. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Melanome ihr Wachstum autokrin stimulieren, indem sie sowohl Wachstumsfaktoren wie z.B. bFGF, als auch deren entsprechende Rezeptoren vermehrt produzieren (Albino A et al., 1991; Becker D et al., 1992). Die Überexpression einer Reihe von Zytokinen wie IL10, IL8 oder TGF β , hemmt die Reaktion des Immunsystems, während der Tumor selbst gegenüber der wachstumssuppressiven Aktivität solcher Faktoren resistent wird (Becker JC et al., 1994; Rodeck U et al., 1991). Invasions- und Migrationsvorgänge des Primärtumors werden begleitet von einer verstärkten Expression von Kollagenasen und anderer Metalloproteininasen (Goldberg G et al., 1990). Sie zersetzen das feste Netzwerk der Dermis und erleichtern so das Vordringen des Tumors in tiefere Hautschichten und den Anschluss an das Gefäßsystem. Dabei beobachtet man auch eine Veränderung der Expression von Oberflächenmolekülen, die bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten eine wichtige Rolle spielen. Beispiele hierfür sind die Überexpression von Integrinen und verschiedener Mitglieder der CAM Familie (z.B. MUC18, VCAM, ICAM, u.a.) (Denton KJ et al., 1992), sowie die Umstellung der Cadherinexpression von E-Cadherin zu N-Cadherin (Hsu MY et al., 1996).

Die hier zitierten Forschungsergebnisse beschreiben wahrscheinlich nur einen kleinen Teil der expressionsgenetischen Veränderungen, die im Verlauf der Entwicklung vom melanozytären Návus zum metastasierenden Melanom auftreten.

Wenn es gelingen würde, expressionsgenetische Profile – sozusagen genetische Fingerabdrücke – von diskreten biologischen Phänotypen zu erstellen und anhand dieser Expressionsmuster gutartige von bösartigen Phänotypen mit variabler Prognose sicher zu unterscheiden, könnte die Diagnostik und Prognostik des Melanoms in Zukunft entscheidend verbessert werden. Die damit verknüpften Einblicke in molekulargenetische Abläufe während der Melanomprogression könnten weiterhin helfen, neue effizientere Therapieansätze gegen das maligne Melanom in einer adjuvanten Situation (Zustand nach Primärtumoroperation) und im Falle der Metastasierung zu entwickeln. In dieser Richtung einen Schritt zu tun, ist exakt die Zielsetzung der vorgelegten Arbeit.

In den letzten Jahren wurden verschiedene molekularbiologische Techniken zur Untersuchung differentieller Genexpression entwickelt. Zu den gängigen Methoden zählen u.a. die sogenannte subtraktive Hybridisierung von cDNA-Bibliotheken, das “differential display” nach P. Liang und A.B. Pardee (Liang P and Pardee A, 1992), die von J. Welsh und M. McClelland etablierte “RNA arbitrarily primed PCR” (RAP-PCR) (Peinado MA et al., 1992; Perucho M et al., 1995; Ralph D et al., 1993; Vogt T et al., 1997) und die “Serial analysis of gene expression” (SAGE) nach Velculescu (Velculescu V et al., 1995). Das “differential display” und die RAP-PCR basieren auf dem Prinzip der RT-PCR, d.h. die RNA wird zunächst global durch eine Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA übersetzt und in einer anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert. Im Gegensatz zur klassischen RT-PCR, die auf die spezifische Darstellung eines einzelnen Produktes abzielt, steht bei beiden als “multiple arbitrary amplicon techniques” bezeichneten Methoden die Darstellung einer möglichst großen Auswahl an RNA-Spezies eines RNA-Pools im Vordergrund. So werden Unterschiede in der Abundanz einzelner RNA Spezies sichtbar, eine Information von hohem Wert im Sinne obiger Zielsetzungen (Vogt T et al., 1997).

Im Verlauf dieser Arbeit hat eine weitere Technik zur Untersuchung differentieller Genexpression eine bedeutsame Entwicklung erfahren: die cDNA-Array-Technologie (Trent et al., 1999). Hierbei werden Tausende von cDNAs auf Trägermaterialien wie z.B. Nylonmembranen oder Glasplättchen fixiert und mit radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten komplexen RNA-Proben beziehungsweise cDNA-Proben hybridisiert. Da die “Target”-cDNAs auf dem Array bekannt sind und nicht durch weitere aufwendige Verfahren bestimmt werden müssen – wie bei

“differential display” und RAP-PCR üblich -, ist die Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte bei dieser Methode schneller und einfacher als bei den klassischen Tools möglich. Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe von kommerziellen und nicht-kommerziellen Arrayformaten. Neben kleineren Arrays, die einige hundert, zu einem bestimmten Thema ausgewählte cDNAs tragen, werden auch große, Tausende cDNA-Klone umfassende Filter für genomweites “Screening” angeboten. Durch den kombinierten Einsatz klassischer Tools insbesondere der RAP-PCR und den neuen Array-gestützten Verfahren gelang es in der vorliegenden Arbeit ein Set von molekularen Markern an Geweben und in in vitro Modellen zu definieren, das für obige Zielsetzung eines besseren Tumorpatientenmanagements potentiell von hohem Wert sein kann. Zudem wurden viele neue Partial-cDNA Sequenzen in Melanomen identifiziert. Aufbauend auf dieser Information ergeben sich neue Perspektiven für Diagnostik, Prognostik und nicht zuletzt neue Ansätze für weiterführende molekularbiologische Arbeiten.

2. Material und Methoden

2.1. Nukleinsäureextraktion

2.1.1. Nukleinsäureextraktion aus Zellen

Als Ausgangsmaterial für die Generierung von konventioneller cDNA oder SMART-cDNA wurde gesamtzelluläre RNA oder poly(A)-RNA aus Geweben und Zellen hergestellt. Für die Extraktion von gesamtzellulärer RNA aus kultivierten Zellen oder Geweben wurde in erster Linie das RNeasy-Protokoll der Firma Qiagen verwendet. Dieses System beruht auf der selektiven Bindung von RNA an eine mineralische Matrix, die in Zentrifugensäulen eingebracht ist. Die RNA kann auf den Säulen weiter gereinigt werden und anschließend weitgehend frei von DNA Kontamination eluiert werden.

Hierzu werden Zellen aus der Kultur oder aus Geweben nach entsprechender Präparation (siehe Punkt 2.1.2.) zunächst in einem speziellen, Guanidin Isothiocyanat(GITC)-haltigen Puffer lysiert. GITC wirkt stark denaturierend und inaktiviert schädliche RNasen. Nach Zugabe von 70 %igem Ethanol wird das Zelllysat in Zentrifugensäulen gefüllt. Hohe Salzkonzentrationen im Puffersystem

fördern die Anlagerung längerer RNA-Moleküle (<200 Nukleotide) an eine Silica-Matrix, während kleine RNAs, wie z.B. 5,8S RNA, 5S RNA und tRNAs ungehindert passieren. In mehreren darauf folgenden Waschschritten werden ungebundene RNA-Moleküle entfernt und Proteine und Melanin auf akzeptable (spektrophotometrisch zu kontrollierende) Werte reduziert. Verunreinigungen durch genomische DNA liegen im Bereich von etwa 1% der gewonnenen Nukleinsäurefraktion. Wegen ihrer etwa 10-fach höheren Sequenzkomplexität kann diese Rest-DNA u.U. sehr effizient in der RAP-PCR mit amplifiziert werden (Vogt T et al., 1997). Sie muss daher mit RNase-freier DNase I (0,12 U/µl; Statagene, San Diego, CA) unter dem Schutz von RNase-Inhibitor (0,02 U/µl Boehringer, Mannheim) in einem 0,01M Tris-Mg-puffer verdaut werden (30 Min., 37°C). Die anschließende Reinigung erfolgt wiederum über RNeasy-Zentrifugensäulen, gemäß RNeasy-Protokoll (s.o.). Da sämtliche Arbeitsschritte in einer Tischzentrifuge durchgeführt werden können, ist diese Methode zeitsparender als klassische, ebenfalls auf GITC beruhende Methoden wie zum Beispiel die Cäsiumdichthegradienten-Methode nach Chirgwin et al. (Sambrook J et al., 1989).

Nach der spektrophotometrischen Mengenbestimmung und Überprüfung der Intaktheit der 28S und 18S rRNA-Bande im Ethidiumbromid-gefärbten, 1,5 %igen Agarosegel wird die präparierte RNA bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert.

Gelegentlich wurde in einigen Schritten aus der gesamtzellulären RNA mRNA angereichert. Die Aufreinigung von poly(A)-RNA aus gesamtzellulärer RNA wurde mithilfe des Dynabead-Systems von Dynal (Norwegen) durchgeführt. Diese Methode nutzt magnetische Partikel, an die Oligo(dT)-Ketten gekoppelt sind. Da nur messenger RNAs mit ihren poly(A)-“Tails” an diese Oligo(dT)-Ketten binden können, werden diese durch Einsatz eines Magneten effizient angereichert.

2.1.1.1. Zellkultur und verwendete *in vitro* Modelle

Die mit der Entwicklung des malignen Melanoms einhergehenden Veränderungen der Genexpression erfassen verschiedenste Teilespekte der Tumorprogression. Zum

Nachweis differentieller Genexpression hinsichtlich der Aspekte Tumorwachstum, Invasivität und Metastasierungsfähigkeit wurden aus Zelllinien folgender in vitro-Modelle RNAs gewonnen:

1. Ein isogenes System in dem humane Melanomzelllinien mit unterschiedlicher Tumorigenität sowie Multizytokinresistenz erzeugt wurden: Die aus den humanen Primärmelanom-Linien WM35 und WM1341B abgeleiteten Tochterlinien WM1341B-22 und WM1341B-23 bzw. WM35-32 und WM35-33 wurden durch wiederholte Passage (s.c. Injektion/Explantation/s.c.Injektion) in athymischen Nacktmäusen gewonnen und hinsichtlich zunehmender Tumorigenität (d.h. Tumorwachstum und Invasion ohne Beigabe von ECM-Komponenten, Matrigel) und Multizytokinresistenz (insbesondere TGF β) selektiert (Kobayashi H et al., 1994).
2. Ein isogenes System in dem humane Melanomlinien mit unterschiedlicher Invasivität erzeugt wurden: Die Tochterlinien HI ("hochinvasiv") und SI ("schwachinvasiv") der humanen Melanom-Zelllinie Mel Im wurden in Boyden-Kammern nach ihrer Fähigkeit, Matrigel-Membranen zu passieren, selektiert (Jacob K et al., 1995).
3. Ein isogenes System in dem humane Melanomlinien mit unterschiedlicher experimenteller Metastasierungspotenz erzeugt wurden: Die durch Nacktmauspassage erzeugten Varianten SM ("strongly metastatic") und P ("poorly metastatic") der Melanom-Linie A375M (M; "spontaneously metastatic after i.v. and s.c. injection") zeigen stark unterschiedliche Potenz zur Ausbildung von Lungenmetastasen in BALB/c Mäusen. C8161 bezeichnet in diesem System eine unabhängige Kontroll-Zelllinie, die aus Metastasen eines anderen nicht-isogenen Primärtumors etabliert wurde (Kozlowski JM et al., 1984).

Für alle Systeme haben die jeweiligen Autoren eine hohe Stabilität des betreffenden Genotyps und Phänotyps der Linien über multiple Passagen nachweisen können. Die Zellen wurden im Rahmen von "Kooperationsagreements" von den betreffenden Wissenschaftlern für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der Melanom-Zelllinien erfolgte in RPMI1640 Medium (Gibco) supplementiert mit 10% FKS bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%. Die Extraktion gesamtzellulärer RNA wurde wie oben beschrieben nach der RNeasy-Methode von Qiagen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen kurz in PBS gewaschen und durch Zugabe von 800 µl Lysis-Puffer (RLT, Firma Qiagen)/T175 Kulturflasche lysiert. Das Zell-Lysat wurde zunächst auf Homogenisiersäulen (QIAshredder) geladen und zentrifugiert. Dadurch werden verbleibende Partikel und genomische DNA in Bruchstücke zerkleinert, die in der weiteren Präparation stören würden. Das homogenisierte Material wird anschließend in RNeasy-Zentrifugensäulen gefüllt und entsprechend Protokoll weiterbehandelt (siehe Punkt 2.1).

2.1.2. Nukleinsäureextraktion aus Gewebestücken von menschlichen Hauttumoren

Trotz der experimentellen Vorteile, die in vitro Kulturen vor allem in Hinblick auf die Qualität und Quantität der daraus isolierbaren RNA bieten, ist die Übertragbarkeit solcher Modellsysteme auf das Humansystem *in vivo* nur unter Vorbehalt möglich. Daher besteht auch in der Melanomforschung das Bestreben, expressionsgenetische Studien wenn möglich an Geweben humaner melanozytärer Neoplasien, also beispielsweise an realen Tumoren durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb RNA auch aus verschiedenen melanozytären Nävi, Primärmelanomen und Melanom-Metastasen präpariert und mittels RNA-Fingerprinting auf differentielle Genexpression hin untersucht. Da die dermatologische Klinik in Regensburg über eine Gewebebank mit inzwischen >2000 Gewebeproben, die direkt nach der Operation in Flüssigstickstoff eingefroren wurden und bei -80°C lagern, verfügt, konnte hierbei auf eine beachtliche Sammlung menschlicher melanozytärer und nicht-melanozytärer Hauttumoren zurückgegriffen werden.

Allerdings setzen Methoden wie das RNA-Fingerprinting gewisse Mengen an qualitativ einwandfreier RNA voraus (Vogt T et al., 1997). Die Isolierung von RNA aus Geweben ist jedoch oftmals ein problembehaftetes Unterfangen. Zum einen muss bei jedem Arbeitsschritt darauf geachtet werden, dass die RNA vor Degradation, z.B. durch RNasen geschützt wird. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich kältefixiertes Gewebematerial verwendet und penibel darauf geachtet, dass die Gewebeproben während der Präparation nicht auftauen. Zum

anderen sollte, da die Gewebeexzision eines humanen Hauttumors - im Gegensatz zur Zellkultur - meist aus mehreren unterschiedlichen Zelltypen besteht, die RNA aus Tumorgewebe gewonnen werden, das *bona fide* frei von Bindegewebe und Epidermis ist. Daher ist die Präparation von Melanomzellen oder Melanozyten aus einem Gewebeverband ein weiterer kritischer Arbeitsschritt. Um die Gefahr der Kontamination mit umliegenden Gewebe zu minimieren wurde folgende Vorgehensweise gewählt (Vogt T et al., 1998):

Zunächst wurden anhand der in einer Gewebedatenbank gespeicherten Informationen solche Tumoren ausgewählt, die aufgrund ihrer klinischen Einstufung große Melanozyten- oder Melanomzellverbände erwarten ließen, z.B. kongenitale Nävi, vertikal-wachsende Primärmelanome oder Melanommetastasen. Die Überprüfung und Beurteilung dieser vorselektierten Gewebeproben erfolgte anhand histologischer HE-Präparate, die nach der Operation routinemäßig bei jeder Gewebeexzision angefertigt werden.

Von den dabei ausgewählten Geweben wurden Kryoschnitte perpendikulär zur Hautoberfläche hergestellt und einer HE-Färbung unterzogen. Sie dienten als Kontrolle um vor und während der Gewebedissektion eine räumliche Vorstellung von der Lage des Tumors im Gewebepräparat zu haben. Die meist vorhandene Pigmentierung der Hautoberfläche half oft zusätzlich bei der Orientierung. Unter zu Hilfenahme eines Binokulars wurden dann größere Tumoreale mit einem Skalpell herausgearbeitet und sofort in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit RLT-Lysispuffer (Qiagen) überführt. Die Präparation wurde, auf einer Kühlplatte bzw. im Kryostat durchgeführt, um ein Auftauen des Gewebestückes zu verhindern. Das gesammelte Tumormaterial wurde anschließend mit "Glaskolben-douncern" soweit wie möglich direkt in dem Qiagen-Lysispuffer homogenisiert. Die dann meist vorliegende trübe Flüssigkeit mit kleineren Gewebepartikeln wurde auf Homogenisiersäulen (QIA-Shredder) geladen und zentrifugiert. Hierbei werden störende Gewebepartikel entfernt und die Viskosität der Lösung wird gesenkt, was die weitere Verarbeitung erleichtert. Die anschließende Extraktion der RNA erfolgte wie bereits beschrieben über das RNeasy-System (siehe Punkt 2.1).

2.1.3. Nukleinsäureextraktion aus mikrodisseziertem Gewebe (Kryostatschnitte)

Bei der Untersuchung differentieller Genexpression an Geweben humaner Hauttumoren ist die RNA-Präparation aus Tumorzellen, wie im vorhergehenden Absatz beschrieben, wegen der Gefahr der Kontamination mit umliegenden Gewebeanteilen ein kritischer Arbeitsschritt. Zwar wurde versucht, das Kontaminationsrisiko durch Auswahl geeigneter, gut zu präparierender Gewebeproben zu minimieren. Doch nicht immer fanden sich in den Gewebestücken große, gut zugängliche Tumorareale. Bei vielen Patientengeweben durchsetzen Melanomzellen die Epidermis vielmehr nestförmig aggregiert oder bilden nur mikroskopisch fassbare Komplexe in der Dermis. In solchen Fällen erschien die unter Punkt 2.1.2. beschriebene, eher als makroskopisch zu bezeichnende Dissektion der Tumoren als zu ungenau und fehlerbehaftet.

Um hier die Genauigkeit und Qualität der Präparation zu verbessern, wurden, anstatt die Dissektion direkt am ganzen Gewebestück durchzuführen, vom Dissektat mehrere 10-12 µm dicke Kryoschnitte angefertigt, die als Grundlage für die weitere Präparation dienten. Die gefrorenen, mattweißen Kryoschnitte ließen jedoch per se keinerlei Strukturen oder Zellgrenzen erkennen. Um den Kontrast zu verbessern, mussten sie vor der Präparation einer histologischen Färbung unterzogen werden. Da die Schnitte dabei meist auftauen, besteht bei vielen Färbemethoden die Gefahr der Degradation der RNA. Einige Färbeverfahren kann man zwar auch an gefrorenen Schnitten unter Verwendung kalter Lösungen anwenden, die Färbung ist dann jedoch meist zu schwach. Als guter Kompromiss hat sich deshalb die folgende Methode herausgestellt:

Die Kryoschnitte werden in gefrorenem Zustand für 5 Minuten in 70%igen Ethanol gelegt. Dadurch wird das Gewebe fixiert und schädliche RNasen werden weitgehend inaktiviert. Die Schnitte können nun an der Luft getrocknet und anschließend einer Methylenblaufärbung unterzogen werden, um Zell- und Gewebegrenzen besser sichtbar zu machen. Zur weiteren Orientierung werden wiederum HE-gefärbte histologische Schnittpräparate herangezogen. Mit einem ophthalmologischen Präzisionsskalpell wurden dann Tumorzellen unter stereomikroskopischer Kontrolle bei 10-20facher Vergrößerung mikrodisseziert und in RLT-Lysispuffer überführt. Die weitere RNA-Extraktion erfolgte wie oben beschrieben.

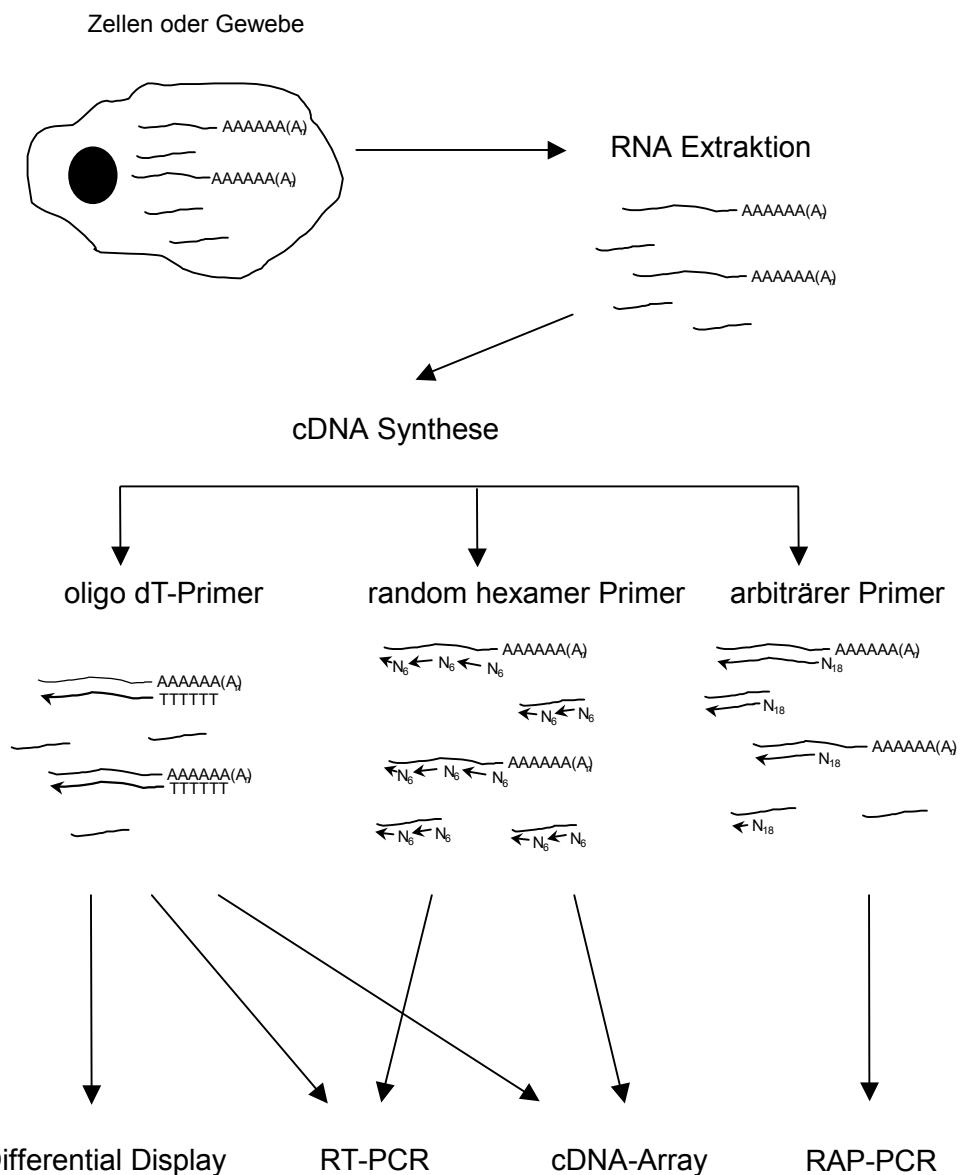
Anmerkung: Zum Zeitpunkt der anstehenden Präparation waren die moderne “Laser capture dissection” am Klinikum noch nicht verfügbar. Unsere Möglichkeiten mit der oben beschriebenen Methode ausreichend gutes Material zu gewinnen, waren daher sehr limitiert (siehe Diskussion).

2.2. Generierung von cDNA

Die quantitative Analyse der Expression einzelner mRNA-Spezies ist ein wichtiger Aspekt der Untersuchung der Genexpression und somit ein grundlegender Schritt zur Aufklärung der Mechanismen der Genregulation. Klassische Methoden wie die Northern Blot Analyse oder der RNase-Protection-Assay benötigen relativ große Mengen an RNA und verbrauchen dadurch oft wertvolle, unwiederbringliche Ressourcen (z.B. Patientengewebe). Deshalb wurden in den letzten Jahren zahlreiche neue Methoden zur Amplifikation und (vergleichenden) Quantifizierung von RNA bzw. cDNA etabliert. Hier ist die Erststrangsynthese von cDNA aus RNA erster Schritt und Ausgangspunkt der als wesentlich anzuführenden Techniken wie die RT-PCR von Einzelgenen, “differential Display” und RAP-PCR. Zudem werden cDNAs benötigt um die immer mehr verbreiteten cDNA-Arrays herzustellen oder “Proben” für die Arrayhybridisierung zu generieren. Dabei wird die isolierte RNA in einzelsträngige cDNA mittels einer sogenannten Reversen Transkriptase (siehe Abbildung 1) quasi umgeschrieben (Sambrook J et al., 1989). Dieses Enzym wurde erstmals in Retroviren entdeckt, wo es das als RNA vorliegende virale Genom in DNA übersetzt, bevor dieses in das Wirtsgenom integriert. Eine ganze Reihe solcher Reverser Transkriptasen (RT) wurden inzwischen aus verschiedenen Organismen isoliert und sind nun, zum Teil in modifizierter Form, kommerziell erhältlich. In der Praxis gängige Enzyme sind die Reversen Transkriptasen des Moloney murine leukemia virus (MMLV), des avian myeloblastosis virus (AMV) und die thermostabilen RTs von *Thermus thermophilus* und *Thermus flavus*. In der vorliegenden Arbeit wurde bevorzugt die Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase der Firma GIBCO BRL verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation der MMLV RT. Sie besitzt eine größere Syntheseleistung und kann längere cDNA-Fragmente generieren als die ursprüngliche RT. H⁻ steht hier für die fehlende Exonukleaseaktivität dieser Enzymvariante (Produktinformation).

Die Reverse Transkriptase benötigt wie andere DNA Polymerasen einen Oligonukleotid-Primer als Startpunkt für die cDNA-Synthese. Hierbei haben sich hauptsächlich zwei Verfahren etabliert, die im folgenden kurz dargestellt werden: die "oligo(dT) geprimte" cDNA-Synthese und die "random geprimte" cDNA-Synthese. Eine dritte Variante, bei der ein arbiträrer (Zufalls-) Primer als Starter für die cDNA Erststrangsynthese eingesetzt wird, ist eine Besonderheit der RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) und wird im Zusammenhang mit dieser Technik ausführlich beschrieben.

Abbildung 1: Verfahren zur Synthese von cDNA und mögliche Anwendungen



2.2.1. Oligo(dT) geprimte cDNA Synthese

Bei dieser Methode werden, wie der Name schon sagt, 12-18 Nukleotide kurze, nur aus Desoxythymidin bestehende Oligonukleotide plus 3'-NN-Anker als Primer verwendet. Dieser oligo(dT)-Primer bindet an eine Abfolge von Adenin-Nukleotiden, dem sogenannten Poly(A)-Schwanz, den typischerweise mRNA-Moleküle an ihrem 3'-Ende tragen. Der Vorteil des oligo(dT) Primings ist also, dass bei dieser Methode weitestgehend spezifisch mRNA transkribiert wird (Sambrook J et al., 1989).

2.2.2. Random geprimte cDNA Synthese

Der Vorteil der oligo(dT) geprimten cDNA-Synthese liegt in ihrer Spezifität. Dem steht oft der Nachteil gegenüber, dass die Reverse Transkriptase am 3'-Ende des RNA-Moleküls beginnen muss und unter Umständen das 5'-Ende nicht erreicht. Bei sehr langen mRNAs führt dies oft zum vorzeitigen Abbruch der cDNA-Synthese, die 5'-Sequenz wird nicht repräsentiert. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde eine Methode entwickelt, die man zufällig gestartete (random primed) cDNA-Synthese nennt. Hierbei verwendet man als Primer für die cDNA-Synthese kurze Oligonukleotide, aus sechs bis zehn Nukleotiden, die degeneriert sind also im optimalen Fall ein Gemisch allen möglichen Sequenzabfolgen bestehend aus eben 6 bis 10 Nukleotiden darstellen. Entsprechen besteht z.B. ein Nonamer (NNNNNNNNN) Zufallsprimergemisch aus 4^9 möglichen Oligosequenzen. So kann der Transkriptionsstart auf der RNA an beliebiger Stelle zwischen 5' und 3'-Ende erfolgen. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass auch 5'-nahe Anteile der RNA repräsentiert werden (Vogt T et al., 1997).

2.3. RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach progressionsrelevanten Tumormarkern in humanen Melanomzelllinien. Für die Erstellung von expressionsgenetischen Profilen der oben genannten in vitro Progressionsmodelle wurden im wesentlichen zwei Techniken verwendet: die cDNA-Array-Technik und die

RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR), deren Prinzip im folgenden Abschnitt kurz erläutert werden soll.

2.3.1. Grundlegendes zur Technik

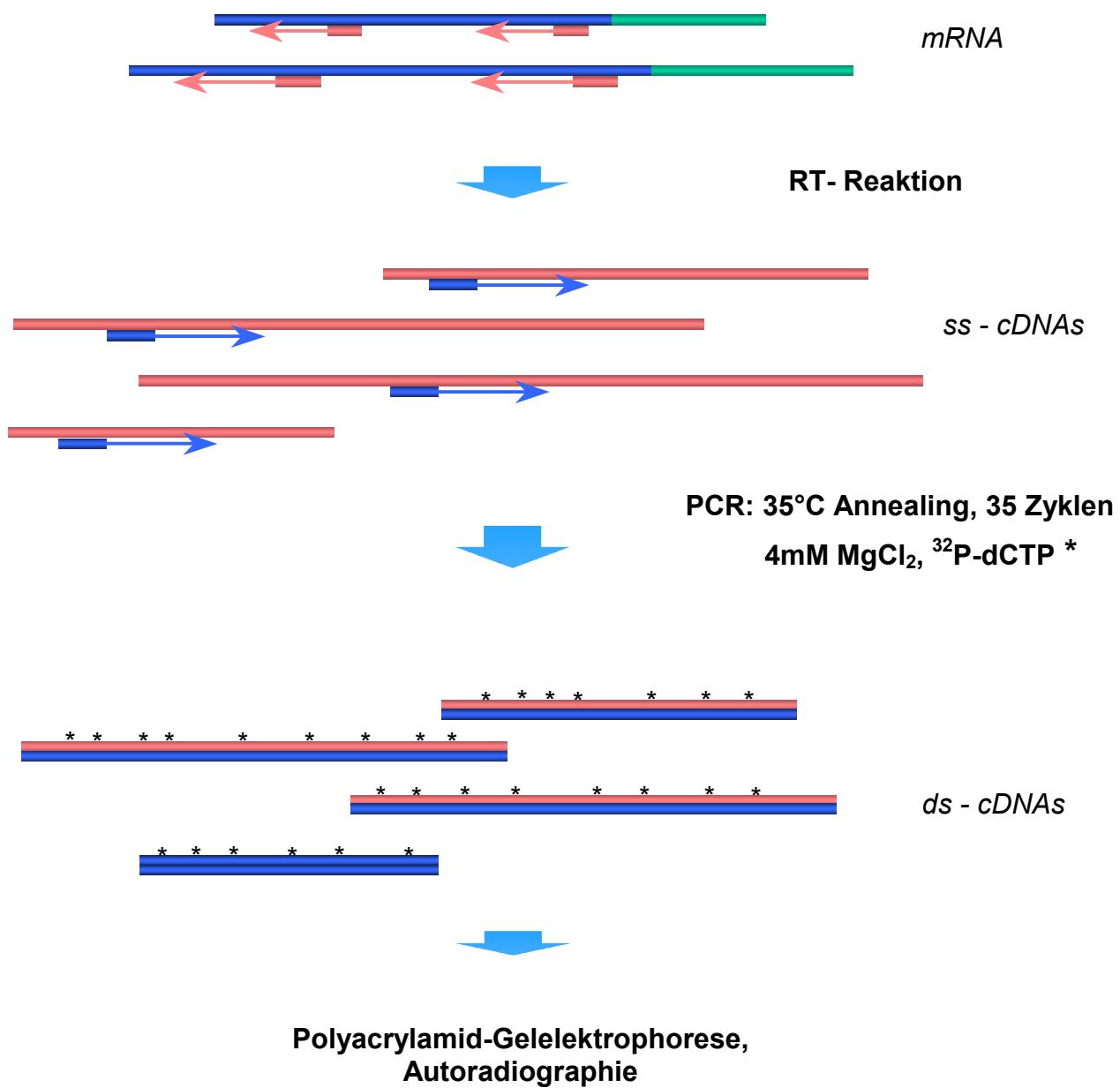
Die RNA arbitrarily primed PCR wurde anfangs der neunziger Jahre von John Welsh und Michael McClelland entwickelt und hat sich seitdem neben dem "Differential Display" in vielen Labors als Methode der Wahl zur Untersuchung differentieller Genexpression etabliert (Vogt T et al., 1997; Welsh J and McClelland M, 1991). Im Prinzip handelt es sich bei dieser Methode um eine modifizierte RT-PCR, d.h. RNA wird in einem ersten Schritt durch eine Reverse Transkriptase in cDNA kopiert und in der anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert. Im Gegensatz zur klassischen RT-PCR, die auf die spezifische Anreicherung einer einzelnen mRNA-Spezies abzielt, steht beim RNA-Fingerprinting die Darstellung einer Stichprobe aus einem RNA-Pool im Vordergrund, die multiple mRNA-Spezies repräsentiert. Erreicht wird dies durch die Verwendung eines arbiträren Primers bei der Erststrangsynthese und niedrig stringenten PCR-Bedingungen bei der weiteren Amplifikation mit dem selben oder ein bis zwei weiteren Zufallsprimern definierter Sequenz: Primer-Annealing bei 35°C, 4 - 6 mM MgCl₂, 4µM Primer. Unter diesen relaxierten Bedingungen kann ein Primer auch dann die PCR-Reaktion an einem bestimmten Template induzieren, wenn das "Match", d.h. die Komplementarität des Primers mit diesem Template insbesondere am 5'-Ende des Primers nicht 100%ig übereinstimmt. (Abbildung 2: Prinzip der RAP-PCR).

Eine Besonderheit, in der sich die RAP-PCR von anderen RNA Fingerprint-Techniken unterscheidet, liegt also in der Wahl des Primers für die RT-Reaktion. Während beim Differential Display die cDNA-Synthese mit einem oligo(dT)-Primer gestartet wird, verwendet das RAP-PCR Protokoll auch für die Erststrangsynthese einen arbiträren Primer. Hierdurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass tatsächliche "messages", also kodierende Sequenzen (open reading frames) amplifiziert werden. Außerdem wird die Reamplifizierung und Klonierung differentiell exprimierter Transkripte erleichtert (s.u.). Die weiteren PCR-Bedingungen unterscheiden sich nicht von üblichen Protokollen: 4U/Reaktion (in 50µl) TaqPolymerase Stoffelfragment und entsprechend 1x "Stoffelpuffer". Sie sind so

gewählt, dass nach 20-25 Zyklen ein Mangel aller reaktionsbestimmenden Faktoren (Enzymaktivität, dNTPs, Mg^{++} - und Primermenge) auftritt, der nahezu gleichzeitig auf alle entstehenden PCR-Produkte synthese-hemmend wirkt. Daher reflektieren Unterschiede der Menge einzelner RAP-PCR-Produkte quantitative Unterschiede einzelner RNA-Spezies in den zu untersuchenden RNA-Pools (Welsh J, 1990).

Abbildung 2: Prinzip der RAP-PCR

RNA Arbitrarily primed (RAP) PCR
(J. Welsh, M. McClelland, *NAR* 24, 1990)



Zur Vermeidung falscher Befunde durch sporadische, nicht-reproduzierbare Zufallsbanden, die in jeder PCR auftreten können, wurden in den hier vorgestellten Experimenten drei verschiedene Startkonzentrationen (100ng, 200ng und 500ng) an RNA pro untersuchter Zelllinie parallel eingesetzt. Die Synthese der einzelsträngigen cDNA wurde mit der Superscript II H⁻ RT in einem für die RAP-PCR modifizierten 10 μ l Ansatz durchgeführt. Anstelle eines Oligo(dT)-Primers kamen dabei die arbiträren Primer OPN24 bzw. OPN28 (Siehe Tabelle 1) zum Einsatz. Außerdem enthielt der RT-Ansatz 2 Units des RNase Inhibitors der Firma Boehringer (Mannheim). Um eine möglichst repräsentative Stichprobe der untersuchten mRNA-Populationen darzustellen, wurden bei der nachfolgenden PCR sechs verschiedene Kombinationen von OPN24/28 mit einem der in Tabelle 1 angeführten arbiträren Primer verwendet.

Tabelle 1: Arbiträre Primer

OPN24	5'-AGGGGCACCA-3'
OPN28	5'-GCACCAGGGG-3'
KinA+	5'-GAGGGTGCCTT-3'
KinA++	5'-GGTGCCTTGG-3'
US6	5'-GTGGTGACAG-3'
US9	5'-GTGACAGACA-3'

Durchschnittlich werden pro Primerkombination 50 - 200 mRNA Abschnitte von etwa 50 Basen bis zu 1,5 kB Länge so massiv amplifiziert, dass sie anschließend in der Gelelektrophorese dargestellt werden können. Die Visualisierung amplifizierter Transkripte erfolgt durch den Einbau von radioaktiv markiertem P³²-dCTP in der PCR, Auf trennung der RAP-PCR Produkte in einem denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgel und anschließender Exposition der vakuumgetrockneten PAA-Gele auf einem Röntgenfilm. Die Autoradiographie dieser Gele ergibt das typische "barcode"-artige Bild der RNA-Fingerprints im Sinne von M. McClelland und J. Welsh (siehe Ergebnisse). Die Befundung differentiell exprimierter Transkripte erfolgte durch visuelle Auswertung der Autoradiographien auf einem Leuchtschirm. Fragment-Banden, die in mindestens zwei der drei verschiedenen RNA respektive cDNA-Startkonzentrationen deutliche Unterschiede (mindestens 4-fach) in den zu vergleichenden RNA-Populationen zeigten, wurden als "reale" Befunde im Sinne

differentieller Expression interpretiert und für die weiteren Charakterisierung ausgewählt.

2.3.2. Klonierung von Fragmenten aus Fingerprint-Banden

2.3.2.1. Isolierung von RAP-PCR Produkten aus PAA-Gelen

Um die Identität der ausgewählten PCR-Produkte bestimmen zu können, werden die entsprechenden Fragmentbanden auf dem Autoradiographie-Film markiert. Röntgenfilm und PAA-Gel werden mithilfe von fluoreszierenden Leuchtsymbolen, die vor der Exposition auf dem getrockneten PAA-Gel angebracht wurden, und deren Abbild auf dem Röntgenfilm millimetergenau aufeinandergelegt und mit Büroklammern fixiert. Auf dem Leuchtschirm lassen sich die Markierungen der selektierten Fragmentbanden in der Autoradiographie mit Graphitstift exakt auf das Trägerpapier des PAA-Gels übertragen. Entlang dieser Markierungen werden anschließend mit einem Skalpell die selektierten Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die so gewonnenen Gelstückchen werden von ihrem Trägerpapier gelöst, in Eppendorf-Gefäß mit 50µl TE-Puffer überführt und die DNA 3 Stunden bei 68°C eluiert. Zur Abtrennung von etwaigen Gel- und Papierrückständen werden die Überstände abgezogen und in frische Eppendorfcups überführt (Vogt T et al., 1997).

2.3.2.2. Reamplifizierung der RAP-Fragmente mittels PCR

Erfahrungsgemäß eignet sich die nach oben beschriebenem Verfahren eluierte DNA von Primärgelen nicht zu einer direkten Sequenzierung oder Klonierung, da stets mit der Kontamination des Zielfragments mit anderen Produkten *gleicher* Länge gerechnet werden muss. Daher wird das Eluat mit möglichst wenigen PCR-Zyklen (etwa 10-15) reamplifiziert, so dass die DNA-Mengenverhältnisse in dem Reaktionsgemisch erhalten bleiben (log-Phase der PCR). Hierzu wird aus den Überständen der Gel-Eluate eine 20fach verdünnte "Arbeitslösung" hergestellt, von der 4µl in der Reamplifizierungs-PCR verwendet werden. Die PCR-Reaktion findet in einem Volumen von 40µl unter folgenden Parametern statt: 4U TaqPolymerase, Annealing der Primer bei 35°C. Hierbei kommen die gleichen Primer zum Einsatz, die in der entsprechenden RAP-PCR Reaktion verwendet wurden. Beispielsweise

wurde in der vorliegenden Arbeit das Fragment "11" aus einer RAP-PCR isoliert, die mit der Primerkombination OPN24/US6 durchgeführt wurde. Für die Reamplifizierung dieses Fragments werden folglich wieder die Primer OPN24 und US6 eingesetzt. Nach der Reamplifizierung kommen zwei Verfahren zur Anwendung, um Zielfragmente von kontaminierenden Nebenprodukten zu trennen. Entweder man reinigt die Zielfragmente zunächst über ein sogenanntes SSCP-Gel und kloniert sie anschließend in *E. coli* oder man transferiert die PCR-Produkte gleich in einen *E. coli* Stamm, selektiert von jedem Zielfragment mehrere Klone und entscheidet durch Sequenzvergleich entsprechend der mehrheitlich vorherrschenden Sequenz, welcher Klon das gewünschte Zielfragment wahrscheinlich enthält. Beide Verfahren erhöhen die Wahrscheinlichkeit das regulierte Transkript zu finden, selbstverständlich muss dies durch bestätigende Verfahren (semi)-quantitative PCR oder Northern Blots verifiziert werden (Mathieu Daude F et al., 1996).

2.3.2.3. Reinigung der RAP-PCR Produkte mittels SSCP -Gelelektrophorese

Für die Aufreinigung der Zielfragmente aus der Reamplifizierungs-PCR verwendet man ein nicht-denaturierendes Gel, wie es für single strand conformational polymorphism-(SSCP)-Untersuchungen üblich ist (Mathieu Daude F et al., 1996). Hierbei werden die PCR-Produkte nach Größe *und* Konformation der Moleküle aufgetrennt. Führt man dies für zwei Eluate mit stark differierender Menge des Zielfragments durch und lädt die Produkte nebeneinander auf ein SSCP-Gel, dann findet man in der Regel ein Fragment, das in der Menge stärker differiert als die übrigen Fragmente. Auf diese Weise ist es häufig möglich, das Zielfragment von Kontaminanten zu unterscheiden und dieses erneut aus dem Gel zu eluieren.

Nach einer weiteren Reamplifizierung wird das Zielfragment kloniert und sequenziert.

2.3.2.4. TA-Klonierung der RAP-Fragmente

Zur direkten Klonierung von PCR-Produkten wurden in den letzten Jahren verschiedenste Verfahren entwickelt. Inzwischen sind auch zahlreiche kommerzielle Systeme erhältlich. Viele dieser Ansätze beruhen auf dem Prinzip der TA-Klonierung. Hierbei nutzt man die Eigenheit der Taq DNA Polymerase, an das 3'-Ende eines

synthetisierten DNA-Stranges ein einzelnes Nukleotid – fast immer ein Adenin – anzuhangen. Fügt man im Gegenzug an die glatten Enden eines Klonierungsvektors einen Thymidinrest an, entsteht ein künstlicher Überhang, der mit dem Adeninrest überlappen und hybridisieren kann. Durch solche “sticky ends” wird die Effizienz der Ligation deutlich gesteigert, was die schnelle Klonierung frischer PCR Fragmente erleichtert. Die besten Resultate für die Klonierung der reamplifizierten RAP-PCR-Produkte wurden in dieser Arbeit mit dem TOPO TA Cloning System von Invitrogen (San Diego, CA) erzielt. Hauptbestandteil dieses Systems ist der Klonierungsvektor pCRII-TOPO. Dieser Vektor liegt bereits in linearisierter Form vor und besitzt an seinen Enden den oben beschriebenen 3'-Thymidinüberhang. An diesen Überhang ist das Enzym Topoisomerase I kovalent gebunden, das die Ligation mit dem PCR-Fragment katalysiert. Hierzu wird das gereinigte und reamplifizierte RAP-PCR Fragment mit dem Vektor gründlich vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von Ligase ist nicht erforderlich, sehr wohl jedoch die Zugabe von Salz bis zu einer Endkonzentration von 200 mM NaCl und 10 mM MgCl₂. Die Ligationszeit von 5 Minuten sollte exakt eingehalten werden, da längere Inkubationszeiten die Klonierungseffizienz drastisch vermindern. Anschließend wird der insertragende Vektor durch chemische Transformation in kompetente *E. coli* (TOP10, Invitrogen) eingeschleust. Hierzu werden 2µl des Klonierungsansatzes mit einer Einheit kompetenter *E. coli* vermischt und für 5 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien für 30 Sekunden bei 42°C einem Hitze-Schock unterzogen und sofort danach auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wird der Transformationsansatz für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Ausplattieren auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten zum “Blau-Weiß-Screening” und Inkubation bei 37°C über Nacht schließen den Vorgang ab (Vogt T et al., 1997).

2.3.2.5. Blau-Weiß-Selektion

Viele Klonierungsvektoren stützen sich auf die sogenannte Blau-Weiß-Selektion, um schon anhand der Farbe der Bakterienkolonien eine Vorselektion jener Klone vornehmen zu können, die die gewünschte Fremd-DNA aufgenommen haben. Die “Multiple Cloning Site” solcher Vektoren befindet sich in einem Fragment des LacZ-Gens von *E. coli* (LacZ') das die β-Galactosidase codiert. Die MCS unterrichtet den

Leserahmen dieses Gens nicht. In einem geeigneten *E. coli* Wirtsstamm führt die Expression des LacZ-Fragments zur Synthese der aktiven β -Galactosidase. Lässt man die Bakterien auf einer Agarplatte wachsen, die mit dem Substrat x-Gal beschichtet wurde, wird das Substrat durch das aktive Enzym umgesetzt und in ein unlösliches blaues Abbauprodukt gespalten. Daher erscheinen *E. coli*-Kolonien mit Plasmiden, die keine fremde DNA in ihre MCS eingebaut haben, blau. Durch das Einfügen eines zu klonierenden DNA-Fragments in die MCS wird der Leserahmen des LacZ-Gens unterbrochen, die Synthese von aktiver β -Galactosidase unterbleibt und dementsprechend bleiben Bakterienkolonien, die Plasmide mit Fremd-DNA tragen farblos-weiß.

Am folgenden Tag, nach Bebrüten bei 37°C, werden pro Fall etwa 10 weiße (positive) Kolonien gepickt und in etwa 5ml LB-Medium über Nacht weiter expandiert. Aliquots der gepickten Kolonien werden in einer PCR-Reaktion mithilfe eines Universalprimerpaars auf positive Ligation überprüft. Aus den LB-Kulturen der positiven Klone wurde in unserem Fall am folgenden Tag mithilfe des "Miniprep-Systems" von Qiagen Plasmid-DNA präpariert.

Das Miniprep-Verfahren wird in vielen Labors aufgrund seiner Schnelligkeit und des Verzichts auf Phenol und Chloroform bevorzugt und basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen gefolgt von der Bindung der DNA an eine Silika-Matrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Die alkalische Lyse erfolgt nach der Methode von Birnboim und Doly durch Zugabe entsprechender Puffer-Lösungen. Nach Abtrennung von Zellresten und genomischer Bakterien-DNA durch Zentrifugation und Bindung der Plasmid-DNA an die Silica-Membran werden in mehreren Waschschritten Endonukleasen und überschüssige Salze entfernt. Die gereinigte Plasmid-DNA wird abschließend in 50 μ l nukleasefreiem Wasser eluiert (Vogt T et al., 1997).

2.3.2.6. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Von jedem der 24 Kandidatenfragmente, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, wurden je acht Klone selektiert. Die PCR-Sequenzierung der insgesamt circa 200 Einzelklone wurde mit dem "Big Dye Kit" von Perkin Elmer nach dem Prinzip von F. Sanger durchgeführt. Das zu sequenzierende Fragment wird dabei amplifiziert unter Zugabe von mit Fluoreszenzfarben markierten dideoxy-Nukleotiden.

Nach Einbau dieser kommt es zum Kettenabbruch. Durch Auftrennung der Gesamtheit dieser Fragmente auf denaturierenden PAA-Gelen kann die Sequenz anhand der Abfolge der Farben, für A T G C codierend, mittels Laser und Photomultiplier detektiert werden.

Die Auftrennung der Fragmente aus der Sequenzier-Reaktion über ein hochauflösendes, denaturierendes PAA-Gel und die lasergestützte Auswertung des Gels wurde zum Teil im mikrobiologischen Institut der Uniklinik Regensburg, zum Teil bei der Firma GATC in Konstanz durchgeführt.

Für die Überprüfung der rund 200 auf diese Weise erhaltenen Sequenzen standen zum einen entsprechende Softwarepakete ("Lasergene" von DNASTAR, OMIGA von Oxford Molecular Ltd.) zur Verfügung, zum anderen gibt es eine Vielzahl von Websites, die Sequenzanalytik (multiple Alignments, Alignment mit der "Genbank", Proteintranslation, Primerdesign etc.) ermöglichen. Beispiele sind die NIH-Website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder die multifunktionelle Website des "Baylor's College of Medicine" in Houston, Texas, USA, (<http://gc.bcm.tmc.edu:8088/home.html>). Mit entsprechenden Algorithmen der OMIGA-Software wurde für die jeweils acht Sequenzen eines Zielfragments ein vergleichendes Alignment berechnet und untersucht, ob die Mehrzahl der Klone eines Zielfragmentes wirklich dieselbe Sequenz aufweisen oder ob es mehrere Sequenzen unter den Klonen gibt? Mit den daraus resultierenden, als wahrscheinlich richtig zu deklarierenden Sequenzen wurde mithilfe des "BLAST Search" Tools der NIH-Website (Basic local alignment search tool) eine Datenbankrecherche durchgeführt, um zu klären, ob einzelne Sequenzen in diversen Genbanken bereits bekannt sind. Dabei fielen neben einigen bekannten Genen auch multiple "neue" Sequenzen auf, wie im Ergebnisteil dargestellt wird.

2.3.3. Bestätigung differentieller Expression

Das durch die RAP-PCR generierte Amplifikat enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Transkripte. Da diese im "eindimensionalen" PAA-Gel nur nach der Länge aufgetrennt werden, erscheinen unterschiedliche Transkripte derselben Länge in einer Bande. Das Herausschneiden und Eluieren eines vermeintlich differentiell exprimierten RAP-Fragments aus einer Bande bestimmter Länge birgt deshalb stets die Gefahr, dass nicht-regulierte Fragmente aus der selben Bande mitextrahiert

werden. Zwar lässt sich diese Gefahr durch die vorher beschriebenen aufwendigen Verfahren wie Reamplifizierung, nochmalige Aufreinigung über SSCP-Gele oder "Massen-Klonierung" und Sequenzvergleich verringern. Ganz ausschließen kann man Kreuzkontaminationen mit nicht-regulierten Nebenprodukten dadurch aber nicht. Um letztendlich sicherzustellen, dass es sich bei den gefundenen Sequenzen tatsächlich um ein differentiell exprimierte Gen handelt, müssen zusätzliche bestätigende Nachweise erbracht werden. Die Northerblotanalyse ist eine allgemein anerkannte und bevorzugte Methode zum Nachweis differentieller Genexpression. Allerdings benötigt man hierfür große Mengen an RNA, die nicht immer zur Verfügung stehen. Außerdem lassen sich seltene Transkripte oft nicht im Northern Blot nachweisen. Da aber die Identifizierung von wenig abundanten Amplikons eine unbestreitbare Stärke der RAP-PCR ist, bereitet gerade die Bestätigung von RAP-Fragmenten im Northern Blot oft Schwierigkeiten. In diesem Fall muss man auf eine sensitivere und ressourcenschonende Methode wie die RT-PCR oder den sogenannten Reversen Northern Blot zurückgreifen.

2.3.3.1. Northernblotanalyse

Sofern ausreichend RNA zur Verfügung steht (rund 20 µg z.B. aus den Experimenten mit Zellkulturen) und das zu untersuchende Transkript ausreichend abundant ist, kann die Northern Blot Analyse zur schnellen und einfachen Bestätigung der differentiellen Expression eines bestimmten Genes herangezogen werden. Das Vorgehen orientiert sich an der von E. M. Southern entwickelten Technik zum Transfer und zur Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Trägermembranen. Diese Technik wurde für RNA modifiziert und den Himmelsrichtungen entsprechend als Northern Blot bezeichnet. Analog zum Southern Blot trennt man die RNA in einem – in diesem Fall - 1,2 %igen denaturierenden Agarosegel der Größe nach auf, überträgt sie im Kapillarblotverfahren auf eine Nylonmembran und fixiert sie dort durch Bestrahlung mit UV-C (254 nm) bei einer Energiedosis von 0,125 J/m². Zum Nachweis einer einzelnen mRNA wird der Northern Blot mit einer genspezifischen, radioaktiv markierten cDNA Sonde hybridisiert. Die Herstellung der Sonden erfolgt meist ausgehend von klonierten cDNAs der nachzuweisenden mRNA. Fragmente dieser cDNA werden entweder mittels PCR generiert oder mit Restriktionsenzymen aus dem Plasmid ausgeschnitten. Nach Aufreinigung über ein Agarosegel wird das

Fragment nach dem Random-Labeling-Verfahren mit ^{32}P radioaktiv markiert und gemäss den weitgehend standardisierten Protokollen hybridisiert (Sambrook J et al., 1989).

2.3.3.2. Semiquantitative RT-PCR

Zu dem Nachteil des hohen RNA-Verbrauchs beim Northern Blotting kommt hinzu, dass diese Technik für die Mehrzahl der zu bestätigenden Befunde u.U. nicht sensitiv genug ist. Der in jüngster Zeit oft favorisierte “RNase protection assay” zur RNA-Quantifizierung ist erfahrungsgemäß zwar sensitiver, aber recht aufwendig und nicht in jedem Fall RNA-sparender. Hier hat sich die RT-PCR wegen der hohen Sensitivität und Spezifität der PCR als weitere Technik zur RNA-Quantifizierung etabliert. Wegen der geringen erforderlichen Menge von RNA können auch Gewebeproben im Rahmen der Bestätigung der differentiellen Expression bestimmter Gene berücksichtigt werden.

Die Grundzüge der RT-PCR wurden in dieser Arbeit bereits mehrfach erwähnt. In einem ersten Schritt wird zunächst RNA in einzelsträngige cDNA kopiert (siehe Kapitel 2.2). An die Synthese der cDNA im RT-Schritt schließt sich eine PCR zur Amplifizierung der cDNA an. Damit sich (semi-)quantitative RNA-Unterschiede zwischen verschiedenen RNA-Populationen respektive Zelllinien in der Menge des PCR-Produktes wiederspiegeln, muss die PCR-Reaktion gestoppt werden, bevor die Reaktion in die sogenannte Plateauphase läuft. Bei welcher Zyklanzahl dies der Fall ist, ist von Template zu Template verschieden und muss für jede zu untersuchende mRNA in Vorversuchen ausgetestet werden. Hierzu startet man eine Zyklentestreihe mit mehreren identischen PCR-Ansätzen. Ab dem 15. Zyklus entfernt man fortlaufend nach jeweils zwei Zyklen einen Testansatz aus der laufenden Reaktion. Die nach verschiedenen Zyklen entnommenen Ansätze trägt man der Reihe nach auf ein 1,2 %iges Agarosegel auf. Anhand des Gelphotos wählt man die Zyklanzahl, bei der die Menge des PCR-Produkts ausreichend ist und mit steigender Zyklanzahl noch linear zunimmt.

In der Vergangenheit wurde die RT-PCR oft wegen mangelnder Standardisierung kritisiert. Neuere Protokolle, die mit bekannten oder invariablen internen Standards

arbeiten (Mimikrytechnik, strukturelle 18S rRNA als interner Standard, "Competitor"-Technologie) lösen die Probleme nur teilweise, sind aber zum Teil aufwendig in der Durchführung. Zur Methode der Wahl, wenn es um den Nachweis quantitativer Unterschiede geht, hat sich in jüngerer Zeit die sogenannte "Real Time PCR", entwickelt, bei der man die Menge der entstehenden PCR-Produkte in Echtzeit verfolgen kann im Vergleich zu einem Standard. Leider stand diese Technik bei der Durchführung der Experimente zu dieser Dissertation (noch) nicht zur Verfügung. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine nach wie vor gängige Methode der Standardisierung zurückgegriffen. Sie besteht darin, die RNA-Quantitätsunterschiede der zu untersuchenden Gene in Bezug zu den RNA-Unterschieden von sogenannten Housekeeping Genen zu setzen. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde GAPDH zur Standardisierung herangezogen. Dies erlaubte uns zumindest eine semiquantitative Evaluierung der vorher in der RAP-PCR oder der in Arrays differentiell erscheinenden Resultate.

2.3.3.3. Reverse Northern Blots

Eine weitere Methode zur Bestätigung differentiell regulierter Gene ist der Reverse Northern Blot. Wie der Name schon andeutet wird bei dieser Technik das Prinzip des klassischen Northern Blots invertiert, indem nicht RNA sondern cDNA-Fragmente der zu bestätigenden Gene auf Nylonmembranen fixiert und mit RNA aus verschiedenen Zelllinien oder Gewebeproben bzw. daraus generierten cDNA Proben hybridisiert werden. Dabei wird zunächst cDNA von potentiell reguliert exprimierten Genen aus entsprechenden Klonen mittels PCR amplifiziert und auf Nylonmembranen "gespottet". Beim Spotten wird die cDNA geordnet in mehr oder weniger großen Tropfen punkt- oder streifenförmig auf die Filtermembranen aufgetragen. Je nach Anwendung haben wir dazu entweder eine Vakuumblotapparatur, z.B. der Firma BIORAD verwendet oder das Spotten mittels Spottingroboter bei Eurogentec, Belgien, durchführen lassen. Letzteres hat den Vorteil reproduzierbar Spots in hoher Dichte auch auf kleinstem Format auf Nylon unterzubringen.

Die cDNA-Filter werden anschließend mit radioaktiv markierten Proben aus verschiedenen Zelllinien oder Geweben hybridisiert. Zur Herstellung der Proben wird gesamtzelluläre oder Poly(A)-RNA aus den entsprechenden Zelllinien oder Geweben

isoliert und mithilfe der oben beschriebenen Verfahren in einzelsträngige cDNA kopiert. Durch Verwendung von $P^{32/33}$ -dCTP werden die Proben dabei radioaktiv markiert. Auch mittels SMART-Technik (siehe unten) generierte und nachträglich radioaktiv markierte cDNA kann als Probe verwendet werden. Die Hybridisierung und Autoradiographie der Filter erfolgt nach Standardverfahren und wird nachfolgend noch ausführlich beschrieben. Durch Messung und Vergleich der Signalintensitäten verschiedener Filter lassen sich differentiell exprimierte Gene nachweisen.

Die hier vorgestellte Technik des Reversen Northern Blots ist dem Prinzip nach mit der cDNA-Array-Technologie identisch und kann praktisch als Vorläufer dieser neuen aufstrebenden Technik angesehen werden.

2.4. Synthese ds-cDNA aus Nanomengen von RNA

2.4.1. SMART-PCR

Stark limitierte RNA-Mengen und der damit verbundene Verbrauch unwiederbringlicher RNA-Ressourcen sind ein hinderliches Problem bei der Analyse differentieller Genexpression im Melanom. Zwar lässt sich dieses Problem zunächst umgehen, indem man bei den Studien auf in vitro Modelle humaner Melanomlinien zurückgreift. Modelle sind jedoch immer zu einem gewissen Grad artifiziell und spiegeln die Realität nur eingeschränkt wieder. Die im Zellkulturmodell gewonnenen Ergebnisse müssen deshalb an Geweben humaner Hauttumoren überprüft werden.

Um dabei so wenig RNA wie möglich zu verbrauchen und trotzdem ausreichend Material für die Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurden diverse Techniken zur Amplifikation von RNA erprobt. In Anlehnung an die von Clontech patentierte Amplifikationstechnik SMART (switching mechanism at the 5' - prime end of RNA template), wurde ein Protokoll etabliert, mit dessen Hilfe ausgehend von etwa 50 - 200 ng gesamzellulärer RNA (entsprechend etwa 200 – 1000 Zellen) einige hundert ng ds-cDNA gewonnen werden können z. B. für die Hybridisierung von Arrays: Als Primer werden SMART-cDNA-Synthese-Oligos verwendet (5'-arbiträre Sequenz $T_{(30)}N_1N-3'$ mit $N = A,C,G,T$, $N_1 = A,C,G$, sogenannter cDNA Synthese Primer (CDS) sowie 5'-arbiträre Sequenz-GGG-3', sogenanntes SMART-Oligo). SMART ist das Acronym für *switching mechanism at the 5' - prime end of RNA template*. Dieses

Prinzip nutzen wir, um die cDNA vorzuamplifizieren: Durch die der Superscript-RT eigenen terminalen Transferaseaktivität addiert das Enzym am Ende der entstehenden cDNA einige C-Reste, so dass sich das SMART-Oligo hier anlagern kann. Die RT erkennt das Oligo dann als zu übersetzende Sequenz und addiert wiederum die zu dem SMART-Oligo komplementäre Sequenz an die cDNA. So entstehen cDNAs mit zwei definierten Enden, einmal die gewählte arbiträre Sequenz und einmal die dazu komplementäre. Dementsprechend kann dann die cDNA mittels eines weiteren Oligos mit der arbiträren Sequenz amplifiziert werden. Mit 10 bis 15 Zyklen können so aus 50 - 200 ng totaler RNA einige hundert ng ds-cDNA gewonnen werden. Zur Vermeidung von Normalisierungseffekten sollte die Amplifikation mit möglichst niedrigen Zykluszahlen auskommen.

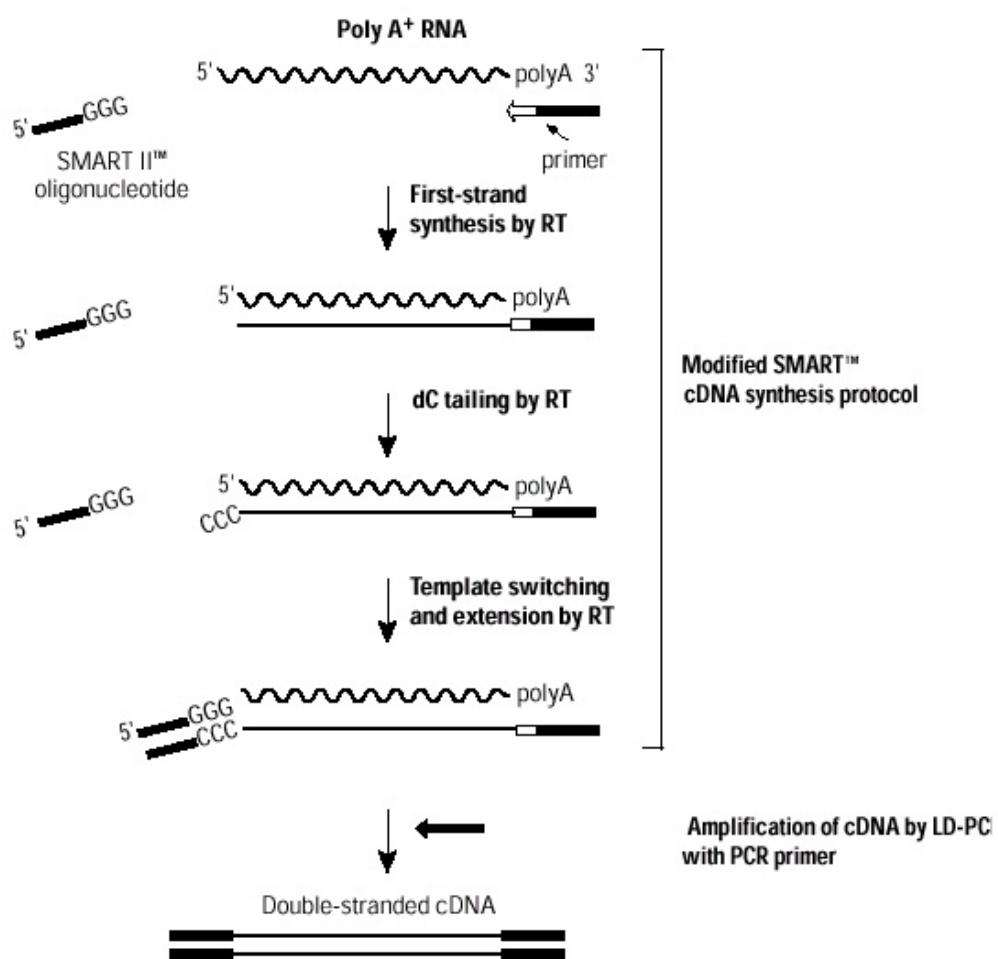
Die praktische Durchführung war wie folgt:

Durch Zugabe von RNase Inhibitor (Boehringer, 5U/Rx) im cDNA-Syntheseschritt wurde die RNA im vor dem Abbau durch RNasen geschützt. Die Erststrangsynthese wurde im Thermocycler unter folgenden Parametern durchgeführt: 2 Min. bei 70°C zur Denaturierung von Sekundärstrukturen in der RNA, Primer-Annealing bei 25°C, anschliessend RT-Reaktion über eine Stunde bei 42°C. An die Erststrangsynthese schließt sich bei der klassischen SMART eine stringente PCR zur Amplifizierung der cDNA an. Vorher wird der Reaktionsansatz für 7 Minuten auf 72°C erhitzt um das RNA-cDNA-Hybrid zu trennen, die RNA zu zerstören und die Reverse Transkriptase zu deaktivieren. Die PCR (15 Sek. Denaturieren bei 94°, Annealing bei 65° 30 Sek., Extension 6 Min. bei 68°) wird mit zwei Ansätzen pro Probe, dem "Tester" und dem "Driver" durchgeführt, um die optimale Zyklenzahl zu ermitteln. Der Tester wird nach z.B. 10 Zyklen eingefroren und der Driver weiter amplifiziert. Während der PCR werden Aliquots nach je 2-3 weiteren Zyklen entnommen und auf einem Agarosegel analysiert. Der entstehende Schmier sollte im optimalen Fall den Bereich von 1000 bis 10 000 bp überdecken aber den oberen Gelrand nicht erreichen, was der Plateauphase einer konventionellen RT-PCR entsprechen würde. Entsprechend dem Gelresultat wird der Tester-Ansatz auf die optimale Zyklenzahl "nachgecycelt".

Die DNA Polymerase für diese als Long Distance PCR bezeichnete Reaktion wird durch den Advantage KlenTaq Polymerase Mix bereitgestellt. Dieser Mix wurde von der Firma Clontech speziell für die effiziente Amplifikation von Volllängen-cDNAs

zusammengestellt und enthält u.a. neben der KlenTaq-1 als primärer DNA Polymerase eine weitere Polymerase mit 3'-5' proofreading Funktion. Das Gemisch ist optimiert unter dem Gesichtspunkt der Erzeugung von sequenztreuen Vollängen-cDNAs, was gerade bei der Konstruktion von cDNA-Bibliotheken eine wichtige Rolle spielt. Dies war auch die ursprüngliche Intention bei der Entwicklung der SMART-Technik. Erst im Laufe der Zeit wurde dieses Verfahren auch für andere Anwendungen adaptiert.

Abbildung 3: Prinzip der „Capfinder“-Technik SMART



(Firma Clontech, Produktinformationen)

Die amplifizierte SMART-cDNA wird im Anschluss an die PCR mithilfe des PCR Purification Kit (Qiagen) von überschüssigen Primern, Nukleotiden und Polymerasen gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

In der vorliegenden Arbeit wurde SMART-generierte cDNA einerseits zur Hybridisierung von Reversen Northern Blots und cDNA-Arrays eingesetzt, andererseits dienten SMART-cDNA Banken als Template für (semi-)quantitative PCRs. Außerdem wurde experimentell unter technischen Gesichtspunkten untersucht, inwieweit SMART-ds-cDNA als Template für die arbitrarily primed PCR (RNA Fingerprinting) zur Untersuchung der differentiellen Genexpression herangezogen werden kann (siehe 2.4.2.).

2.4.2. Differential display/(R)AP-PCR von SMART-ds-cDNA

Sowohl eigene Experimente als auch andere Arbeiten haben gezeigt, dass es nachweislich möglich ist, mithilfe der SMART-Technik unter entsprechend kontrollierten Bedingungen repräsentative “full-length” cDNA Pools zu generieren ohne die Gefahr der Normalisierung einzelner möglicherweise differentiell exprimierter mRNAs/cDNAs.

Hieraus entstand die Überlegung, SMART generierte cDNA als “Template” für eine arbiträr “geprimte” PCR (AP-PCR) einzusetzen. Wenn es gelänge auf diese Weise differentielle Genexpression darzustellen, dann wäre es möglich mit kleinsten Proben aus Gewebeschnitten von einigen Nanogramm RNA bis in den Bereich hinein von wenigen Hunderten von Zellen RNA-Fingerprints zu erzeugen. Damit könnten z.B. einzelne Melanozytennester, vergleichend Nävus versus Melanom oder auch das Problem der intratumoralen Heterogenität (z.B. apikale Anteile versus Invasionsfront) analysiert werden.

Entsprechend wurde analysiert, ob reproduzierbare Fingerprints a) ausgehend von differenten RNA Startkonzentrationen (5, 10, 100 ng Gesamt-RNA) und b) variablen ds-cDNA-Verdünnungen generiert werden können.

2.5. cDNA-Arrays

2.5.1. Verwendete cDNA-Arrays

2.5.1.1. Kommerzielle Formate und Arrays des Ressourcenzentrums

Vor einigen Jahren haben einzelne Labors damit begonnen, Genexpressions-Analysen mittels Hybridisierung komplexer cDNA Sonden gegen geordnete, auf Trägermembranen fixierte Klonmatrizen durchzuführen (Schena M et al., 1995). Seither hat die cDNA-Array-Technologie eine bedeutsame Entwicklung erfahren und wird mittlerweile in vielen Labors zur Untersuchung differentieller Genexpression eingesetzt.

Da auch die Industrie das Potential dieser Technik erkannt hat, sind inzwischen zahlreiche Anbieter kommerzieller Arrays auf dem Markt. Die Arrays unterscheiden sich zum einen durch das Trägermaterial auf welchem die "Target"-DNA fixiert ist und durch die Markierungsmethode der RNA bzw. cDNA Sonden. Zwei Systeme haben sich dabei im Wesentlichen behauptet. Nylonmembranen, die mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert werden, stehen Glas- bzw. Polypropylenchips gegenüber die häufig mit fluoreszenzmarkierten Sonden hybridisiert werden. Vor allem die Firma Affimetrix zählt zu den Vorreitern der Chip-Technologie und hat sich auf den Vertrieb von cDNA-Chips, die mit fluoreszenzmarkierten Proben hybridisiert werden, spezialisiert.

Zum anderen hat man, je nachdem welche Fragestellung bearbeitet werden soll, die Wahl zwischen Arrays, die eine gezielte Auswahl an Genen tragen und Arrays, die eine mehr globale, "transkriptomweite" Untersuchung differentieller Genexpression erlauben. Dabei variiert die Anzahl der auf einem Filter gespotteten cDNAs von einigen hundert bis zu mehreren tausend Genen. Firmen wie Sigma oder Genome Systems beispielsweise bieten spezielle Arrays an, auf denen Gene gemäß ihrer biologischen Funktion zu bestimmten Gruppen zusammengefasst sind, z.B. Zytokine, Onkogene, humane Tumormarker, Apoptoseassoziierte Gene, etc. Auch die Firma Clontech hat mit der "Atlas" -Reihe nach verschiedenen Schwerpunkten sortierte Arrays im Programm. Diese Arrays sind aber speziell nur für die Hybridisierung mit cDNA Proben geeignet, die nach dem Clontech Protokoll mit entsprechenden Motif-Primermixturen synthetisiert wurden. Mit nach anderen Verfahren generierten cDNA-

Proben (z.B. random priming, oligo(dT)-geprimte cDNA) erzielt man deutlich schlechtere Ergebnisse.

Zum Nachteil, dass man also unter Umständen auf firmenspezifische und damit meist teure Reagenzien zurückgreifen muss, kommt hinzu, dass auch die Anschaffung von kommerziellen Arrays oft hohe Kosten verursacht. Preise bis zu einigen tausend Euro pro Set/Stück sind keine Seltenheit.

Eine wesentlich günstigere Alternative bietet das Ressourcen Zentrum Primärdatenbank, kurz R.Z.P.D. (<http://www.rzpd.de>). Diese zentrale Dienstleistungseinrichtung des Deutschen Humangenomprojekts wird gemeinsam vom Max-Planck-Institut für molekulare Genetik (Abteilung H. Lehrach) in Berlin und dem Deutschen Krebsforschungszentrum (Abteilung A. Poustka) in Heidelberg betrieben. Das Ressourcenzentrum besitzt mit derzeit rund 30 Millionen Klonen eine der umfangreichsten Sammlungen von genomischen und cDNA-Genbibliotheken von Mensch und ausgewählten Modellorganismen und bietet Wissenschaftlern umfassende Serviceleistungen zu diesen Bibliotheken an. Das Angebot umfasst neben Hochdichteklon-, Protein- und DNA-Arrays auch Klon- und DNA-Pools oder Einzelklone der verschiedenen Genbibliotheken. Da es mit öffentlichen Mitteln gefördert wird, ist das Ressourcenzentrum in der Lage, diese Dienstleistungen vergleichsweise kostengünstig anzubieten. Beispielsweise kosten cDNA-Arrays hier nur einen Bruchteil dessen, was bei kommerziellen Anbietern zu bezahlen ist. Im Gegenzug verpflichtet sich der Kunde, an der Pflege der Primärdatenbank z.B. durch Einreichung von neuen Sequenzinformationen mitzuwirken.

Zur Untersuchung differentieller Genexpression in den oben beschriebenen Progressionsmodellen wurden vom R.Z.P.D. sogenannte Hochdichteklon-Arrays bezogen. Jeder dieser ca. 30x30 cm großen Nylon-Filter trägt 27.648 *E. coli* Klone, die als Doppelspots auf der Membran fixiert wurden. Die Klone enthalten sogenannte "Expressed Sequence Tags" (EST) aus verschiedenen I.M.A.G.E. cDNA Bibliotheken. In den hier vorgestellten Experimenten wurden die RZPD-Filter "10" und "19" verwendet. Sie umfassen cDNAs der normalisierten Melanozyten-Bibliothek 2NbHM und der normalisierten Bibliothek 2NbHP8-9W (8-9wk fetal placenta) die beide von B. Soares, Columbia University, U.S.A., etabliert wurden.

Detaillierte Informationen zu den cDNA Bibliotheken und Arrays des R.Z.P.D. finden sich auf der Internetseite <http://www.rzpd.de> des Resourcenzentrums.

2.5.1.2. Herstellung von Arrays mit eigener Auswahl der Target- cDNAs

Analog zur RAP-PCR, müssen auch die mithilfe der cDNA-Array-Technologie erhaltenen Resultate durch weitere Verfahren bestätigt werden. Um sowohl die im RNA-Fingerprinting, als auch durch Hybridisierung von cDNA-Arrays als möglicherweise differentiell exprimiert befindeten Gene simultan überprüfen zu können, wurden alle Kandidatengene auf einem Array zusammengefasst und nach dem unter Punkt 2.3.3.3 beschriebenen Verfahren des Reversen Northern Blots mit radioaktiv markierten cDNA Proben aus den oben genannten Zelllinien überprüft. Als interne Kontrolle zur Normalisierung wurden die "Housekeeping-Gene" GAPDH und β -Aktin verwendet. Außerdem wurden neben gängigen Melanom/Progressionsmarkern z.B. MIA, N-Cadherin, E-Cadherin, einige Integrine und c-Kit auch fünf cDNAs von *Arabidopsis thaliana* sowie zwei *Volvox carteri f. nagariensis*-cDNAs auf dem Array mitgeführt als Negativkontrollen – freundlicherweise von Prof. R. Schmitt, NWFIII, Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt -, nebst Pufferkontrolle.

Gemäss den in unserem Labor bestehenden Erfahrungen und dem Erfahrungsaustausch mit unseren Kooperationspartnern in den U.S.A. (M. McClelland, S.K.C.C., San Diego, CA) sowie jüngsten Resultaten aus der Nukleinsäureforschung (B. R. Jordan, Hum Mol Gen, 1999, *Sensitivity issues...and performance of nylon microarrays*) wurden PCR-Amplifikate der ausgewählten EST-Klone, durchschnittliche Insertlänge etwa 1000 bp, in Konzentrationen um 0,5 μ M (0,3 – 0,5 μ g pro μ l) in einem 96-“well” Format vorgelegt. Ausgehend von diesem Format wurden diese ds-cDNAs mittels "Microspotter" (BioMek2000, EUROGENETEC, Belgien) in "Dots" mit Durchmessern zwischen 700-800 μ m im Abstand von etwa 1,25 mm auf auf 2x3 cm großen Nylon-Filter gespottet. Jedes cDNA-Fragment war bei dem zuletzt produzierten Prototyp in "Doppelspots" repräsentiert. So standen zwei Signale pro Gen zur Auswertung zur Verfügung. Das applizierte Volumen lag bei 50-70 nl/“spot”, so dass die immobilisierte DNA-Menge im Bereich von etwa 20 ng lag. Bei durchschnittlich 1000 bp Länge der PCR-

Produkte entspricht dies etwa 25×10^9 Molekülen. Bei einer "Spotgröße" von 700-800 μm und einer Dicke der Membran von ca. 100 μm verteilt sich die "Target"-DNA in einem Volumen in der Größenordnung von $10^7 \mu\text{m}^3$. Legt man die Dimensionen eines einzelnen ds-DNA-Moleküls von 1000 bp zugrunde, ist dies mehr als das hundertfache des Volumens aller DNA-Moleküle zusammen. So kann man annehmen, dass jedes dieser Moleküle *ohne* gegenseitige sterische Behinderung als selbstständiges Fänger-Molekül ("Target") wirksam werden kann. Aufgrund der theoretischen Daten anderer Arbeitsgruppen, beispielsweise von Bernard K. et al. (*Nucleic Acids Res* 8, 1996: Multiplex messenger assay) dürfte die Sensitivität des hier vorgestellten Arrays etwa im Bereich eines Multi-Northernblots liegen.

2.5.2. Probengenerierung

Soweit nicht mit SMART-ds-cDNA gearbeitet wurde, dienten als Ausgangsmaterial für die Generierung radioaktiv markierter cDNA Proben für die Hybridisierung der Arrays jeweils 1-2 μg gesamtzelluläre oder 500 ng poly(A)-RNA, die zuvor mittels RNeasy-System (Qiagen) aus den oben beschriebenen in vitro Progressions-Modellen isoliert und anschließend nach Protokoll mit DNase behandelt wurden. Die Präparation der poly(A)-RNA aus der Gesamt-RNA erfolgte gegebenenfalls mit "Magnetic Beads", die mit oligo(dT) beladen sind (Dynal, Norwegen).

Die RNA wurde entweder unter Verwendung eines oligo(dT)-Primers oder eines Sets von random hexamer Primern (beide Boehringer, Mannheim) und der Reversen Transkriptase Superscript II (Gibco) in cDNA transkribiert. Während der RT-Reaktion erfolgte auch der Einbau von ^{32}P markiertem dCTP. Überschüssige radioaktive Nukleotide wurden durch Filtration über "NucTrap" Säulchen von Stratagene (Chatsworth, USA) nach Protokoll des Herstellers entfernt.

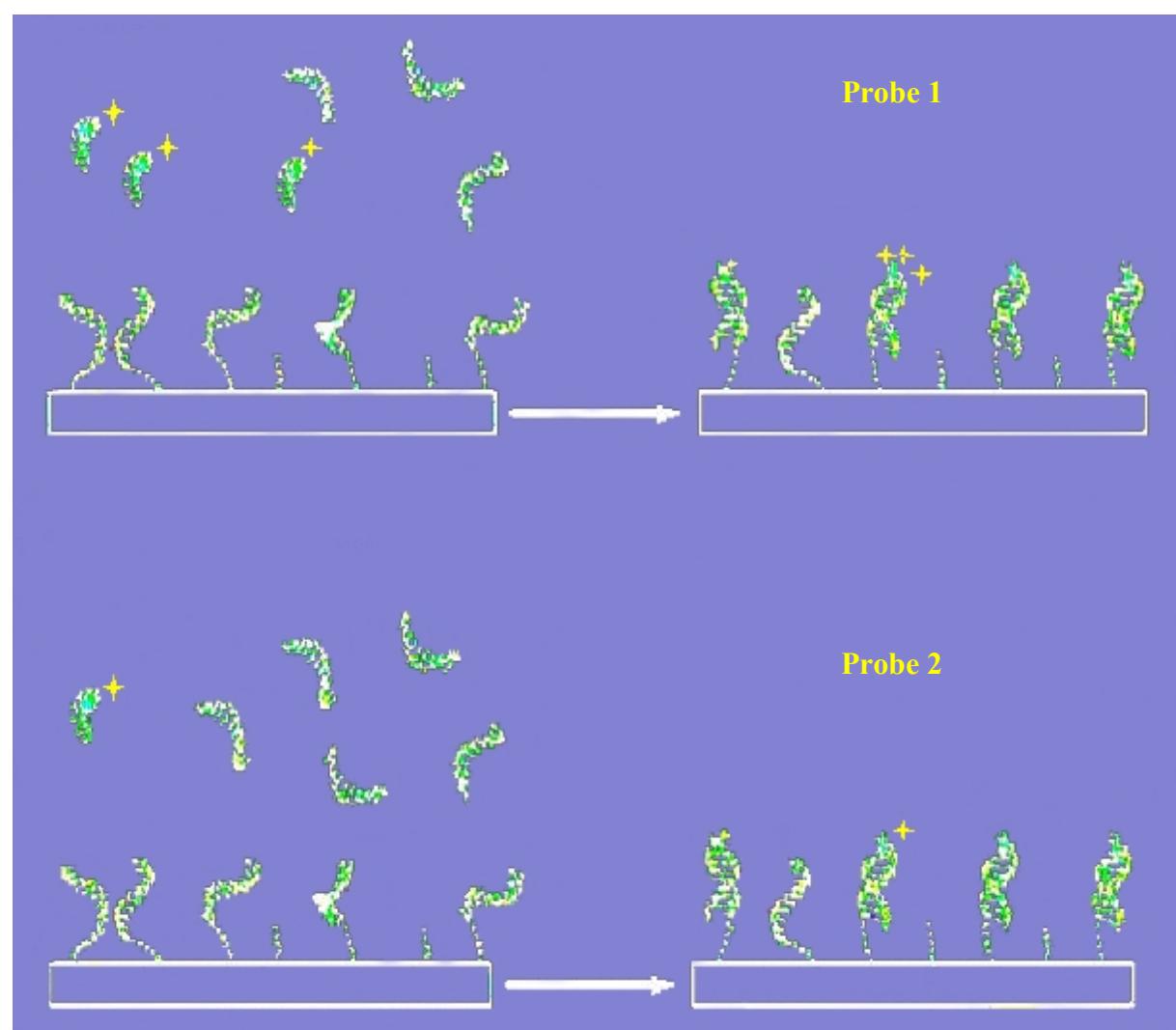
Um bei der anschließenden Hybridisierung annähernd gleiche Ausgangsmengen an Radioaktivität für die zu vergleichenden Proben einzusetzen, wird zuvor die Intensität der Markierung durch Messung von je 1 μl der markierten Probe im automatischen Beta-Counter (Wallac) nach einem speziell für ^{32}P definierten Messprotokoll bestimmt. Im Schnitt werden bei der oben beschriebenen Markierungsmethode Werte zwischen $1,5 \times 10^6$ und $1,5 \times 10^7$ CPM / μl erreicht.

2.5.3. Hybridisierung

Die cDNA-Arrays wurden paarweise mit je zwei zu vergleichenden radioaktiv markierten cDNA-Proben hybridisiert oder in größeren Serien falls mehrere RNA-Profile verglichen werden sollten.

Hierzu wurden die Nylonmembranen in Glaskrüppeln (roller bottles) gelegt, kurz mit 6xSSC gespült und anschließend in 5 – 20 ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen prähybridisiert.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hybridisierung von cDNA-Arrays mit radioaktiv markierter cDNA aus zwei unterschiedlichen Proben.



Am folgenden Tag werden die Proben vorbereitet. Für die Hybridisierung werden je $1,5 \cdot 10^7$ CPM an Radioaktivität pro Probe eingesetzt. Eine entsprechende Menge an Probenlösung wird mit 100 µl Heringssperma-DNA gemischt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. In der Zwischenzeit wird die Hybridisierungslösung aus der Prähybridisierung durch frische, auf 42°C vorgewärmte Lösung ersetzt. Die denaturierten Proben werden kurz auf Eis gestellt und dann in die Hybridisierungslösungen gegeben. Nach Hybridisierung über Nacht bei 42°C werden die Filter am nächsten Tag in mehreren Schritten gewaschen. Die Zahl der Waschschritte richtet sich nach der Intensität der Strahlung, die nach jedem Schritt mittels Handgeigerzähler überprüft wird. Typischerweise wurde zunächst zweimal 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 x SSC / 0,1% SDS Puffer, anschließend 30 Minuten bei 42°C mit 0,1 x SSC / 0,1% SDS Puffer gewaschen. Sind danach weitere Waschschritte notwendig, um die Strahlung auf ein gewünschtes Niveau zu drücken, wird für jeweils weitere 30 Minuten bei schrittweiser Erhöhung der Temperatur bis 70 °C gewaschen. Derart hohe Temperaturen sind jedoch nur selten erforderlich.

Obige Abbildung (Nr. 6) visualisiert schematisch das Arrayprinzip: Zwei zu vergleichende z.B. radioaktiv markierte cDNA Pools (“Probe”) mögen beispielsweise ein bestimmtes cDNA Fragment in unterschiedlicher Menge enthalten als Ausdruck der differentiellen RNA Expression. Bei der Hybridisierung nach den von Southern beschriebenen Prinzipien liegen auf den Arrays idealerweise gleiche Mengen von komplementären “Target”-Molekülen vor. Daher wird nach einer Kinetik der Form

$$S = c_t \cdot c_p \cdot t + k$$

(mit S Signalintensität, t Zeit, c_t Konzentration des Targets, c_p Konzentration der Probe) auf dem Array, der mit der Probe, die das Einzelfragment in höherer Konzentration enthält, hybridisiert wurde, ein vergleichsweise stärkeres, der Konzentration des Einzelfragmentes linear- proportionales Signal detektierbar sein.

2.5.4. Autoradiografie (Röntgenfilm und Phosphorimager)

Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgt sowohl mittels Röntgenfilm, als auch auf einer Phosphorimager-Folie. Während Röntgenfilm-Autoradiografien vor allem zur augenscheinlichen Beurteilung und Dokumentation der Ergebnisse herangezogen werden, erlaubt der Phosphorimager die direkte Quantifizierung der Signal-Intensitäten. Außerdem ermöglichen kurze Expositionszeiten beim Phosphorimager eine frühe Bewertung der Qualität der Hybridisierung.

Die Exposition der Röntgenfilme dauerte je nach Strahlungsintensität der Filter ein bis drei Tage. Sie wurden anschließend mit einem automatischen Entwickler der Firma Kodak entwickelt.

Phosphorimager-Folien werden eventuell vor der Exposition durch 15 minütige Bestrahlung mit weißem Licht auf einem "Eraser"-Leuchtschirm gelöscht. Die Expositionszeit liegt zwischen einer Stunde und einem Tag. Längere Expositionszeiten verbessern die Qualität der Autoradiografie nicht. Anschließend wurden die "Imager-Folien" mit einem kombinierten Fluoro-Phosphorimager (STORM, Molekular Dynamics) vermessen. Das Gerät tastet dabei die Imager-Folie zeilenweise mit einem Laser ab und registriert die Intensität der von der Folie abgestrahlten Lichtquanten. Die Steuerung des Gerätes erfolgt per Computer mit der Software "ScannerControl". Hier können entsprechende Messparameter wie z.B. Scanbereich, Art der Strahlung, Auflösung usw. voreingestellt werden. Die Messergebnisse werden digitalisiert und auf entsprechenden Medien gespeichert. Sie können anschließend mit entsprechender Software wie z.B. ImageQuant oder AIDA visualisiert und nach Export in z.B. MS Excel ausgewertet werden.

2.5.5. Messung und Auswertung der Signalintensitäten

Vor der quantitativen Auswertung der Signalintensitäten wurden potentiell regulierte Kandidatengene durch visuellen Begutachtung der Röntgenfilm-Autoradiografien auf einem Leuchtschirm vorselektiert. Hierbei wurden die Filterpaare korrespondierender Proben z.B. Zelllinien "P" versus "SM", miteinander verglichen und Spots mit deutlich sichtbaren Unterschieden in der Signalstärke markiert. Später kann nach

ImageQuant® Auswertung oft eine Kongruenz der visuellen Auswahl und rechnerischen Bestimmung festgestellt werden, was einen wirklich guten Kandidaten meist auszeichnet.

Die im Phosphorimager gemessenen Signalintensitäten der cDNA-Arrays werden mit der ImageQuant® Software weiter analysiert. Die Software errechnet anhand der Messdaten eine Graustufen-Bitmap und erstellt eine Art Autoradiografie der Filter. Zur Bestimmung der Signalstärken der vorher ausgewählten Spots wird anhand dieser "Autoradiografie" um jeden dieser Spots ein kreisförmiger, gleichgroßer Messbereich definiert und mit einer eindeutigen Nummer versehen. Auf Befehl ermittelt die Software die Signalintensitäten aller markierten Messbereiche und gibt die Werte in einer Tabelle aus. Die Daten werden in das Tabellenkalkulations-Programm Excel (Microsoft) übertragen und weiter ausgewertet.

Zur Normalisierung der Daten auf zwei zu vergleichenden Arrays und zur Backgroundkontrolle wurde wie folgt verfahren: Es wurden 50 willkürlich über die gesamte Arrayfläche verteilte cDNA Spots ausgewählt, die keine erkennbaren Unterschiede z.B. zwischen Parental- und Tochterzelllinien zeigten. Anmerkung: Aus Vorarbeiten mittels RNA Fingerprinting (siehe Ergebnisse) geht hervor, dass die Zahl der in den hier verglichenen Zelllinien regulierten Gene um 1-2% liegt. Daher ist bei Auswahl von 50 Spots als internem Standard zur Normalisierung der Signalintensitäten zweier Arrays der Fehler durch möglicherweise regulierte Signale vernachlässigbar. Das durchschnittliche Signal der Normalisierungsspots auf Array A und B wird errechnet und deren Verhältnis als Korrekturfaktor berechnet. Würde beispielsweise eine Probe A durchschnittlich 20% weniger Signalintensität nach Hybridisierung aufweisen im Vergleich zu B, würden die Signale von A alle mit dem Faktor 1,25 multipliziert und so Vergleichbarkeit hergestellt. Außerdem sind alle cDNA Klone als Doppelspot auf den Filtern vorhanden. Um die Gefahr falscher Befunde aufgrund unregelmäßiger Hybridisierung zu minimieren, werden bei der Auswahl nur Klone mit gleicher Intensität beider Signale eines Spotpaars berücksichtigt (Signalratio $1,0 \pm 0,2$). Da bei dieser in den Daten verankerten Normalisierung auch der möglicherweise unspezifische Background mit einfließt und gleichzeitig mitabgeglichen wird, kann jetzt prinzipiell die Intensität jedes Spots auf A mit dem korrespondierenden auf B verglichen werden.

Um potentiell regulierte Kandidatengene auch rechnerisch, quantitativ zu bestätigen, wird das Verhältnis der Signalstärken korrespondierender Spots z.B. einer Tochterzelllinie versus der Parentallinie, errechnet. Als Kandidaten im Sinne differentieller Genexpression galten in unserer Untersuchung nur cDNAs, deren Verhältnis der Signalintensitäten sich um einen Faktor von mindestens 2,5 unterscheidet.

2.5.6. Identifizierung der regulierten Kandidatengene

Nach Auswertung der Signalintensitäten und Auswahl potentiell regulierter cDNAs wird die Identität dieser Kandidatengene ermittelt. Da jede der über 27000 cDNAs eines Hochdichteklon-Filters in der Datenbank des Ressourcenzentrums in Berlin erfasst ist, erfordert die Identifikation der regulierten Klone wesentlich weniger Aufwand als beispielsweise beim RNA Fingerprinting mittels RAP-PCR.

Zunächst müssen die genauen Koordinaten der ausgewählten Kandidatenspots auf dem Filter bestimmt werden. Dazu legt man die Autoradiografie des Filters auf ein vom R.Z.P.D. zusammen mit den Arrays geliefertes Raster. Dieses Raster zeigt das Spottingmuster der Hochdichteklon-Arrays und unterteilt den Filter in 48 Zeilen und ebenso viele Spalten. Auf diese Weise werden $48 \times 48 = 2304$ Felder definiert, die anhand der entsprechenden Koordinaten eindeutig adressiert werden können. Jedes dieser Felder ist wiederum in 25 kleinere Quadrate unterteilt. Sie geben anhand von 12 möglichen Spottingmustern die Lage eines Doppelspots in Bezug zu einem Referenzspot an. Die relative Position eines Spots erhält man durch die Koordinaten des Quadrates, in dem dieser Spot liegt. Zur Bestimmung der Position eines bestimmten Doppelspots ermittelt man zuerst die Koordinaten des Feldes, in dem dieser Doppelspot liegt, z.B. X-Koordinate (=Spalte) = **12** und Y-Koordinate (=Zeile) = **36**. Anschließend vergleicht man das Spottingmuster des Doppelspots mit den 12 möglichen Varianten, z.B. Muster 9: Die Einzelpots dieses Paares liegen in den Quadranten 1-3 und 5-3. Also lauten die Koordinaten $x_1=1$; $y_1=3$ und $x_2=5$; $y_2=3$. Aus den Groß- und Kleinkoordinaten werden durch die Formeln $X_{1/2}=5*(X-1)+x_{1/2}$ und $Y_{1/2}=5*(Y-1)+y_{1/2}$ die exakten X- und Y-Koordinaten der beiden Einzelpots eines Spotpaars errechnet. In unserem Beispiel bedeutet dies: $X_1=5*(12-1)+1 = 56$; $Y_1=5*(36-1)+3 = 178$; $X_2 = 60$; $Y_2 = 178$. Mit diesen vier Werten kann man

anschließend auf einer Internetseite des Ressourcenzentrums eine Datenbankabfrage durchführen und erhält als Ergebnis die R.Z.P.D. – spezifische Identifikationsnummer des cDNA-Klons, dessen Doppelspot durch obige Koordinaten bestimmt wurden. Anhand dieser Identifikationsnummer können zu jedem cDNA-Klon des Ressourcenzentrums entsprechende Informationen abgefragt werden, z.B. aus welcher cDNA-Bibliothek stammt der Klon, wie sieht die Sequenz der cDNA aus, ist der Klon Teil eines sogenannten Genclusters, und - sofern bekannt - für welches Gen codiert die cDNA. Ist letzteres nicht bekannt, kann mithilfe des "BLAST Search Tools" der N.C.B.I. Website eine aktuelle Datenbanksuche starten und beispielsweise in der humanen dbest Bank nach Einträgen der Sequenz oder signifikant ähnlichen Sequenzen oder signifikant überlappenden Sequenzen bekannter cDNAs suchen.

Mit dieser Vorgehensweise wurden in der vorliegenden Arbeit durch die Hybridisierung der R.Z.P.D.-Arrays 41 Gene identifiziert, die in den untersuchten Progressionsmodellen des malignen Melanoms regulierte Expression zeigten.

2.5.7. Bestätigende Verfahren

Auch die Suche nach differentiell exprimierten Genen mittels Hybridisierung von cDNA-Arrays ist mit einer gewissen Fehlerrate behaftet. Unterschiedliche Signalstärken aufgrund unregelmäßiger Hybridisierung und Fehler bei der Identifizierung von Kandidatengenen können zu falsch-positiven Befunden führen. Um diese auszuschließen, müssen analog zur RAP-PCR vermeintlich regulierte Kandidatengene durch weitere Verfahren überprüft werden. Da die Array-gestützten Untersuchungen an in vitro Modellen durchgeführt wurden, stand ausreichend RNA für die Analyse der Kandidatengene im Northern Blot (siehe oben) zur Verfügung. Durch semiquantitative RT-PCR an cDNAs respektive RNA aus Geweben verschiedener gut- und bösartiger melanozytärer Hautläsionen können die Kandidatengene darüber hinaus bezüglich ihrer Relevanz bei der Tumorprogression in vivo und möglicher Verwendbarkeit als diagnostisch-prognostische Marker beim malignen Melanom weiter getestet werden.

3. Ergebnisse

3.1. RAP-PCR

Im Rahmen des in der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten molekularen „Profilengs“ unterschiedlich progressiver Phänotypen des malignen Melanoms wurde mithilfe des RNA-Fingerprintings nach der Methode von J. Welch und M. McClelland folgende Fragen bearbeitet:

- a) Wie groß ist die Klasse der exprimierten mRNAs, die spezifisch mit dem malignen Phänotyp assoziiert sind?
- b) Wie scharf ist die Trennlinie auf mRNA-Niveau zwischen benignem, malignem und metastasierendem Phänotyp?
- c) Welche Genprodukte (Transkripte) im einzelnen charakterisieren den malignen Phänotyp bzw. sind mit einem gesteigerten Metastasierungsrisiko *in vivo* assoziiert?

3.1.1. RAP-PCR an Gewebematerial

3.1.1.1. Differenzielle Genexpression in melanozytären Tumoren unterschiedlicher Dignität

Untersuchungen an Geweben humaner Hauttumoren sollten am ehesten Aufschluss über die während der Progression melanozytärer Läsionen auftretenden Veränderung der Genexpression *in vivo* geben, sind aber andererseits durch den relativen Mangel an qualitativ hochwertiger RNA schwierig durchzuführen. Entsprechend konnten nur relativ wenige cDNA Amplikons mit einer limitierten Zahl von Primerkombinationen untersucht werden. Die Interpretation ist zusätzlich erschwert durch PCRs die mit RNA-qualitätsbedingter eingeschränkter Effizienz liefen oder ganz ausfielen.

Ausgehend von jeweils (50), 100 und 200 ng RNA, die nach vorher beschriebener Methode (Punkt 2.1.2. und 2.1.3.) aus diversen Gewebestücken humaner Hauttumoren isoliert wurde, wurden mittels RAP-PCR 5 melanozytäre Nävi (gutartige Pigmenttumoren der Haut), 8 primäre maligne Melanome und 10 Melanommetastasen vergleichend hinsichtlich differentieller Genexpression untersucht. Mit drei verschiedenen arbiträren Primerkombinationen (Erststrang/Zweitstrang: OPN24/ KinA++, OPN24/KinA+ und OPN24/OPN28;

Sequenzen siehe Material und Methodik) wurden insgesamt ca. 800 cDNA Amplikons pro Läsion dargestellt.

Etwa 1,75% aller Amplikons (14 Fragmente) erfüllten die eingangs definierten Kriterien für differentielle Genexpression (visuelle Auswahl, densitometrisch kontrolliert mindestens 4-fache differentielle Amplifikation).

In der folgenden Tabelle gilt 0 als nicht-reguliert, 1 als herunterreguliert und 2 als hochreguliert. Tabelle 2 macht deutlich, dass einerseits Transkripte existieren, die global die Nävusgruppe gegen maligne Pigmenttumoren abgrenzen, z.B. Fragment 1 und 14. Diese stellen insbesondere Kandidaten für die immer noch fehlenden Marker zur Abgrenzung „gut-böse“ dar.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Gewebe RAP-PCR Daten

Nr	OCR	NZN(N=5)	MM	Filia															
1	0 22222222 2222222222	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
11	0 22220000 0002220020	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	2
14	0 11111111 1111111111	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0 00222000 2222222222	0	0	0	2	2	2	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	0 02000000 0000000200	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
9	0 00010010 1010111111	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
12	0 00022200 2222222222	0	0	0	0	2	2	2	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	0 00000111 1111111111	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	0 00000011 1111111111	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	0 00000001 1111111111	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	0 00000000 2222222222	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
8	0 00000000 1111111111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	0 00000000 0111111111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	0 00000000 0020200020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	

Die Mehrzahl der differentiell exprimierten Amplikons charakterisieren dagegen Subsets z.B. Fragmente 10, 11 und 12, die in einem Teil der Melanomfälle und in den Metastasen fasst durchgehend gleichsinnig reguliert erscheinen. Diese Kandidaten sind unter dem Gesichtspunkt prognostischer Information besonders relevant.

In Abbildung 5 ist eine Autoradiografie eines RNA-Fingerprintings von dem oben tabellarisch repräsentierten Set melanozytärer Tumoren dargestellt. In diesem Beispiel wurde die RAP-PCR mit den Oligos OPN24 und KinA++ durchgeführt. Unter Punkt 2.3.1. sind die Sequenzen aller in den hier vorgestellten RAP-PCR Experimenten verwendeten Primer aufgelistet. Die Fragmentbanden Nr. 10, 11 und 12 (siehe Markierungen) zeigen deutliche, wie eingangs definierte Unterschiede in

der Amplifikation. Weitere Beispiele finden sich in Abbildung 6. Drei besonders prominent regulierte Fragmente wurden zur weiteren Identifikation beziehungsweise für die weitere Charakterisierung nach unter Punkt 2.3.2. beschriebenem Verfahren ausgewählt.

Abbildung 5: RAP-PCR Fingerprint an Geweben

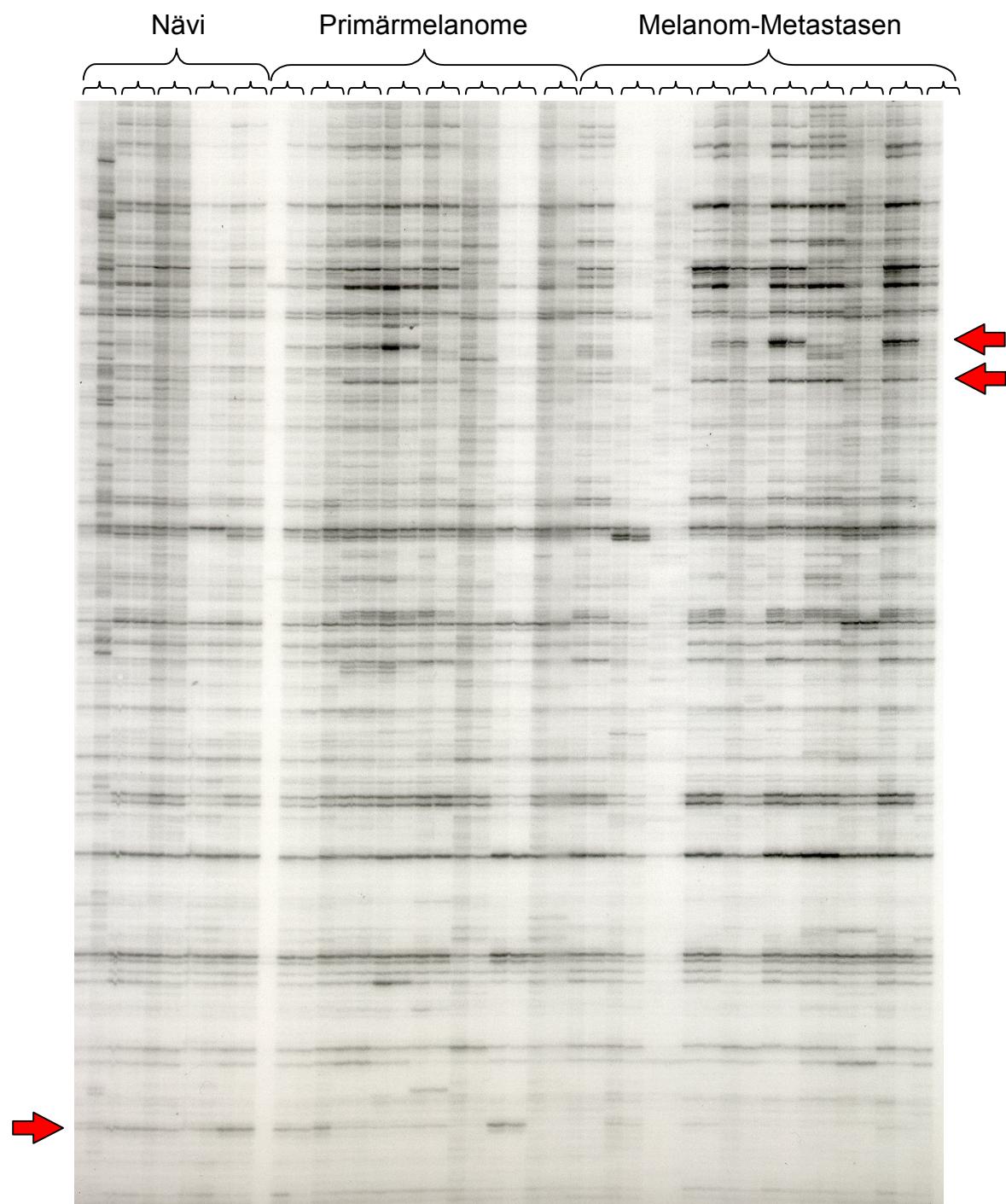
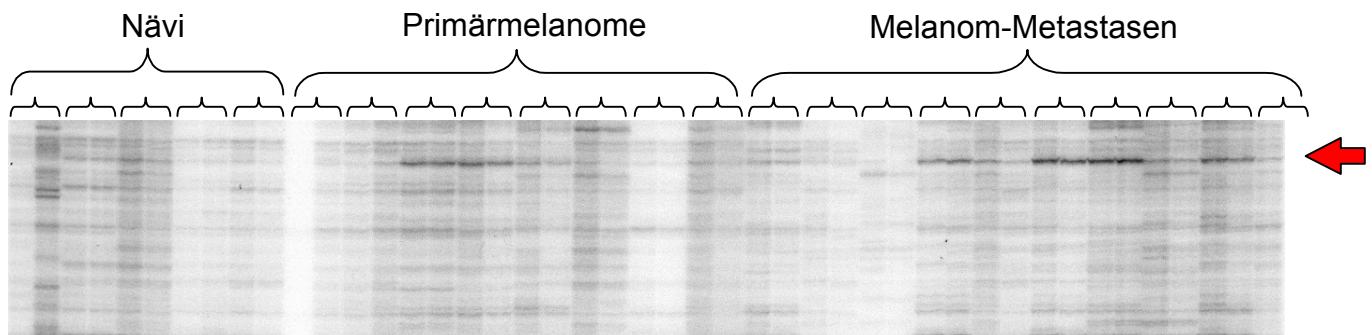
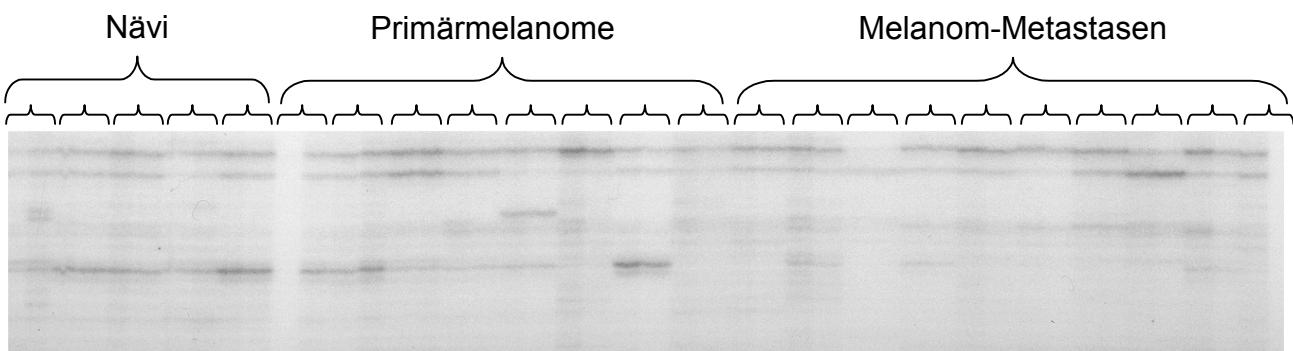


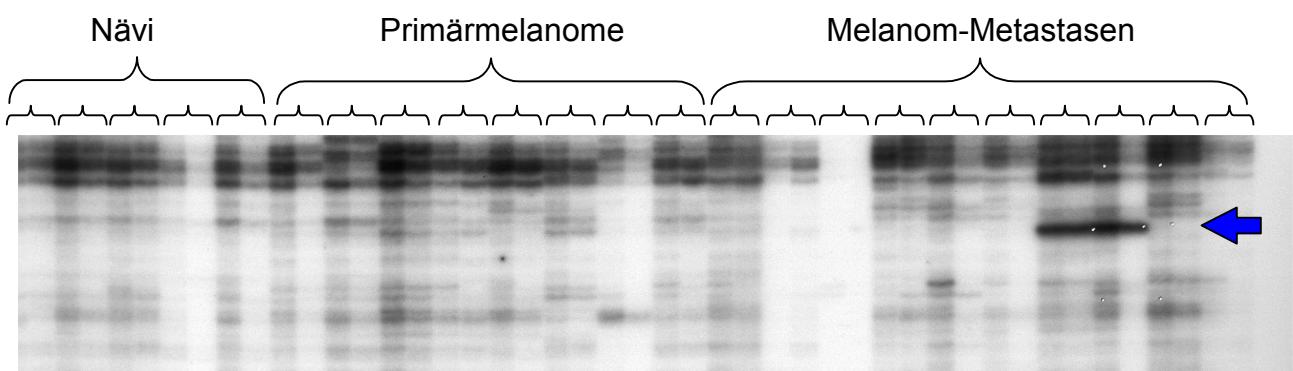
Abbildung 6: Beispiele differentiell exprimierter RAP-PCR Fragmente (Gewebe)



Beispiel eines Transkripts, das in einer Subgruppe von Primärmelanomen und Melanom-Metastasen verstärkte Expression zeigt (roter Pfeil)



Dieses Transkript zeigt hingegen in der Gruppe der Navi und in einigen Primärmelanomen verstärkte Expression (grüner Pfeil)



Dieses Transkript ist offensichtlich in einem Subset der MM-Filiae stark exprimiert (blauer Pfeil)

Zur weiteren Identifizierung, d. h. Überprüfung, ob die cDNA-Sequenz einem bekannten Gen zugeordnet werden kann, wurden drei der ausgewählten Kandidatenfragmente aus den Gelen eluiert, mit den entsprechenden Primern reamplifiziert und kloniert. Von diesen drei PCR-Produkten führte lediglich die Klonierung der cDNA aus Fragment Nr. 5 zu einer konkreten Sequenz, die nach Überprüfung in der „dbest“ Datenbank des N.C.B.I. dem Gen „KIAA0369“ zugeordnet werden konnte, einem in voller Länge definierten Gen, dessen Funktion aber bisher unbekannt ist. Die anderen Fragmente ließen sich nicht reproduzierbar reamplifizieren und konnten nicht weiter verfolgt werden.

3.1.2. RAP-PCR an Zelllinien der *in vitro* Modelle

Aufgrund der Probleme limitierter RNA Ressourcen und zum Teil mäßige RNA Qualität von Gewebematerialien wurden mithilfe der RAP-PCR drei isogene humane Melanomprogressionsmodelle (Zelllinien) analysiert, die expressionsgenetische Veränderungen in Abhängigkeit von unterschiedlicher Tumorigenität (Tumorwachstum nach s.c. Injektion in die Nacktmaus), Invasivität (bezogen auf die Boyden-Kammer) und Metastasierungspotenz (bei Nacktmausversuchen) erwarten ließen.

Wie unter Punkt 2.1.1.1. beschrieben umfassen die in dieser Arbeit untersuchten Progressionsmodelle die humanen Melanomzelllinien:

„20“ (Primärmelanomlinie WM1341B)	{	unterschiedliche Tumorigenität
„22“ (Tochterlinie WM1341B-22)		
„23“ (Tochterlinie WM1341B-23)		
„30“ (Primärmelanomlinie WM35)		
„32“ (Tochterlinie WM35-32)		
„33“ (Tochterlinie WM35-33)		
„IM“ (Primärmelanomlinie Mel-Im)	{	unterschiedliche Invasivität
„SI“ (Tochterlinie „schwach invasiv“)		
„HI“ (Tochterlinie „hoch invasiv“)		
„M“ (Primärmelanomlinie A375-M)	{	unterschiedliches Metastasierungspotential
„P“ (Tochterlinie A375-„poorly met.“)		
„SM“ (Tochterlinie A375-„strongly met.“)		
„C“ (Kontroll-Linie C8161)		

Abbildung 7: RAP-PCR-Fingerprinting an selektierten Zelllinien

(Der grüne Pfeil markiert eine differentiell amplifizierte cDNA in aggressiveren Varianten der Linie A375. Der rote Pfeil zeigt ein Transkript, dass nur im System 30/32/33 der primären Melanomlinie WM35 exprimiert wird. Dies stellt ein Beispiel eines individuellen wahrscheinlichen Polymorphismus dar und entspricht nicht den gemessenen regulierten Kandidaten)

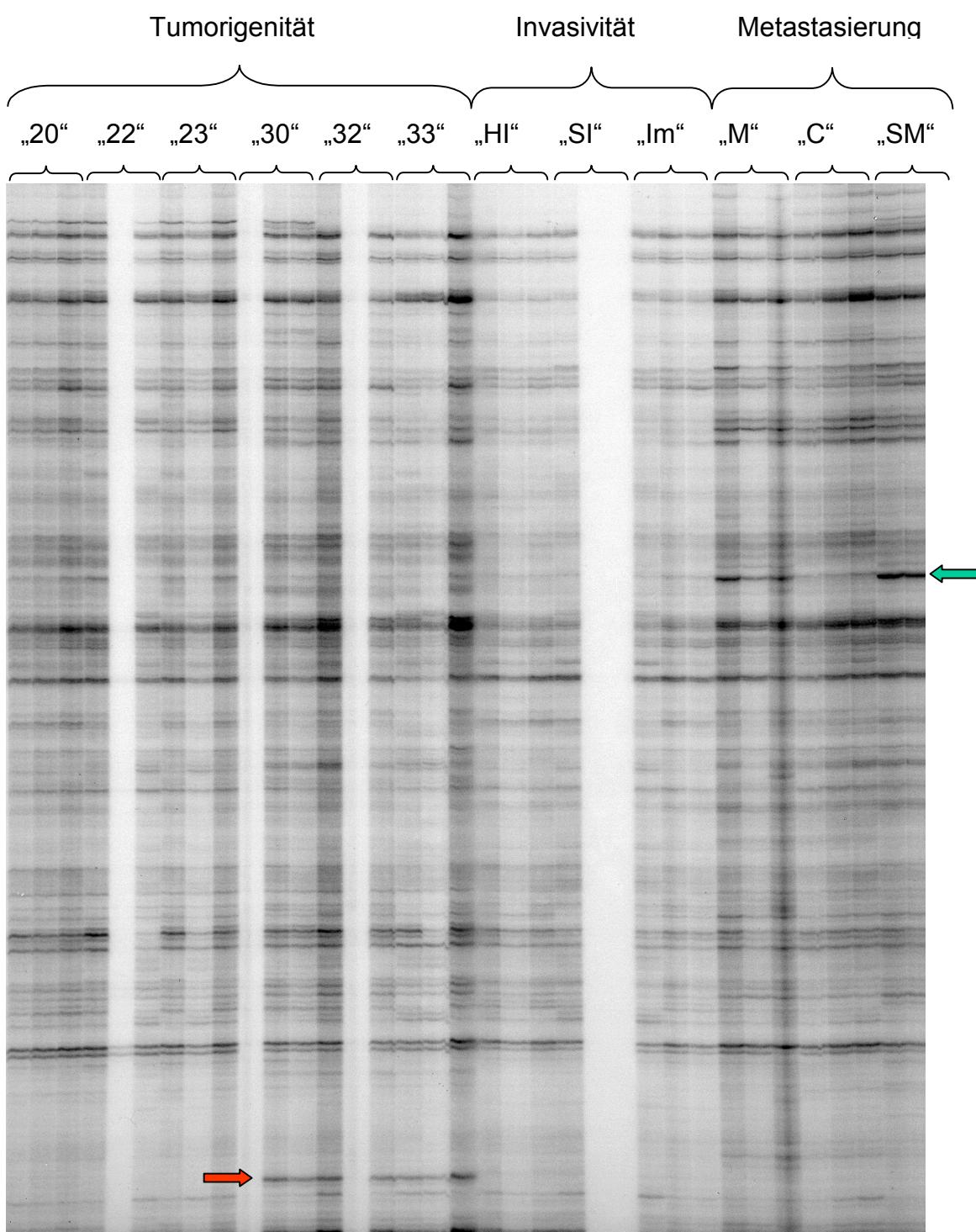
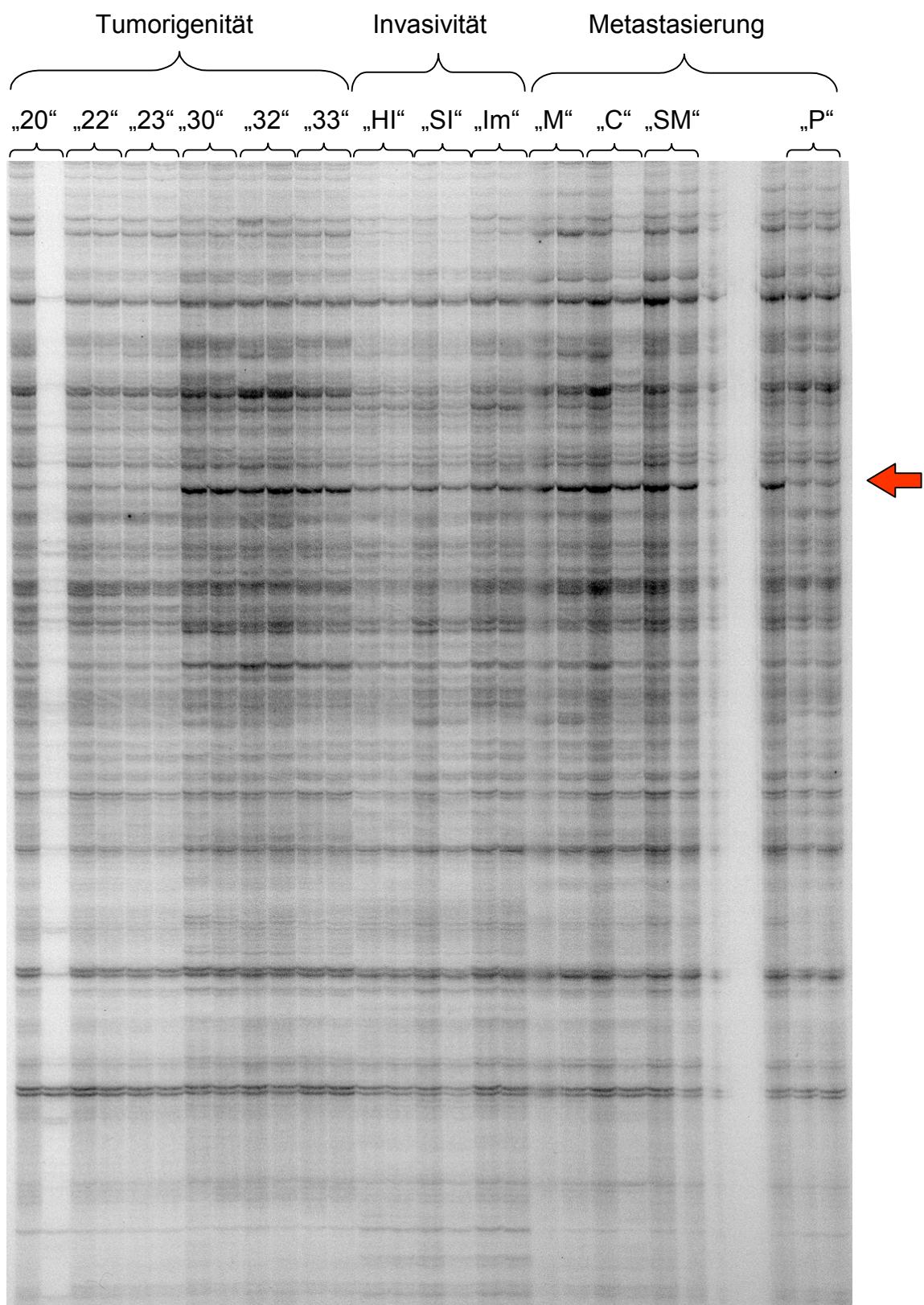


Abbildung 8: Differentiell exprimierte cDNA in den selektierten in vitro Modellen

Der Pfeil markiert ein Amplikon, das auffallend in „P“ (poorly metastatic)

herunterreguliert scheint.



3.1.2.1. Differenzielle Genexpression in melanozytären Tumorzellen unterschiedlicher Dignität

Um eine Vorstellung über das Ausmaß der expressionsgenetischen Veränderungen in den untersuchten Progressionsmodellen zu erhalten, wurde zunächst die Gesamtzahl der im Fingerprinting sichtbar dargestellten PCR-Produkte abgeschätzt. Die Auszählung der in einem Fingerprint repräsentierten Transkripte *pro Primerkombination* in den jeweiligen Parentallinien ergab im Schnitt für jede der insgesamt vier Zellliniengruppen (Tumorigenität I/ WM1341B; Tumorigenität II/ WM35; Invasion/ Mel-Im; Metastasierung/ A375) zwischen 200 und 250 visuell auflösbare cDNA-Amplikons. Mit sechs verschiedenen Primerkombinationen wurden so in allen untersuchten Systemen insgesamt etwa 5000-6000 cDNA-Amplikons (etwa 1200 pro System) mittels RAP-PCR analysiert. Die Abbildungen 10, 11 und 12 zeigen einige Beispiele der RNA-Fingerprints an den selektierten Zelllinien.

Zur Auswertung wurden die Intensitäten der autoradiographisch dargestellten Fragmentbanden (cDNA-Amplikons) der jeweiligen Tochterlinien (22, 23; 32, 33; HI, SI; A375SM, A375PM) mit den korrespondierenden Banden der Parentallinien WM35, WM1341B, Mel Im und A375M verglichen (siehe Abschnitt B – „Material und Methoden“). Nach visueller Vorauswahl wurden nur Banden mit mindestens vierfacher Differenz in der Intensität (densitometrischer Vergleich) in die Wertung einbezogen. Insgesamt wurden 126 Transkripte identifiziert, die nach diesem Kriterium differentielle Expression zeigten. Das sind rund 2,5% aller dargestellten Amplikons. Für die statistische Auswertung und Einteilung der Befunde in Gruppen gleicher Regulation wurde ein dem oben bei Geweben entsprechend beschriebener Zahlencode verwendet. Demnach erhielt die Parentallinie immer die Referenzziffer „0“. Ein Transkript, das in einer korrespondierenden Tochterlinie mindestens 4-fache Überexpression zeigte, erhielt die Ziffer „2“, wohingegen ein vermindert exprimierte Amplikon mit der Ziffer „1“ versehen wurde. Die Ziffer „0“ bei einer Tochterlinie zeigt an, dass die Expression dieses Transkriptes im Vergleich zur Parentallinie unverändert ist.

Bei der Auswertung fiel auf, dass sich die regulierten Transkripte in bestimmte Kategorien immer wiederkehrender Regulationsmuster, sogenannte „observed categories of regulation“ (OCRs) einordnen ließen. Ein Regulationsmuster das häufig

auftrat, ist beispielsweise die progressionsabhängige Hochregulierung der Expression eines bestimmten Transkripts. Bei einer solchen OCR findet man *in beiden* Tochterlinien im Vergleich zur Parentallinie eine Überexpression des Transkriptes. Entsprechend der Codierung wird diese OCR mit der Ziffernfolge 0-2-2 beschrieben (vgl. Tabelle 3: OCR I.5 und II.6). In der Tabelle 3 sind alle in den Progressionsmodellen beobachteten OCRs aufgelistet.

Tabelle 3: Kategorien (OCRs) möglicher differentieller Expression in den untersuchten Progressionsmodellen

Progressionsmodell	Zelllinien			Anzahl der Transkripte
Tumorigenität I: WM1341B	„30“	„32“	„33“	
OCR I.1	0	0	2	6
OCR I.2	0	1	0	1
OCR I.3	0	1	1	14
OCR I.4	0	2	0	1
OCR I.5	0	2	2	12
Tumorigenität II: WM35	„20“	„22“	„23“	
OCR II.1	0	0	1	9
OCR II.2	0	0	2	4
OCR II.3	0	1	0	1
OCR II.4	0	1	1	10
OCR II.5	0	2	0	4
OCR II.6	0	2	2	5
Invasion: Mel-Im	IM	SI	HI	
OCR III.1	0	0	1	3
OCR III.2	0	0	2	6
OCR III.3	0	1	1	11
OCR III.4	0	2	0	2
OCR III.5	0	2	2	5
Metastasierungspotential: A375	C	M	P	SM
OCR IV.1	0	0	0	2
OCR IV.2	0	0	2	2
OCR IV.3	0	0	2	0
OCR IV.4	0	2	0	2
OCR IV.5	0	0	1	0
OCR IV.6	0	1	0	1
Gesamtzahl aller als reguliert befindeten Transkripte				126

OCR = „observed category of regulation“; 0=keine quantitative Veränderung, 1=Verminderung, 2=Zunahme der mRNA-Kopienzahl (jeweils mindestens 4fach).

In beiden in vitro Modellen die hinsichtlich zunehmender Tumorigenität und Multizytokinresistenz selektiert wurden (WM35: „20“-„22“-„23“ und WM1341B: „30“-„32“-„33“) waren durchschnittlich 2,8% der Amplikons (33 bzw. 34 von jeweils 1200) differentiell exprimiert. In diesem Progressionsmodell fanden wir bei insgesamt 24 Transkripten eine verminderte Expression in den aggressiveren Zelllinienvarianten im Vergleich zur primären Melanomlinie. Damit war die OCR I.3 bzw. II.4 das am häufigsten vorkommende Expressionsmuster (Code 0-1-1) in diesem System. Die zweitgrößte Kategorie mit zusammen 17 Transkripten bildeten die OCRs I.5 und II.6, die eine Klasse von Transkripten repräsentiert, die wie im Beispiel oben schon erwähnt, in beiden Tochterlinien vermehrt exprimiert werden (Code 0-2-2). Die restlichen 26 Transkripte des „Tumorigenität“-Modells verteilen sich auf 7 verschiedene Kategorien (OCR: I.1, I.2, I.4, II.1, II.2, II.3 und II.5). Sie zeigten nur in einer der beiden aggressiveren Varianten gegenüber der Parentallinie veränderte (verstärkte oder verminderte) Genexpression. Die biologische Relevanz dieser OCRs hinsichtlich der Tumorigenität ist *a priori* genauso zu interpretieren wie bei gleichsinniger Regulation in zwei Tochterlinien, jeder Kandidat muss letztlich weiter validiert werden bezüglich der Relevanz *in vivo* und funktionellen Konsequenzen (siehe Diskussion).

Im Progressionsmodell der drei Zelllinien Mel-Im, „SI“ und „HI“, die in Boyden-Kammern in Bezug auf schwache oder hohe Invasivität selektiert wurden, fanden wir unter 1200 Amplikons 27 (rund 2,3%) differentiell regulierte Transkripte. Darunter befindet sich eine große Anzahl von Amplikons (insgesamt 16), die sowohl in der schwach invasiven, als auch in der hoch invasiven Variante der parentalen Melanomlinie Mel-Im durch verstärkte oder verminderte Expression auffielen. Ob diese gleichsinnige Regulation der Genexpression in zwei unterschiedlich invasiven Tochterlinien biologisch „Sinn macht“ oder auf die Selektion mit Boyden-Kammern zurückzuführen ist und damit ein methodisches Artefakt darstellt, bleibt zu erörtern. Andererseits wurden auch Transkripte beobachtet, die ausschließlich in den hoch invasiven HI-Zellen (OCR III.2, 6 Amplikons) oder in den schwach invasiven SI-Zellen (OCR III.4, zwei Amplikons) vermehrte Expression zeigten. Demgegenüber beobachteten wir in diesem System auch drei Amplikons, deren Expression nur in der HI-Variante herunterreguliert war (OCR III.1).

Auch im dritten Progressionsmodell, dessen Zelllinien „P“ und „SM“ durch Selektion hinsichtlich der Fähigkeit in athymischen Nacktmäusen solide Lungenmetastasen zu bilden von der Parentallinie A375 abgeleitet wurden, lag die Rate der differentiell exprimierten RAP-PCR Fragmente bei 2,5 %. Bei der größte Gruppe von Transkripten in diesem System beobachteten wir eine veränderte Genexpression in der schwach metastasierenden Zelllinie „P“. Hier waren 11 Amplikons im Vergleich zu den aggressiveren Zelllinien „M“, „SM“ und „C“ überexprimiert (OCR IV.3) und 9 Amplikons minderexprimiert (IV.5). Demgegenüber fanden sich in den Zelllinien mit größerem Metastasierungspotential („M“ und „SM“) 7 Transkripte (OCR IV.4) mit gesteigerter Expression und 1 Transkript mit verminderter Expression (OCR IV.6). Die OCR IV.1 umfasst 2 Amplikons, die ausschließlich in der stark metastasierenden Zelllinie „SM“ hochreguliert waren. Daneben lag auch in diesem Modell ein Transkript vor, dessen Überexpression sowohl in der stark metastasierenden Variante „SM“ als auch in der Variante mit der schwächsten Metastasierungsfähigkeit „P“ gleichsinnig reguliert war.

Insgesamt waren diese „paradox“ regulierten, möglicherweise als Modellartefakt anzusprechenden Phänomene in den Nacktmausmodellen ungleich seltener als in der Boydenkammer, was die Artefakteigung dieses *in vitro*-Modells erstmals gegenüber den *in vivo*-Modellen dokumentiert.

3.1.2.2. Einzelne Kandidatengene mit differentieller Regulation

Die RAP-PCR, wie auch alle anderen „multiple arbitrary amplicon“ - Techniken, beispielsweise das sogenannte „Differential Display“ nach Liang und Pardee, bringen es mit sich, dass man ausgehend von den Gelen relativ aufwendige weitere Verfahren benötigt, um die differentiell regulierten Transkripte zu identifizieren und ihren Regulationsmodus zu bestätigen (Vogt T et al., 1997): Aus der großen Menge von 126 Transkripten, die im RNA-Fingerprinting als möglicherweise differentiell exprimiert befunden wurden, wurden 24 besonders prominent reguliert erscheinende Amplikons aus den Fingerprint-Gelen ausgeschnitten, eluiert, reamplifiziert und TAKloniert (siehe Abschnitt 2.3.2.4. der Dissertation). Von den dabei erhaltenen Klonen wurden 200 - also jeweils 8 pro Amplikon - sequenziert. Bei vielen Transkripten ergab der anschließende Sequenzvergleich, dass die Sequenzen aller acht Klonen

eines Amplikons identisch waren. Die Abbildung 9 zeigt einen Ausschnitt des Alignments der Sequenzen von Transkript Nummer 1. Bei sechs von acht Klonen (1A, 1B, 1C, 1D, 1F, 1H) stimmen die Sequenzen überein. Die Klone 1E und 1G hingegen enthielten offensichtlich andere Sequenzen. An diesem Beispiel wird deutlich, dass beim Ausschneiden einer RAP-Bande vereinzelt auch kontaminierende Sequenzen miteluiert werden, die möglicherweise nicht oder sogar gegensinnig reguliert sein können. Naturgemäß muss deshalb die progressionsrelevante Regulation des Zielfragments in bestätigenden Verfahren nachgewiesen werden.

Abbildung 9: Alignment von Fragment 1

	230	240	260	270		
Klon 1A	A G T	G T G A G G A A G T T	A T G A A C C G G A A	T A A A A A C A G G G	A A G A A T A T A A A	T C A A G T
Klon 1B	A G T	G T G A G G A A G T T	A T G A A C C G G A A	T A A A A A C A G G G	A A G A A T A T A A A	T C A A G T
Klon 1C	A G T	G T G A G G A A G T T	A T G A A C C G G A A	T A A A A A C A G G G	A A G A A T A T A A A	T C A A G T
Klon 1D	A G T	G T G A G G A A G T T	A T G A A C C G G A A	T A A A A A C A G G G	A A G A A T A T A A A	T C A A G T
Klon 1F	A G T	G T G A G G A A G T T	A T G A A C C G G A A	T A A A A A C A G G G	A A G A A T A T A A A	T C A A G T
Klon 1H	A G T	G T G A G G A A G T T	A T G A A C C G G A A	T A A A A A C A G G G	A A G A A T A T A A A	T C A A G T
Klon 1G	T G G	C C C A G G G A T C A	G T A G G T T G G A A	T A G C T C C A G G C	T A T C A G T C T G	T C A G G T
Klon 1E	A A T	T C C A G G C A G G C A	G C T G A C A G A C	T G A T A G G C T G G	A G C I A T T C C C A	C C T A C T

Insgesamt wurden 46 verschiedene Sequenzen mit unterschiedlicher Häufigkeit in den 24 Geleluaten festgestellt. Mithilfe des „BLAST Search Tools“ der N.C.B.I. - Website wurde in entsprechenden Datenbanken versucht, für diese 46 Sequenzen Übereinstimmungen zu bekannten Genen zu finden. Nur sechs dieser Sequenzen konnten mit hoher Wahrscheinlichkeit bekannten Genen (Stand 1998) zugeordnet werden. Diese Gene waren im Einzelnen: Acidic Calponin, KIAA0369 Gene, Human Cyclophilin, Human Replication Factor C, Phosphatase 2A alpha subunit und das DPC4 Gen (siehe Tabelle 4). Bei zwölf weiteren Sequenzen wurde lediglich eine Übereinstimmung mit bekannten cDNA Klonen gefunden (U90911, AC002038, AC005856, AC004656, AA389641, D81387, 33862, 262583, 1370641, 588359, 197438, 206199). Die Mehrzahl der 46 klonierten RAP-Fragmente jedoch fanden keinen übereinstimmenden Eintrag in den Datenbanken, stellen also neue, bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte EST-Sequenzen dar. Diese 22 neuen Sequenzen wurden sämtlich in der N.C.B.I.-„Genbank“ publiziert (Rumpler G et al., „accession numbers“: AF119298 – AF119319). In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Datenbankrecherche mit den 46 regulierten RAP-PCR Sequenzen zusammengefasst.

Tabelle 4: Ergebnis der Datenbankabfrage mit den RAP-PCR Sequenzen

Gen	Progressionsmodell		
	Tumorigenität	Invasivität	Metastasierung
Saures Kalponin			↑
KIAA0369 Gen			↑
Humanes Zyklophilin			↓
Humaner Replikationsfaktor C			↑
Phosphatase 2A alpha Untereinheit			↑
DPC4 Gen	↓		
Accession Nr.: U90911			↑
Accession Nr.: AC002038		↑	
Accession Nr.: AC005856			↑
Accession Nr.: AC004656			↑
Accession Nr.: AA389641	↓		
Accession Nr.: D81387			↑
IMAGE Klon 33862			↑
IMAGE Klon 262583			↑
IMAGE Klon 1370641			↓
IMAGE Klon 588359		↑	
IMAGE Klon 197438		↑	
IMAGE Klon 206199	↓		
Accession Nr: AF119298	↑		
Accession Nr: AF119299	↑		
Accession Nr: AF119300	↑		
Accession Nr: AF119301			↓
Accession Nr: AF119302			↑
Accession Nr: AF119303			↑
Accession Nr: AF119304			↑
Accession Nr: AF119305			↑
Accession Nr: AF119306	↑		
Accession Nr: AF119307	↑		
Accession Nr: AF119308	↑		
Accession Nr: AF119309	↑		
Accession Nr: AF119310		↑	
Accession Nr: AF119311		↑	
Accession Nr: AF119312	↓		
Accession Nr: AF119313			↑
Accession Nr: AF119314			↑
Accession Nr: AF119315			↑
Accession Nr: AF119316			↑
Accession Nr: AF119317			↑
Accession Nr: AF119318	↓		
Accession Nr: AF119319	↓		

Anmerkung: Bei einer aktuellen Durchsicht (Sept. 2000) der damals „neuen Fragmente“ zeigte sich, dass für einige der damals von uns erstmals ansequenzierten cDNAs mittlerweile Vollängen-Klone und teils Information über die Funktion der betreffenden Gene vorliegt. Dies entspricht auch den Erwartungen, wenn man die nahezu komplette Sequenzierung des menschlichen Genoms und Transkriptoms in Betracht zieht (siehe Abschnitt 4.7.2.1 der Diskussion).

Der Nachweis, welche der klonierten RAP-PCR Amplikons denn nun tatsächlich progressionsabhängig reguliert waren, wurde im Sinne Reverser Northern dot Blots durchgeführt. Hierzu wurden wie unter Punkt 2.3.3.3. dieser Arbeit beschrieben alle Kandidaten-cDNAs auf einem Array zusammengefasst und analog zu den Hybridisierungsprotokollen, die für die R.Z.P.D.-Filter oben beschrieben wurden, hybridisiert. Als Probe diente radioaktiv markierte cDNA respektive RNA aus den mittels RAP-PCR untersuchten Melanomlinien. Die Signalintensitäten wurden paarweise verglichen, jeweils Parental- versus Tochterlinie.

Die Regulation und damit die potentielle Wertigkeit, als Progressionsmarker in melanozytären Tumoren zu dienen, konnte so für 8 der insgesamt 46 Sequenzen (17%), die aus der Klonierung der 24 Kandidatenbanden erhalten wurden, auf diese Weise bestätigt werden. Dies waren das DPC4 Gen, der Replikations Faktor C-1, Zyklophilin, drei verschiedene cDNA-Klone (AF119318, H61923, AF119298) und zwei bislang unbekannte EST's (Klon 32A und Klon 34E). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Differentiell exprimierte Transkripte, die mittels RAP-PCR dargestellt und im Reversen Northern bestätigt wurden

Nr.	Identität der cDNA	GenBank accession Nr.	Verhältnis der Signalstärken Varianten/Parental
Tumorigenität: WM35			WM35-P-2N1/WM35
1	unbekannter cDNA-Klon	AF119318	4.0
2	Deletion target in <u>pancreatic</u> <u>carcinoma</u> (DPC4)-Gen	U44378	2.6
3	unbekannter cDNA-Klon	H61923	<0.3
4	unbekannter cDNA-Klon	AF119298	<0.3
5	unbekannter EST-Klon 32A	-	<0.3
Invasion: Mel-Im			HI/Mel-Im
-	-	-	-
Metastasierungspotenz: A375			A375-SM/A375
6	Replikationsfaktor C-1	NM_002913	25.0
7	unbekannter EST-Klon 34E	-	2.4
8	Zyklophilin	M60457	<0.3

3.2. SMART-RAP: Möglichkeiten des „Differential Displays“ aus Nanomengen von RNA

Die Untersuchung differentieller Genexpression mithilfe des RNA Fingerprints oder der cDNA-Array-Technik setzt, wie aus dem Absatz über Gewebeanalysen hervorgeht, gewisse Mengen an qualitativ einwandfreier RNA voraus. So werden z.B. für jede RAP-PCR Reaktion mehrere hundert Nanogramm RNA benötigt. Doch gerade bei der Präparation von RNA aus Geweben z.B. humaner melanozytärer Tumoren können oft nur sehr limitierte Mengen an RNA gewonnen werden.

Um das Problem des Verbrauchs „unwiederbringlicher“ RNA-Ressourcen für die Expressionsanalyse weniger hunderter Amplikons zu umgehen, wurde ein Protokoll erarbeitet, bei dem man mittels der SMART Amplifikationstechnik (siehe Abschnitt 2.4.1.) generierte *ds*-cDNA als „Template“ für eine arbiträr „geprimte“ PCR (AP-PCR) einsetzt. Auf diese Weise sollte es möglich sein, mit ng-Proben aus einigen Hunderten von Zellen, z.B. aus einzelnen Melanozytennestern, einige µg *ds*-cDNA zu amplifizieren und damit in RNA-Fingerprint-Experimenten vergleichend Nävus versus Melanom zu analysieren oder intratumoralen Unterschiede in der Genexpression (z.B. apikale Anteile versus Invasionsfront) zu studieren. Damit wäre der Weg zu einer molekularen Diagnostik anhand von Mikroproben frei.

Die SMART-AP PCR, die wir etablierten, lieferte überraschend konstante Fingerprints über einen weiten Bereich von in die PCR eingesetzten SMART-cDNA-Templatekonzentrationen (10 – 1000 ng/20µl Ansatz) (Abbildung 10). Theoretisch könnte man z.B. mit 2 µg SMART cDNA ausgehend von 200 präparierten Zellen etwa 200 Fingerprints generieren. Da ein durchschnittlicher AP-PCR Fingerprint etwa 100 cDNAs zur Darstellung bringt (Abbildung 5 und 6), könnte man so etwa $200 \times 100 = 20\,000$ cDNA Amplikons im Display darstellen, d.h. das ganze „Transkriptom“ der Tumorzellen vergleichend mit anderen Läsionen bezüglich differentieller Genexpression untersuchen.

Leider erwies sich diese im Ansatz sehr interessante Methode als sehr anfällig gegenüber schwankenden Mengen von RNA Template in dem Reversen Transkriptase-Schritt (Erststrangsynthese) der SMART-Reaktion. Wie die Abbildung 11 deutlich erkennen lässt, führten variierende Ausgangsmengen von RNA zu stark voneinander abweichenden Fingerprints im zweiten Schritt der AP-PCR. Somit war

Abbildung 10: Konstante Fingerprints bei variierenden SMART -cDNA-Konzentrationen (von links nach rechts abfallend titriert bis auf 1:10000 fache Verdünnung der Konzentration der ersten Spur links)

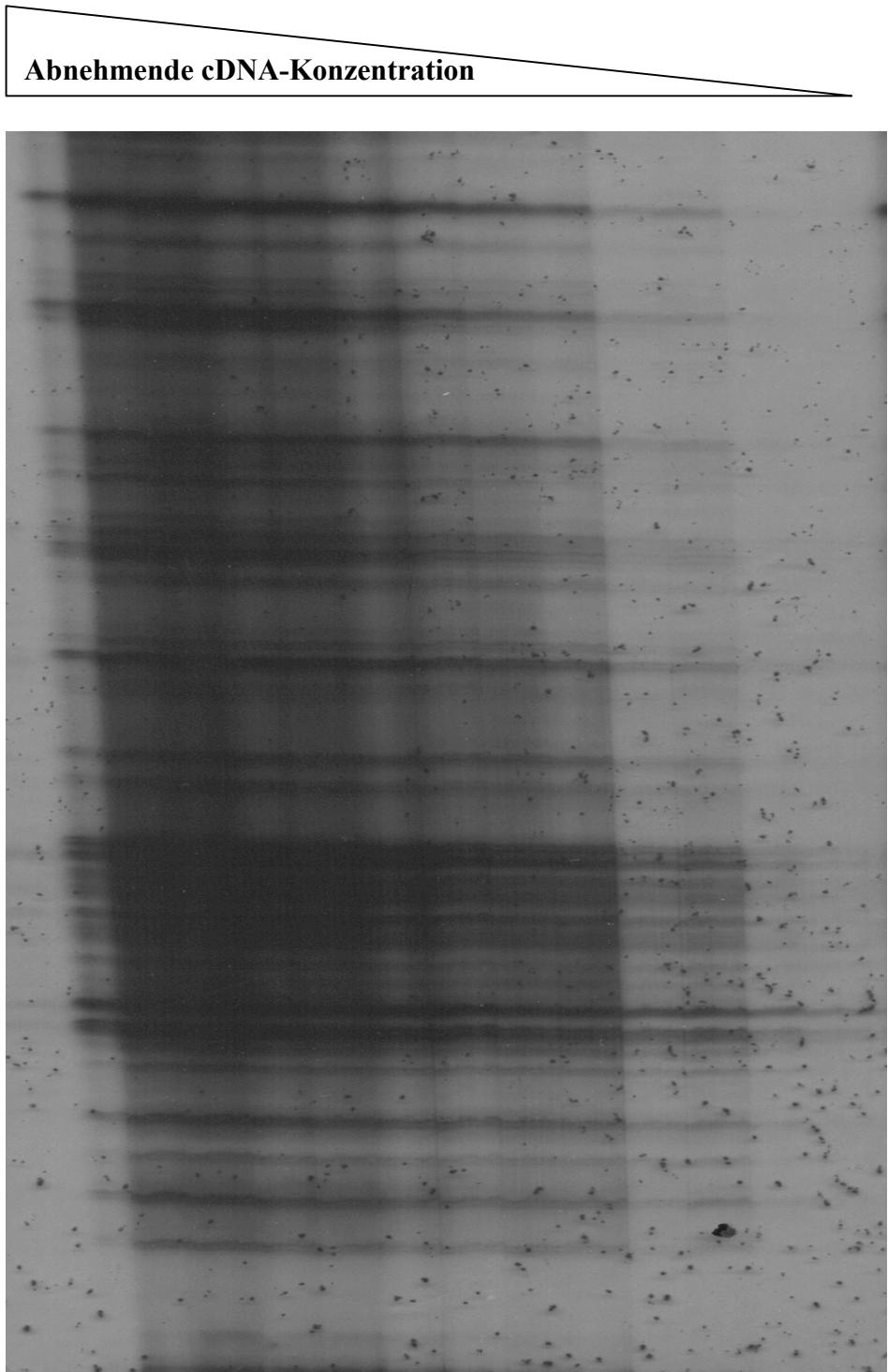
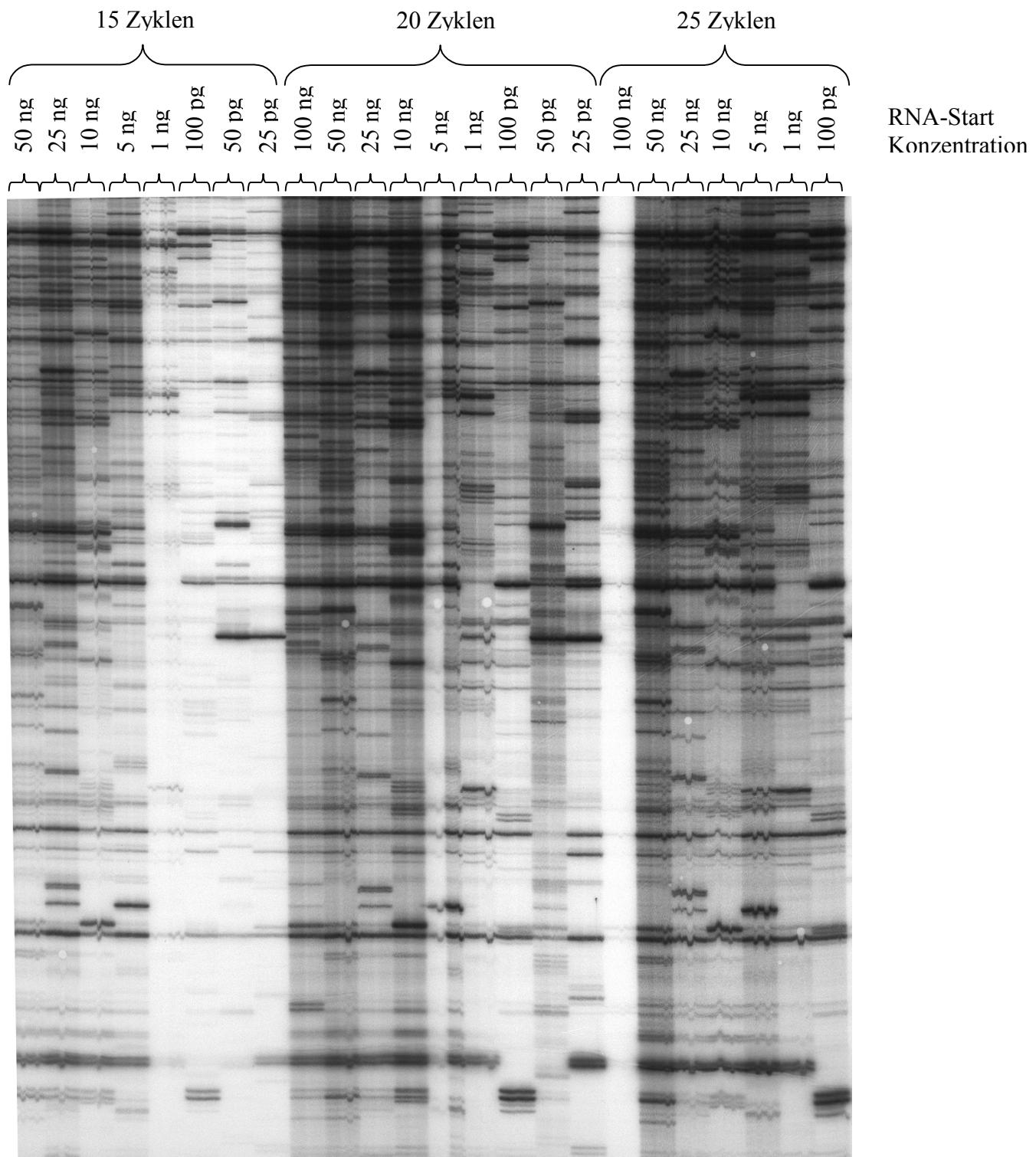


Abbildung 11: Variable Fingerprints bei variierenden Mengen von RNA in der SMART-PCR



differentielle Expression nicht von methodisch bedingter differentieller Amplifikation zu unterscheiden. Die Gründe sind möglicherweise in der komplizierten Kinetik zweier „in Reihe geschalteter“ PCR Schritte und in der Komplexität des als Template dienenden gesamten RNA Pools zu suchen. Da also davon ausgegangen werden muss, dass etwaige Resultate einer kombinierten SMART-AP-PCR zu stark Artefaktbelastet sein werden und einen nutzbringenden Einsatz dieser Methode somit ausschließen, wurde diese theoretisch interessante Strategie nicht weiterverfolgt.

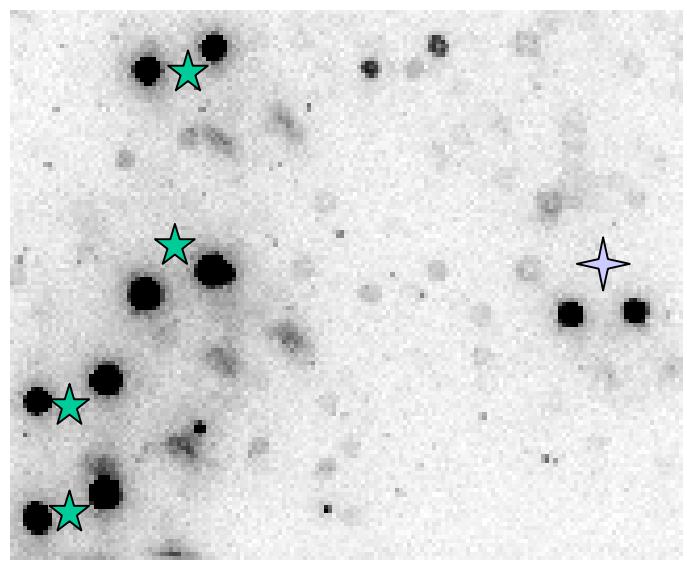
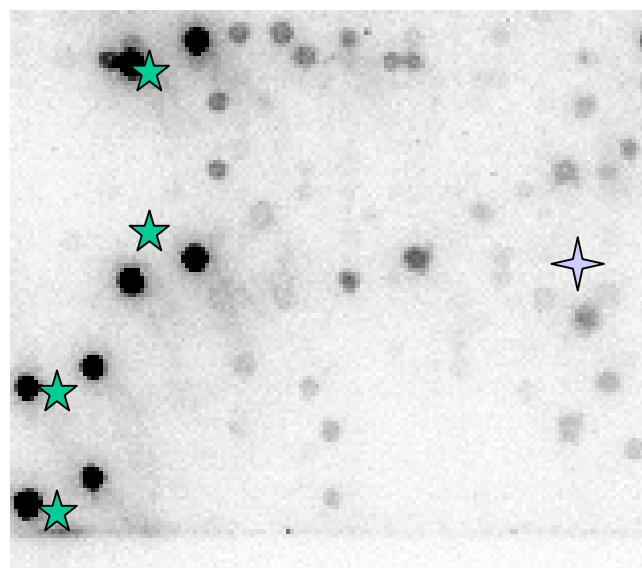
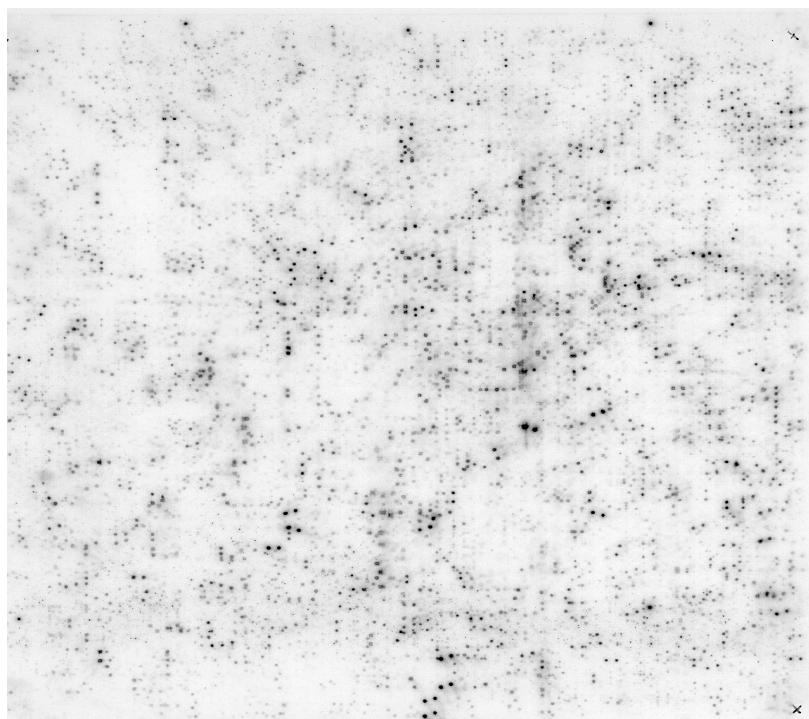
3.3. cDNA-Arrays

3.3.1. Differenzielle Genexpression in melanozytären Tumorzellen unterschiedlicher Dignität

Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit hat die cDNA-Array-Technologie eine bedeutsame Entwicklung erfahren (Lockhart et al., 1996). Wir haben die Möglichkeiten dieser neuen zusätzlichen Technik genutzt, um die RAP-PCR Daten durch eine zweite Technik zu ergänzen und weitere potentielle Progressionsmarker in den erwähnten Modellsystemen zu finden. Konventionell radioaktiv markierte cDNA aus jeweils zwei korrespondierenden Zelllinien der vier Modellsysteme WM1341B, WM35, Mel Im und A375M wurden auf Hochdichteklon cDNA-Arrays des R.Z.P.D. hybridisiert und differentielle Signale ausgewertet (siehe Abschnitt 2.5. der Dissertation). Bei der Auswahl der korrespondierenden Paare wurden dabei die Zelllinien mit der größten phänotypischen Varianz im jeweiligen Progressionsmodell einander gegenübergestellt – entsprechend den vier Modellsystemen waren dies die Zelllinien „20“ / „22“ (WM35), „30“ / „33“ (WM1341B), „SI“ / „HI“ (Mel Im) und „P“ / „SM“.

Von den insgesamt rund 27000 ESTs („expressed sequence tags“) jedes Filters lieferten durchschnittlich etwa zwischen 500 und 700 Spots messbare Signale (Abbildung 12). Die Auswertung der Signalintensitäten ergab, dass bei rund 2% dieser Spots die Signalstärke zwischen den miteinander verglichenen Zelllinien um mindestens das 2,5 fache variierte. Die Abbildung 12 zeigt das Beispiel eines stark regulierten Transkriptes (hellblauer Stern) in der Nachbarschaft von vier nicht regulierten Doppelspots (grüne Sterne). Nicht regulierte Transkripte dienten als interne Kontrolle zur Normalisierung und Korrektur ungleichmäßiger Hybridisierung.

Abbildung 12: RZPD-Filterarray hybridisiert mit komplexer cDNA-Probe



Die Ergebnisse der R.Z.P.D.-Array Hybridisierung bestätigte nicht nur das mittels der RAP-PCR antizierte Ausmaß von expressionsgenetischen Veränderungen in den Modellsystemen, sondern lieferte auch eine große Zahl weiterer potentieller Progressionsmarker. Insgesamt wurden 41 Transkripte identifiziert, deren Signalintensitäten sich mindestens um einen Faktor von 2,5 unterschieden und somit als differentiell exprimiert angesehen werden dürfen (Marshall and Hodgson, 1998). Die weitere Charakterisierung dieser 41 Transkripte erfolgte wie in Abschnitt 2.5.6. beschrieben und lieferte eine ganze Reihe von bekannten Genen (Tabelle 6). Für einige dieser Gene wurde in früheren Arbeiten bereits eine progressionsabhängige Regulation der Genexpression gezeigt. Besonders „vielversprechende“ Kandidaten wurden in Northern Blots als differentiell reguliert bestätigt.

3.3.2. Bestätigung einzelner Kandidatengene

3.3.2.1. Osteonectin/SPARC

SPARC (secreted protein, acidic and rich in cystein), alternativ als Osteonectin oder BM-40 bezeichnet, ist der Prototyp einer Familie von Glykoproteinen, die in zahlreichen verschiedenen Geweben und Zelltypen nachweisbar sind. Die biologische Funktion von Osteonectin besteht in der Lösung der Adhäsion von Zellen, umfasst somit die Reorganisation des Zytoskellets und die Beeinflussung der Zellform (siehe Diskussion). Die Expression von Osteonectin zeigte im Northern Blot einen klaren Bezug zur Melanomprogression (siehe Abbildung 13). Sowohl in der tumorigeneren Tochterlinien „32“ von WM1341B als auch in der stark metastasierenden Variante „SM“ von A375 war die Expression von SPARC deutlich stärker, als in der entsprechenden Parentallinie bzw. in den wenig aggressiven Varianten. Auch im Invasionsmodell zeigte sich ein progressionsrelevanter Anstieg der SPARC Expression in der stark invasiven Variante der primären Melanomlinie Mel Im im Vergleich zur schwach invasiven Linie „SI“.

3.3.2.2. Ubiquitin

Ubiquitin, ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Polypeptid ist ein wesentlicher Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom-Pathways. Über diesen, neben dem lysosomalen Weg, zweiten wichtigen Proteolyseweg eukaryonter Zellen werden

Tabelle 6: Durch Hybridisierung von cDNA-Arrays dargestellte differentiell regulierte Transkripte

Nr.	Identität der cDNAs	GenBank accession Nr.	Signal Ratio spot/spot*	Verhältnis der Signalstärken Variante/Parental
Tumorigenität: WM35 und WM1341B				z.B. WM35-P-2N1/WM35
1	HLA class II histocompatibility Ag, γ Chain	K01144	0,9/1,0	0,2
2	Ubiquitin	M26880	0,9/0,9	4,2
3	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex subunit VI requiring protein	M64241	0,7/1,0	0,3
4	Guanine nucleotide-binding protein β subunit-like protein	P25388	1,1/1,0	0,3
5	Human colon carcinoma laminin-binding protein	J03799	0,9/1,0	0,1
6	Translationally controled tumor protein	P13693	1,1/0,9	0,4
7	Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	NM_002415	0,9/1,0	9,0
8	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase	N44705	1,2/1,0	0,2
9	Kathepsin Z	NM_001336	0,8/1,0	2,5
10	Human mRNA for beta-actin	X00351	0,9/1,1	3,0
11	PMEL 17	AA427967	1,2/0,9	28,5
12	15 kDa Selenoprotein mRNA	AA468026	1,1/1,1	3,4
Invasion: Mel-Im				HI/Mel-Im
13	Poly-(A)-binding protein-like 1	NM_002568	1,0/1,0	10,6
14	Human chorionic gonadotropin gene 5 β subunit	X00265	1,0/0,9	9,4
15	Anonymous cDNA-clone	n.f.	1,1/1,0	12,9
16	Polyadenylate-binding protein	H94769	0,7/0,8	7,5
17	DNA-binding protein TAXREB107	D17554	0,8/0,9	2,8
18	Ribosomal protein L6 (RPL6) mRNA.	NM_000970	0,8/1,0	3,7
19	Vacuolar ATP Synthase subunit B, brain isoform	NM_001693	1,0/1,0	3,4
20	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	NM_001404	1,1/1,0	14,7
21	unbekannter cDNA-Klon	H96657	1,3/1,2	11,7
22	unbekannter cDNA-Klon	N39295	0,9/0,9	0,1
23	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2 (EIF2S3)	NM_001415	1,1/1,1	0,1
24	Homo sapiens hH3.3B gene for histone H3.3	Z48950	0,8/0,9	0,1
25	Homo sapiens lysyl oxidase gene	AF039290	1,0/1,0	0,1
Metastasierungsneigung: A375				z.B. SM/P
26	HSP90	H98876	0,9/0,9	0,1
27	RAB7	H99090	1,1/1,0	0,2
28	Folate receptor 1 (adult)	N56708	1,1/0,9	3,6
29	PTD014	AF092135	1,1/0,8	3,5
30	MEGF9	AB011542	0,7/0,8	4,9
31	Cytochrome b	D49737	0,9/0,9	3,5
32	Tubulin	K00558	1,40/1,1	2,8
33	Phosholipid tranfer protein	NM_006227	0,7/0,9	3,6
34	Lysosomal protective protein	M22960	0,9/1,0	3,5
35	Protective protein for β -galactosidase	NM_000308	1,1/1,0	3,6
36	Protocadherin gamma A10	AF152319	1,2/1,0	3,4
37	CGI-105	AF151863	1,1/0,8	2,6
38	Human G protein Golf α gene	U55184	1,4/1,0	3,1
39	Putative translation initiation factor	AF100737	0,9/1,0	3,3
40	Glia-derived nexin (GDN)	M17783	0,7/0,8	12,8
41	SPARC/Osteonectin/ BM-40	M25746 J02863	1,0/0,9	4,1

* Verhältnis der Signalstärken von Spot 1 zu Spot zwei eines Doppelspots

** Verhältnis der gemittelten Signalstärke eines Spotpaars des Parentalfilters zu der gemittelten Signalstärke eines Spotpaars einer Tochterlinie. Dabei bedeutet ein Wert von 0,1 einer 10-fachen Runterregulierung, der Wert 3,6 entspricht einer 3,6-fachen Hochregulierung

vor allem intrazelluläre Proteine abgebaut. Ubiquitin wird dabei an die zum Abbau bestimmten Proteine, sozusagen als Markierung, angeheftet. Im Northern Blot bestätigten wir eine Überexpression von Ubiquitin in der Zelllinie „33“, einer tumorigeneren Variante der primären Melanomlinie WM35.

3.3.2.3. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)

Die Funktionen des „Macrophage Migration Inhibitory Factors“ sind sehr vielschichtig. Es ist als proinflammatorisches Zytokin bekannt, wird von Makrophagen als Glucocorticoid-induzierter Immunmodulator abgegeben, hat aber auch eine wichtige Funktion bei der Zellproliferation und –Differenzierung. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass MIF die Funktion des Tumorsuppressorgens p53 inhibieren kann (siehe Diskussion).

3.3.2.4. PMEL17

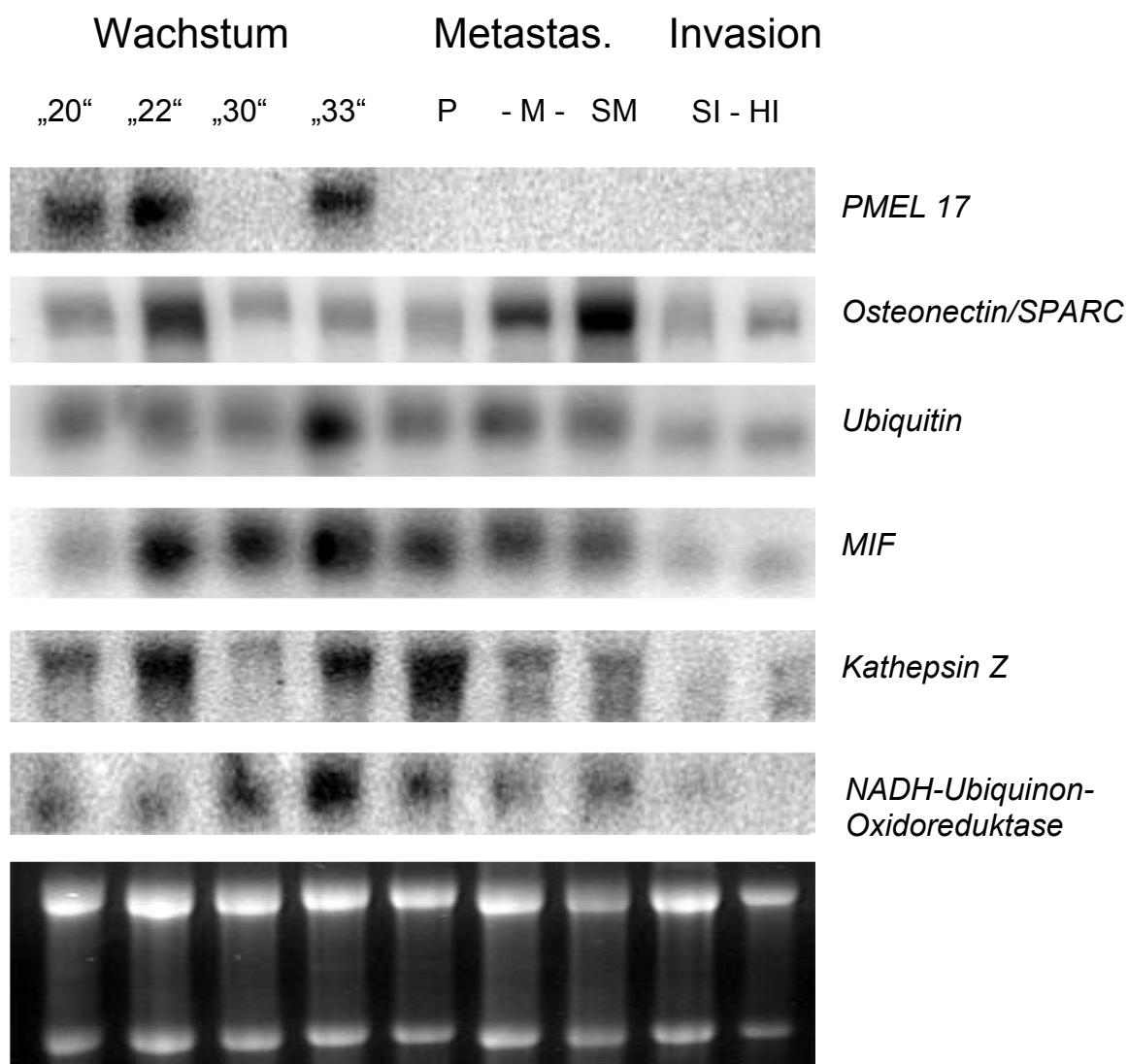
PMEL17, das Sequenzhomologien zum Protein gp100 und zum murinen Silver locus zeigt, wird spezifisch von Melanozyten gebildet und ist in den Melanosomen lokalisiert. Es gehört zu einer Gruppe von Proteinen die neben der Tyrosinase an der Regulation der Melaninsynthese beteiligt sind. Die genaue Funktion von PMEL17 ist jedoch nach wie vor unklar. Die PMEL17 mRNA zeigte in den Array-Experimenten eine deutliche Überexpression in den tumorigeneren Varianten der Melanomlinie WM35 („33“) im Unterschied zur Parentallinie. Dieses Ergebnis wurde im Northern Blot bestätigt. Hier fanden wir zusätzlich eine starke Expression in den Varianten „20“ und „22“. Sowohl in den Zelllinien des Metastasierungsmodells als auch in den von der Parentallinie Mel IM abgeleiteten Zelllinien SI und HI war keine PMEL17 Expression nachweisbar.

3.3.2.5. NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase

Die Nikotinamid Adenin Dinukleotid: Ubiquinon Oxidoreduktase (NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase) ist Teil eines als Komplex 1 bezeichneten Multienzymkomplexes, der in der inneren Mitochondrien-Membran lokalisiert ist. Dieser Komplex ist der Eintrittspunkt von Elektronen in die Elektronentransportkette und katalysiert den

Elektronenübergang von NADH in den Quinonpool (siehe Diskussion). Im Northern Blot zeigte NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase eine Überexpression in der tumorigeneren Tochterzelllinie im Progressionsmodell WM35. Somit bestätigte sich auch hier die anhand der Arrays antizipierte Regulation.

Abbildung 13: Northern Blot Analyse der cDNA-Array Kandidaten



3.3.2.6. Kathepsin Z

Kathepsin Z wurde kürzlich als ein neues Mitglied der Familie der Zystein Proteininasen identifiziert. Kathepsine sind ein wichtiger Bestandteil des lysosomalen Proteolysewegs, wo sie den Abbau oder die Modifikation von Proteinen katalysieren. Auch außerhalb der Zelle sind sie an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt wie z.B. dem Umbau von Binde- und Knochengewebe, der Aktivierung von Prohormonen, u.a. (siehe Diskussion). Im Northern Blot beobachteten wir bei Kathepsin Z eine verstärkte Expression in der Zelllinie „22“ (vermehrtes Tumorwachstum im Vergleich zur Parentallinie) während in den Zelllinien mit zunehmender Metastasierungspotenz die Expression abnahm. Das selbe Phänomen der Überexpression konnte auch im zweiten Modell für Tumorigenität beobachtet werden (vgl. „30“ versus „33“)

4. Diskussion

4.1. Das maligne Melanom der Haut

4.1.1. Klinik und Epidemiologie

Das maligne Melanom entwickelt sich in über 90% der Fälle als ein Primärtumor der Haut ausgehend von Melanozyten der basalen Epidermisschichten. Aber auch aus Pigmentzellen der Dermis, der Schleimhäute, der Uvea, der Retina oder dem vestibulären Labyrinth des inneren Ohres können Melanome hervorgehen (Braun-Falco O et al., 1986).

Die epidemiologische Signifikanz dieses Tumors liegt einerseits in der stark zunehmenden Inzidenz, zum anderen in der nach wie vor hohen Mortalitätsrate. Maligne Melanome verursachen den Hauptanteil der hautkrebsassoziierten Mortalität weltweit und knapp 2% der durch Krebs bedingten Todesfälle, wenn alle Altersgruppen betrachtet werden (Volkenandt M et al., 1999). Betrachtet man aber die unter 30-jährigen so führt das Melanom die Statistik der Krebstodesfälle an, gemäß der allgemeinen Entwicklung zu jüngerem Manifestationsalter. Derzeit geht man davon aus, dass sich die Inzidenz alle zehn Jahre verdoppelt. Regional beobachtet man jedoch große Unterschiede. In Regionen der Erde mit hoher UV-Einstrahlung, z.B. bedingt durch die Nähe zum Äquator oder durch eine höhere

Lage, ist die Inzidenz deutlich höher als in sonnenarmen Zonen. In Neu Mexiko (USA) registriert man pro Jahr 25-30 neue Melanomfälle pro 100 000 Einwohner. In Australien sind es sogar 40 Neuerkrankungen pro 100 000 pro Jahr. In Europa ist die Inzidenz mit 10-19/100 000 Fälle dagegen niedriger. Im Tumorzentrum München beispielsweise wurden in den vergangenen Jahren bei den Männern 13,3 Neuerkrankte verzeichnet, bei den Frauen waren es 14,4 neue Fälle, bezogen auf 100 000 Einwohner pro Jahr (Volkenandt M et al., 1999).

Obwohl neue Therapieformen, wie z.B. kombinierte Immuno-Chemotherapien und eine verbesserte Früherkennung beim malignen Melanom in den vergangenen Jahren zu einer Verbesserung der Heilungschancen und damit zu einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit geführt haben, ist die Mortalität aufgrund der steigenden Inzidenz nahezu ungebrochen hoch. Immerhin verstarben 1997 in Deutschland über 2000 Menschen an den Folgen eines malignen Melanoms (Volkenandt M et al., 1999). Statistisch gesehen beträgt die beobachtete Überlebenswahrscheinlichkeit nach 10 Jahren gemittelt für alle Melanompatienten 70%. Hierbei muss man jedoch bedenken, dass die Überlebenschance sehr stark von der Tumordicke abhängt. Demnach haben Patienten mit einem dünnen Melanom in der Regel eine günstigere Prognose als Patienten mit größerer Tumordicke. Laut Statistik liegt die 10-Jahres-Überlebenschance bei Patienten mit einer Tumordicke bis 1,5 mm – dies sind über 70% aller diagnostizierten Melanome – bei bis zu 97% und damit rein statistisch im Bereich des Normalkollektivs. Andererseits sterben 60% der Patienten mit einer Tumordicke größer als 4 mm innerhalb von zehn Jahren. Diese Zahlen unterstreichen, dass die Diagnose des Primärtumors in einem möglichst frühen Stadium nach wie vor die wichtigste Voraussetzung für eine günstige Prognose dieser Erkrankung darstellt (Volkenandt M et al., 1999).

Trotz großer Fortschritte der molekularen Onkologie fehlen für das maligne Melanom aber molekulargenetische Daten, die a) eine präzise Abgrenzung benigner, dysplastischer und maligner Neoplasien gegeneinander erlauben, b) eine den zunehmenden Anforderungen moderner Tumortherapie gerechtwerdende, präzise prognostische Einordnung ermöglichen und c) Kandidatengene für mögliche zukünftige “gene targeting” - Therapien bereitstellen. Die Verbesserung der diagnostisch-prognostischen Möglichkeiten, insbesondere durch Etablierung

verlässlicher molekulargenetischer Marker, bildet deshalb einen Schwerpunkt innerhalb der Melanomforschung und ist auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

4.1.2. Diagnostik und Prognostik des malignen Melanoms

Auch zu Beginn des 21. Jahrhunderts stützt sich sowohl die Diagnostik als auch die Prognostik beim malignen Melanom auf klinische und histologische Merkmale. Ende der sechziger Jahre wurden von Clark und Mitarbeitern Kriterien zur Unterscheidung verschiedener Subtypen des malignen Melanoms definiert (Clark WH, Jr. et al., 1969). Als die vier Haupttypen des Melanoms gelten demnach das superfiziell-spreitende Melanom (SSM, Häufigkeit ca. 60%), das noduläre maligne Melanom (NMM, Häufigkeit ca. 20%), das Lentigo-maligna-Melanom (LMM, Häufigkeit ca. 10%) und das akrolentiginöse Melanom (ALM, Häufigkeit bei Kaukasiern 5%). Die restlichen 5% umfassen einige seltene Varianten des malignen Melanoms.

In seiner klassischen Arbeit von 1984 postulierte Wallace Clark, dass die Progression des malignen Melanoms schrittweise erfolgt (Clark WH, Jr. et al., 1984). Daraus leitete er ab, dass die Gesamtheit der melanozytären Läsionen histomorphologisch in distinkte Untergruppen zerfällt, die sich im Sinne einer Progression von klar benigne hin zu klar maligne ordnen lassen:

Clark unterschied 1) den gemeinen, erworbenen melanozytären Nävus, 2) den melanozytären Nävus mit lentiginöser Hyperplasie, d.h. aberranter Differenzierung, 3) den melanozytären Nävus mit aberranter Differenzierung und Atypie der Zellkerne, d.h. melanozytärer Dysplasie, 4) das radial wachsende primäre Melanom, nicht invasiv, kurabel, 5) das vertikal wachsende invasive Melanom mit der Gefahr der Metastasierung und 6) das metastasierende Melanom. Diese rein auf histo- und zytomorphologischen Aspekten aufbauende Klassifikation stellt bis heute das zentrale Denkschema in der Melanomforschung dar, obwohl inzwischen klar geworden ist, dass sich nur die Minderheit aller Melanome aus gemeinen Nävi heraus entwickelt (Stolz W et al., 1996).

Schon klinisch kommt bei der Beurteilung einer Hautläsion durch den Dermatologen der Unterscheidung zwischen benignen melanozytären Nävi und dem malignen Melanom sowie etwa 40 weiteren Differentialdiagnosen teils pigmentierter Hautläsionen in der Praxis eine enorme Bedeutung zu.

Hierbei werden Merkmale wie Asymmetrie, Begrenzung, Farbe, Durchmesser und Erhabenheit zur Beurteilung eines melanozytären Tumors herangezogen (Nachbar F et al., 1994; Rigel DS und Friedman RJ, 1993). Anhand dieser in der sogenannten ABCDE-Regel zusammengefassten Kriterien kann ein erfahrener Dermatologe bis zu 80% der Läsionen schon am klinischen Erscheinungsbild erkennen. Doch trotz weiterer Verbesserungen, wie der Einführung der Auflichtmikroskopie, gibt es Grenzfälle zwischen primären malignen Melanomen und melanozytären Nävi, die klinisch nicht zweifelsfrei unterschieden werden können. Suspekte melanozytäre Läsionen werden deshalb sicherheitshalber exzidert – soweit dies kosmetisch vertretbar ist, in kosmetisch relevanten Körperregionen ist dies oft eine sehr schwierige Entscheidung - und anhand histologischer Merkmale analysiert.

Doch nicht selten ist auch eine histologische Differentialdiagnose sehr schwierig, da verlässliche und objektive Kriterien schwer zu definieren sind. Größere Studien zu diesem Thema weisen sowohl auf eine große Heterogenität der verwendeten Kriterien hin, als auch auf eine sehr kontroverse Diskussion der einzelnen Kriterien. So ist beispielsweise der Befund der “zytologischen Atypie” ein häufig angeführtes Kriterium. Es wurde aber bisher nie exakt definiert, welche Aspekte von zellulärer oder nukleärer Morphologie genau hier einfließen sollen. Die histologischen Befunde zwischen einzelnen Zentren zeigen daher in nur etwa 70% der Fälle Übereinstimmung. Objektive molekulare Marker fehlen für die Differenzialdiagnose bis zum heutigen Tag (Stolz et al., 1994)

Auch bei der Einschätzung der individuellen Prognose eines malignen Melanoms ist die histologische Beurteilung nach wie vor das wichtigste Instrument. Eine Vielzahl histopathologischer Charakteristika, die mit der Prognose des Patienten korrelieren sollen, wurden vorgeschlagen. Beispielsweise wurde versucht, die Mitoserate in den Tumorzellen als prognostisches Kriterium zu verwenden. Clark definierte die Clark-Level I-V basierend auf die Invasionstiefe der Tumorzellen, was nicht sehr reliabel ist, da die Dicke der Haut stark variiert und im Gesicht ein Level IV Tumor am Rücken möglicherweise gerade Level III erreicht.

Die Messung der Tumordicke in mm (Breslow-Index) ergab bisher konsistent die besten Korrelationen mit dem klinischen Verlauf und wird daher überwiegend als Richtschnur zur Beurteilung des Metastasierungsrisikos herangezogen (Stolz et al.,

1994). Bei Patienten mit sehr dicken Melanomen (> 4mm) verliert dieser Parameter aber seine Signifikanz. Erfahrungsgemäß bleiben etwa 25% der "Hochrisikopatienten" mit Melanomen von mehr als 4 mm Dicke für mindestens 5 Jahre metastasenfrei; auf der anderen Seite zeigen dünne Melanome mit durchschnittlich niedrigem Risiko gelegentlich metastasierende und unerwartet tödliche klinische Verläufe. Die relative Unvorhersehbarkeit des prospektiven klinischen Verlaufs ist nicht nur sehr belastend für den Betroffenen, sondern erschwert auch die Entscheidung über den Einsatz adjuvanter Therapien, wie z.B. mit hochdosiertem α -Interferon, da diese Therapie ersten teuer und zweitens nicht frei von Risiken und Nebenwirkungen ist. Während der Behandlung mit Interferon gab es bereits vereinzelt tödliche Zwischenfälle, z.B. durch medikamentös induzierte Rhabdomyolyse (Anderlini P et al., 1995; Reinhold U et al., 1997). Außerdem treten neben Leber- und Knochenmarkschäden nicht selten schwere Depressionen mit möglicher Suizidalität auf (Schafer M et al., 1999). Im Regensburger Patientengut ist ein Patient nach Interferontherapie nahezu erblindet (Lohmann CP et al., 1999).

Molekulares Profiling, d.h. die Charakterisierung eines bestimmten Phänotyps anhand eines spezifischen molekularen Genexpressionsmusters könnte einerseits eine bessere Abgrenzung von benignen gegenüber malignen Formen melanozytärer Hauttumoren ermöglichen. Andererseits würde es die Differenzierung von malignen Tumoren unterschiedlicher Aggressivität und damit die prospektive Einschätzung des klinischen Verlaufes einer Tumorerkrankung erleichtern. Eine entsprechende Abstimmung des Nachsorgeregimes an die tatsächlichen Erfordernisse der Erkrankung würde angesichts leerer öffentlicher Kassen und explodierender Kosten im Gesundheitswesen willkommene Einsparungen ermöglichen. Nach konventionellen Kriterien würde ein Melanom-Patienten mit einer Tumordicke von 3 mm als Hochrisiko-Fall eingestuft und dementsprechend einer adjuvanten Therapie zugeführt werden. Wäre jedoch aufgrund des molekulargenetischen Profils ein weniger progressiver Verlauf zu erwarten, könnte vielleicht auf eine adjuvante Therapie zunächst verzichtet werden und man sich auf die Beobachtung des Verlaufs der Erkrankung in der Nachsorge beschränken. Dadurch ließe sich eine unnötige Beunruhigung des Patienten vermeiden und die aufgrund der hohen psychischen und physischen Belastung stark eingeschränkte Lebensqualität nach Erstdiagnose verbessern. Andererseits könnten einer vorbeugenden adjuvanten

Therapie bevorzugt jene Patienten zugeführt werden, die hinsichtlich der molekularen Daten als Risikofall einzustufen sind.

Selbst bei Patienten mit einem metastasierenden Melanom von mehr als 4 mm Dicke gibt es durchaus heterogene Verläufe. Die Überlebenszeit reicht von einigen Monaten bis zu mehreren Jahren (Stolz et al., 1994). Zudem gibt es bisher keinerlei Standards, an denen sich die "Sekundärprognose" und Therapiewahl bei metastasierten Patienten orientieren könnte. Anhand des molekularen Profils könnten dagegen im Vorfeld schon Aussagen getroffen werden, welche Therapien möglicherweise erfolgversprechend eingesetzt werden können und welche nicht. Beispielsweise gibt es moderne Therapieansätze, die sich gegen die Neo-Angiogenese des Tumors richten. Durch Substanzen wie z.B. den COX II-Inhibitor Rofecoxib soll die Transkription von angiogenesefördernden Genen gehemmt werden. Diesbezüglich läuft an der Universität Regensburg derzeit eine Phase II-Studie. Bei Melanomen beruht die Wirkung möglicherweise auf einer Antagonisierung nicht von COX II sondern von PPAR delta (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). (Vogt et al, submitted). Doch dieser Therapieansatz ist möglicherweise nicht bei allen Patienten erfolgreich, insbesondere Tumoren mit Überhöhter PPAR delta Expression. So ist PPAR delta möglicherweise ein in naher Zukunft relevanter molekularer Surrogatmarker, der die Rekrutierung von Patienten in diese Second-line Therapie bestimmt (laufende Untersuchungen).

4.1.3. Grundlegendes zur Progression auf molekularer Ebene

Als Wallace Clark 1984 (Clark WH, Jr. et al., 1984) für die Entwicklung des malignen Melanoms vom benignen melanozytären Návus hin zum malignen metastasierenden Tumor eine Klassifizierung vorschlug, anhand derer er die Gesamtheit der melanozytären Läsionen in distinkte Untergruppen unterteilte, stützte er sich auf rein histo- und zytomorphologischen Aspekte. Dieses zentrale Paradigma der stufenweisen Entstehung und Progression des malignen Melanoms fand in der Vergangenheit neue Bestätigung durch molekulargenetische Daten auf verschiedenen Ebenen der Analyse:

DNA-Ebene: Im Rahmen der Progression kommt es zur schrittweisen Akkumulierung multipler genetischer Defekte (Cowan J and Francke U, 1991). Die gesteigerte Mutabilität erfasst das Genom als ganzes im Sinne zunehmender struktureller und numerischer Chromosomenaberrationen. Dabei ist die Art der Defekte keineswegs zufällig, das heißt es gibt bevorzugte Chromosomen, die beim Melanom mutiert sind. Nach ihrer relativen Häufigkeit geordnet sind chromosomal Defekte im Bereich 1p36, 1p22-q21, 6p11-q21, 7q32-34, 9p21, 11q23-qter, 10q11 und 10q24-25 besonders häufig beobachtet worden (Albino A et al., 1992). Die Zahl der Defekte insgesamt verhält sich progressiv, die Auswirkungen und Wertigkeit der einzelnen Defekte sind wenig bekannt.

Ein Defekt, der unter Umständen besonders früh auftreten kann und insbesondere für Fälle familiärer Melanomsuszeptibilität wegbereitend ist, ist eine Deletion im Bereich Chromosom 9p21. Cannon-Albright hatte 1992 durch "loss of heterozygosity"-Studien und familiäre "Linkage"-Analysen in einigen Familien den Bereich des für die familiäre Melanomsuszeptibilität verantwortlichen Genes auf Chromosom 9p bestimmt und bis auf etwa 2Mbp eingeengt (Cannon-Albright LA et al., 1992). 1994 lokализierten Kamb und Mitarbeiter in diesem Bereich das p16^{INK4}-Gen (Kamb et al., Nat Genet, 1994). Mittlerweile sind weitere Gene der p16 Familie bekannt geworden (p15, p18, p19), die alle als klassische Tumorsuppressorgene gelten im Sinne der Knudson-Hypothese (Bogenrieder T et al., 1998). Ihre physiologische Funktion liegt in der Hemmung von zyklinabhängigen Kinasen, die ihrerseits an dem G₁/S-Restriktionspunkt des Zellzyklus eine wachstumsfördernde Funktion haben. p16 bindet CDK4 und CDK6 und inhibiert deren Interaktion mit dem CDK-stimulierenden Zyklin D. Auf diese Weise wird der Zellzyklus gehemmt. Ein Ausfall von p16 bewirkt somit zunächst gesteigerte Zellteilungsraten. Gruis fand 1995 bei 13 von 15 holländischen Melanomfamilien eine 19bp-Deletion des p16-Gens, was die Annahme einer zentralen Bedeutung dieses Gens bei der Verhinderung von Melanomwachstum zu unterstreichen schien (Gruis NA et al., 1995). Zwei natürliche, in Holland offenbar durch Heiraten innerhalb solcher Familien zustandegekommene menschliche "p16-knockouts" zeigten aber entgegen der Erwartung (entsprechend Knudsons "two hit"-Hypothese) keine von ihren übrigen Geschwistern abweichende verfrühte oder gehäufte Inzidenz von malignen Tumoren im Allgemeinen und von Melanomen im Speziellen. Unter Umständen ist also eine Deletion eines Allels bereits ausreichend, um den Melanomphänotyp zu entwickeln (Haploinsuffizienz).

Allerdings konnte MacGeoch in Großbritannien bei sechs untersuchten Melanomfamilien keine p16-Mutationen finden (MacGeoch C et al., 1994). Neuere Studien an noch größeren Zusammenstellungen von Melanomfamilien ermittelten p16-Mutationen oder Deletionen in etwa 50% (Soufir N et al., 1998). Die Wertigkeit von p16 Defekten bei sporadischen Melanomen ist aufgrund der Vielzahl verschiedener Techniken, die zur Untersuchung an sehr heterogenen Fallsammlungen eingesetzt wurden, nicht abschließend möglich. Reed zeigte 1995 in einer immunhistologischen Arbeit, dass 100% der Melanome vom invasiven oder metastatischen Phänotyp im Gegensatz zu melanozytären Nävi und *in situ* Melanomen einen p16-Expressionsverlust aufweisen (Reed J et al., 1995). Wang und Becker wollten sogar einen Verlust der p16-Expression schon in Melanozyten und melanozytären Nävi beobachtet haben (Wang Y and Becker D, 1996). In Melanomzelllinien wurde das alternative oder auch gemeinsame Vorkommen von p16-Mutationen (selten, um 5%, oft CT Transitionen), homozygoten Deletion (häufiger, bis 20%), p16-Methylierungen (Walker GJ et al., 1998), aber auch beispielsweise Genamplifikationen des CDK4-Gens (Maelandsmo G et al., 1996) oder auch CDK4-Mutationen, welche die Bindung von p16 an CDK4 verhindern, beschrieben (Ohta M et al., 1994).

Die Existenz anderer alternativer Initialveränderungen, die ebenfalls die G₁/S-Restriktion stören ist Gegenstand aktueller Forschung. Denkbar ist die Mutation oder die gestörte Expression von Proteinen beispielsweise "downstream" von p53/p21 oder die alterierte Expression von Proteinen, die direkt an pRB binden können und dessen Funktion modulieren. Die Wertigkeit anderer chromosomaler Hotspots z.B. von Rearrangements im Bereich Chromosom 1p36 mit dem PITSLRE-Locus ist nicht hinlänglich verstanden. Letzterer umfasst eine etwa 90kb große Region von drei Tandemrepeats eines Gens, von dem 10 verschiedene Splicevarianten bekannt sind. Die hier kodierten p58-Kinasen beeinflussen ebenfalls den Zellzyklus; etwa 50% der Melanomzelllinien weisen Deletionen in diesem Bereich auf (Nelson MA et al., 1996). Auch die Bedeutung der häufigen Verluste von Teilen des Chromosoms 6, 10 und 11 oder der Amplifikationen des Chromosoms 7 sind nur wenig erhellt worden (Albino A et al., 1992).

RNA/Protein-Ebene: Auf der Basis dieser genomischen Mutabilität kommt es zu hochkomplexen Störungen der Expression vieler Proteine, die teilweise ihrerseits im Sinne eines "Masterswitches" ganze Banken anderer Gene in ihrer Expression

beeinflussen. Die Gene mit "Masterswitchcharakter" kommen nach gängigen Konzepten z.B. aus der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen, der Transkriptionsfaktoren und der Wachstumsfaktoren. Ein relativ frühes und charakteristisches Zeichen der Transformation im melanozytären System ist ein autokrin stimuliertes Wachstum, d.h. Melanomzellen sind in Kultur wachstumsfaktorunabhängig, während Melanozyten der steten Zufuhr von Wachstumsfaktoren bedürfen. Der "basic fibroblast growth factor", bFGF, wurde in dieser Hinsicht als besonders bedeutsam herausgestellt (Albino A et al., 1991; Becker D et al., 1992). In Melanomen etabliert sich eine autokrine Schleife mit der gleichzeitigen Produktion von bFGF und dem entsprechenden Rezeptor. Antisense Oligonukleotide gegen bFGF supprimieren das Melanomwachstum und die Fähigkeit von Melanomzellen in Softagar Kolonien zu formieren (Becker D et al., 1992). bFGF wird außerdem, wie auch die gesteigerte Produktion von PDGF, als wichtiger Faktor in der tumorabhängigen Induktion der Neoangiogenese diskutiert (Rodeck U et al., 1991).

Neben diesem Wechsel von der parakrinen Wachstumskontrolle zur autokrinen Stimulation vollziehen sich unter dem Selektionsdruck durch den Angriff des Immunsystems des Tumorpatienten wesentliche immunologische Veränderungen, die unter dem Begriff des "immuno-escapes" zusammengefasst werden können. Teilweise beruht dies auf der Fähigkeit der Tumorzellen immunmodulierende Zytokine zu produzieren. Gesteigerte Produktion von IL8 und IL10 sind häufige Befunde. Beide Zytokine schwächen die immunologische Antwort des "Wirts". Das Ausmaß der IL8-Produktion korreliert daher gut mit der Wahrscheinlichkeit einen metastasierenden Verlauf zu erleiden (Singh R et al., 1995) und etwa 50% der Melanompatienten mit Metastasen haben erhöhte IL8-Serumwerte, die mit dem Tumor- "load" korrelieren (Scheibenbogen C et al., 1995). IL8 inhibiert die Expression von MHC Klasse I und II Molekülen auf Makrophagen gefolgt von der Suppression von verschiedenen T-Zellfunktionen. IL10 inhibiert die IL2 Produktion von Lymphozyten und hemmt auf diesem Wege neben der Proliferation von T-Zellen auch die Aktivität von Makrophagen und NK-Zellen (Becker JC et al., 1994). Eine weitere Determinante der immunologischen Auseinandersetzung des Tumors mit der Abwehr ist die Produktion von TGF β , vor allem der Isoformen 2 und 3, in späteren Progressionsstadien (Rodeck U et al., 1991). Gleichzeitig scheint der Primärtumor refraktär zu werden bezüglich der wachstumshemmenden Wirkung von TGF β ,

während die wachstums- und funktionshemmende Wirkung auf T- Lymphozyten erhalten bleibt (de Martin R et al., 1987). Die morphologisch oft zu beobachtende teilweise Regression eines Melanoms zeigt das prinzipielle Ansprechen vieler Melanome auf TILs (tumor infiltrating leucocytes) und gleichzeitig aber auch die sich entwickelnde Resistenz gegen die Aktivität der spezifischen Immunabwehr.

Der Übergang von der radiären Wachstumsorientierung zu invasiven und damit potentiell metastasierenden Phänotypen ist auch koinzident mit der vermehrten Expression von Proteasen, die eine gerichtete Proteolyse des an sich sehr rigiden Bindegewebslagers der Haut erlauben. Konsistente Daten liegen vor zur Überexpression von u- und t-Plasminogenaktivator, Heparinasen sowie Gelatinase beziehungsweise Typ IV-Kollagenase, deren Expression in einigen Studien auch gut mit der Häufigkeit des Auftretens von Metastasen korrelierte (Goldberg G et al., 1990; Houde M et al., 1993; Ray J and Stetler-Stevenson W, 1995). Der Verlust von Apoptose-vermittelnden Rezeptoren seitens der Tumorzellen bei gleichzeitiger Überproduktion des FAS-Liganden ist eine weitere wesentliche Facette der molekularen Melanomprogression (Hahne M et al., 1996).

Invasive Phänotypen zeigen außerdem gegenüber den nicht-invasiven Veränderungen in den Zelloberflächenmolekülen, die insbesondere für die Interaktion mit anderen zellulären Partnern und extrazellulärer Matrix verantwortlich sind. Bereits seit den Arbeiten von Shimoyama (Shimoyama Y et al., 1989) und Takeichi (Takeichi M, 1991) ist bekannt, dass in epithelialen Tumoren eine Minderexpression oder Mutation von E-Cadherin beim Übergang in invasive Phänotypen beobachtet werden kann. M. Herlyn hat in jüngster Zeit auch für das maligne Melanom einen "shift" von der Expression von E-Cadherin (maßgeblich für die Interaktion mit Keratinozyten) zu N-Cadherin (maßgeblich für die Interaktion mit Fibroblasten) zeigen können (Hsu MY et al., 1996). Die erwähnten Cadherine gehören zur Familie der zelloberflächenständigen CAMs ("cellular adhesion molecules") zusammen mit beispielsweise ICAM, VCAM oder dem der C-CAM-Familie zugeordneten MUC18. Auch diese Vertreter der interzellulären Kontaktmoleküle zeigen progressionsabhängige differentielle Expression in malignen Melanomen. Die Expression von MUC18 korreliert dabei positiv mit der prognostisch aussagekräftigen absoluten Tumordicke des Melanoms (Johnson J et al., 1989; Johnson J et al., 1993). Ähnliches gilt auch für ICAM 1 (Denton KJ et al., 1992), während VCAM in der

Progression herunterreguliert wird (van Duinen CM et al., 1994). ICAM 1 wird dabei offensichtlich auch sezerniert und blockiert das auf Leukozyten befindliche LFA1, ein Integrin, das wichtig ist für die Etablierung zytolytischer Konjugate im Rahmen der immunologischen Tumorabwehr (Becker JC et al., 1991). Eine Reihe der eben erwähnten Integrine wird seitens der Melanome im Rahmen der Tumorprogression ebenfalls dereguliert exprimiert. In vertikal wachsenden, invasiven Melanomen wird insbesondere das Integrin $\alpha v\beta 3$ hochreguliert, welches die zelluläre Adhäsion an Bestandteile der extrazellulären Matrix beeinflusst, insbesondere die Bindung an Laminin, Fibronectin und Kollagen (Danen EH et al., 1994). Auch das Überleben von Melanomzellen in der Kollagenmatrix wird dadurch verbessert (Montgomery AM et al., 1994).

Diese zelloberflächenständigen Moleküle sind auch wesentliche molekulare Determinanten der Fernmetastasierung. Neben der membranalen Expression von diversen Integrinen wird hier auch eine funktionelle Bedeutung der CD44 Hyaluronsäure diskutiert, welche möglicherweise an der Bindung der Tumorzellen an die subendotheliale Matrix beteiligt ist (Faassen A et al., 1993). Eine akzeptierte Tatsache ist weiterhin, dass Tumorzellen zur erfolgreichen Metastasierung auch zeitgerechtes "Detachment" von extrazellulärer Matrix induzieren können. Ein wesentlicher Kandidat für die Induktion von "Detachment" ist MIA (fälschlicherweise "melanoma inhibiting activity" genannt), dessen Auftreten im Blutserum außerdem als klinischer Marker für die Progression des malignen Melanoms in Erprobung ist (Bosserhoff AK et al., 1997).

Vogt und Mitarbeiter haben durch auf "RNA-arbitrarily primed PCR" (RAP-PCR) basierende Experimente zeigen können, dass maligne Melanome in nahezu 100% eine Überexpression des Liganden EphrinB2 aufweisen mit progressionsabhängiger Zunahme (Vogt T et al., 1998). Diese zelloberflächenständigen Liganden aktivieren Eph-verwandte Rezeptortyrosinkinasen (Eph-RTKs), die ihrerseits ebenfalls auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden. Sie bilden mit bisher 14 Vertretern die größte bekannte Gruppe von zelloberflächenständigen RTKs bei Vertebraten. Die Besonderheit liegt darin, dass der Kontakt der Liganden und Rezeptoren nach einigen Minuten zu einer Vermeidung von Nachbarzellen im Sinne einer Repulsion führt, wodurch eine Abgrenzung von Geweben und eine gerichtete Wanderung von Zellen in Zielkompartimente vermittelt wird (Orioli D and Klein R, 1997). Derzeit gibt

es nur Spekulationen darüber, welche Vorteile einer Tumorzelle durch fehlerhafte Überexpression dieser Zelloberflächenrezeptoren und -liganden erwachsen? Möglicherweise werden sämtliche Interaktionen der Tumorzellen mit anderen zellulären Targets (benachbarte Tumorzellen, Zellen in der Umgebung des Primärtumors, immunologisch aktive Zellen, Endothelien, Stroma- und Parenchymzellen in Zielgeweben der Metastasierung) beeinflusst.

Potentiell ist die differentielle Expression derartiger komplexer Chemoaffinitätssysteme der Schlüssel für das Verständnis der organselektiven Metastasierung, also der Tatsache dass bestimmte biologische Varianten derselben Tumorentität, z.B. des Melanoms, bei einem Patienten primär Hirnmetastasen verursachen und bei einem anderen primär nur in der Haut und subkutan Metastasen hervorrufen. Der britische Chirurg Stephen Paget hat bereits 1889 in "Lancet" seine Beobachtungen beschrieben, die darauf hindeuten, dass Metastasierung nicht zufällig stattfindet, sondern einer spezifischen Interaktion von Tumorzellen und Zellen des Zielorgans bedarf. Die molekulare Basis für dieses "seed and soil" Prinzip, wie es Ewing 1928 formulierte, ist bis heute rätselhaft. Radiomarkierte Melanomzellen erreichen in Nagern nach i.v. Injektion viele Organe, aber nur in bestimmten Organen kommt es zur erfolgreichen Induktion von Filiae (Hart IR and Fidler IJ, 1980). Netland hat B16-Mausmelanomzellen in vitro selektieren können mit differenter organspezifischer Adhärenz (Netland PA and Zetter BR, 1984). Auch die Experimente von Fidler haben die Heterogenität der Metastasen des Melanoms bezüglich ihrer organselektiven Manifestation eindrucksvoll belegt (Poste G and Fidler IJ, 1980). Melanomzelllinien, die von Hirnparenchymmetastasen gezogen wurden, erzeugten intraaortal injiziert immer wieder Hirnparenchymmetastasen und keine anderen, während Linien, die von meningealen Metastasen angelegt worden waren bei intraaortaler Injektion stets erneut meningeale Manifestationen erzeugten (Schackert G et al., 1990).

Diese wenigen Beispiele sind sicher nur ein Bruchteil aller möglicherweise progressionsrelevanten Veränderungen in der Genexpression in Melanomen. Aus der umfangreichen Literatur über expressionsgenetische Phänomene im Rahmen der Progression des malignen Melanoms, circa 980 Originalarbeiten in den letzten 10 Jahren, kompilierten wir über 100 in Melanomen differentiell regulierte Gene: Adenosin Deaminase, B2m, BAGE, BAX, bcl-2, bFGF (möglicherweise), brn-2/N-

Oct3, c-jun, c-fos, jun-B, c-k-ras, c-kit, c-met, c-myc, c-ski, c-src-1, Calcyclin, Calmodulin, Cathepsin B,D, Cyclin A,B,D, CDK4, E-Cadherin, ECK, Endothelin-1 Rezeptor, EWS-ATF-1, FGF-Rezeptor-1, Sialyltransferase Familie, GM-CSF, gro/MGSA, H/K/N ras, H-2Db/H-2Kb, HER2/neu, HOX Gene, FGF Familie, hst, ICAM1, IGF-1, IL1,2,6,8,10, IL4-Rezeptor, Integrine z.B. $\alpha V\beta 3$, Interferon System, MHC Klasse II, Ki67, Kollagenase (Gelatinase A/B, Metalloproteininasen), rap1-Krev1, Laminin, ephrine z.B. B2, LRP, M-CSF, MAGE1/ 2, MCAF, MCP-1, mda-6 (p21), mda-7, MDR-1, Me14-D12, ME20, ME491, Mel-18, Melan-A, Metallothionein, MIA, Mitochondriale Gene, MnSOD, MRP, MSH-R, p15, p53, MUC18/MCAM, MYB, MZ2-E,F, n-myc, NF-1, nma, nmb, NME (nm23-1/2), NSE, Ornithindecaboxylase, p-Glycoproteine, p16INK4 (CDKN2/MTS1), p97, PAIs, PCNA, PDGF, PKC isoformen, pp125FAK, pRB, Ribosomale Gene, S100, TAL1, TCL5, Tenascin, TGF α ,TGF β 1,2,3, TGF β II Rezeptor, Thrombospondin, Thymosin β 10, TIMP-1, TNF α , tPA, Transglutaminase-TT, Tropomyosin 3, uPA-Rezeptoren, VEGF-R, Vinculin, Vitronectin-Rezeptor, VLA-1,2,4,5, WT1 u.a.

Das Verständnis des Zusammenspiels vieler expressionsgenetischer Variablen ist allerdings rudimentär. Daraus leitete sich die Idee ab, mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie simultan die Expression aller dieser erwähnten Gene auf Transkriptionsebene zu erfassen und daraus die diagnostisch und prognostisch relevante Information zu filtern.

Eigene Daten aus dieser und anderer Arbeiten legen zudem nahe, dass die eben skizzierten Veränderungen im Expressionsprofil von malignen Melanomen noch weit komplexer sind als bisher bekannt ist. Allein in den angesprochenen Progressionsmodellen haben wir etwa 55 weitere Kandidaten, die eine progressions-assoziierte differentielle Expression zeigen mit Hilfe des RNA-Fingerprintings und durch den Einsatz der cDNA-Array-Technik identifiziert. Die gezielte weitere Strukturierung mittels eigener cDNA-Arrays kann der Schlüssel zur Lösung der zentralen Probleme in der Melanomforschung sein: a) eine molekulare, möglichst präzise Abgrenzung gutartiger biologischer Phänotypen von metastasierfähigen bösartigen und b) eine individuelle Einschätzung der Prognose eines Patienten mit malignem Melanom zur Planung einer sicheren aber nicht überzogenen, somit kostensparenden Nachsorge und gegebenenfalls adjuvanten Therapie.

4.2. Das Paradigma der differentiellen Genexpression

Die differentielle Expression von Genen ist eine biologisch hochrelevante Information. Am Beispiel der Krebsforschung soll hier die Denkweise, die hier zugrunde liegt kurz erläutert werden.

Nach der Entdeckung der transformierenden Wirkung retroviraler Onkogene vermuteten Tumorforscher lange Zeit, dass die Ursache für die Entstehung der meisten Tumoren hauptsächlich in der veränderten Expression einzelner krebsfördernder Gene, sogenannter Onkogene, und krebshemmender Gene, den Tumorsuppressorgenen begründet ist. Deshalb – aber auch aufgrund technischer Limitationen - konzentrierte man sich in der Krebsforschung bislang vorwiegend auf die Suche nach tumorassoziierten Veränderungen im Genom, z.B. Chromosomen-Abnormalien, Mutationen und Deletionen, die eine Änderung der Expression solcher "Krebsgene" zur Folge haben oder die Funktion der von diesen Genen kodierten Proteine modifizieren oder gar inhibieren (Sager R, 1997). Inzwischen wurden mehr als 100 verschiedene Onkogene identifiziert; jedoch wurden nur bei einem kleinen Teil, z.B. bei erbB, erbB2, ras, myc, und Bcl-1 durchgängig Mutationen bei grösseren Subgruppen einzelner humaner Tumorentitäten gefunden. Auf Seiten der Tumorsuppressoren konnte bei bislang 12 Genen ein Zusammenhang zwischen Mutation oder Deletion und Tumorwachstum gezeigt werden. Allerdings sind sämtliche dieser Faktoren in die Zellzykluskontrolle involviert, aber keines dieser Gene ist beispielsweise direkt an der Invasion oder Metastasierung beteiligt, um nur zwei weitere wichtige Aspekte der Tumorprogression zu nennen (Sager R, 1997).

Im vorhergehenden Abschnitt (4.1.3.) dieser Arbeit wurde deutlich, wie vielschichtig die expressionsgenetischen Veränderungen sind, die während der Progression des malignen Melanoms auftreten können, ohne dass dies jeweils auf eine Mutation als Primärereignis zurückzuführen wäre. Sie betreffen eine Vielzahl grundlegender intrazellulärer und interzellulärer Prozesse und Funktionen, z.B. Zellproliferation, DNA Reparatur, Chromosomenstabilität, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, Angiogenese, Apoptose oder Funktionen des Immunsystems, um nur einige herauszugreifen.

Nur für wenige der darin involvierten Gene konnten krebsassoziierte Mutationen nachgewiesen werden, während beim Großteil eine Veränderung der Transkriptionsregulation für die Dysregulation der Genexpression verantwortlich ist. Einige der "klassischen" Krebsogene wie z.B. c-myc, p53 oder WT-1 kodieren z.B. für Transkriptionsfaktoren (Sager R et al., 1994; Yao R and Cooper GM, 1995). Eine durch Mutation veränderte Synthese solcher Faktoren kann der Auslöser sein für die Verschiebung des Expressionsmusters bei multiplen Genen, die von diesen Faktoren reguliert werden. Andere Gene, z.B. erbB2 kodieren für membranständige Rezeptoren. Da die Transkription der meisten Gene durch das Zusammenwirken unterschiedlicher äußerer und innerer Signale, die über ein Netzwerk aus Signalkaskaden weitergegeben werden, beeinflusst wird, ist eine Mutation in einem Glied dieser Kette oft Ausgangspunkt für eine ganze Reihe von expressionsgenetischen Veränderungen.

Diese Dichotomie, dass die Expression eines Gens entweder durch Mutation oder durch Dysregulation der Transkription verändert sein kann, wurde zuerst bei Untersuchungen der Bakteriengenetik beobachtet. Sie bildete die Grundlage für die Untergliederung der Krebsogene in zwei Klassen. Die Klasse I beinhaltet hiernach mutierte Gene, während Klasse II jene Gene repräsentiert, deren Genexpression durch Mutation transkriptionsregulierender Faktoren verändert wird (Sager R, 1989). Klassische retrovirale Onkogene zählen nach diesen Kriterien zur Klasse I, wohingegen der Rezeptor des epidermalen Wachstumfaktors EGFR die Merkmale der Klasse II erfüllt. Einige Gene können je nach Situation sowohl der Klasse I als auch der Klasse II zugerechnet werden. Ein Beispiel hierfür ist das Gen MTS-1 (CDKN2) oder alternativ p16, das bekanntermaßen an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. p16 kann beispielsweise durch Mutation (z.B. bei familiärem Melanom) oder durch Methylierung und folglich Minderexpression in die Tumorigenese involviert sein (Shapiro GI et al., 1995).

Der Begriff des "Krebsgens" bleibt somit nicht mehr nur auf mutierte Gene beschränkt, sondern umfasst fortan alle Gene, die aufgrund abnormal verstärkter oder verminderter Expression zur Ausbildung eines bestimmten "Krebs-Phänotyps" beitragen; also auch solche Gene, die keine Veränderungen auf DNA-Ebene zeigen.

Eine neue Betrachtungsweise des Krebsproblems ist deshalb erforderlich: Statt die Aufmerksamkeit, wie bisher, auf die wenigen auslösenden Mutationen zu fokussieren, rückt die Erfassung von Veränderungen in der Expression vieler nicht mutierter Gene zunehmend in den Blickpunkt der Krebsforschung. Da die Zahl der in ihrer Expression veränderten Gene weit größer ist, als die der initial mutierten, erhöht sich die Chance, molekulare Marker zu finden, die zu einer verbesserten klinischen Diagnostik und Prognostik führen und die Entwicklung von neuen Therapien metastasierender Krebsformen beschleunigen. Die in dieser Arbeit implementierten Techniken der RAP-PCR und der cDNA Arrays, mit der Möglichkeit simultan Hunderte und Tausende von RNAs in ihrer Expression zu untersuchen, sind gleichermaßen vorzügliche Instrumente Genexpressionsstudien an menschlichen Tumoren oder deren Modellen durchzuführen.

4.3. Entwicklung der auf PCR basierenden Verfahren

Die gewaltigen Fortschritte der Biotechnologie haben in den letzten Jahren zu einer großen und weiter stark wachsenden Zahl von Arbeiten (etwa 1000 seit 1980) über Genexpression und molekulare Marker im Rahmen der Melanomprogression und -initiation geführt. Andererseits waren es auch technische Limitationen, die dabei zu einer auf *einzelne* biologische Merkmale von Malignomen fokussierten Betrachtungsweise führten, z.B. einzelne Aberrationen des Karyotyps, die Expression einzelner Gene bzw. mRNAs und einzelne Mutationen in krebsrelevanten Genen (Onko- und Tumorsuppressorgenen) oder deren Promotoren.

Wie bereits eingehend dargelegt wurde, ist die Bandbreite der expressionsgenetischen Dysregulation während der Melanomprogression weitaus größer, als die Zahl der auf genomischer Ebene zu erwartenden oder bis heute nachgewiesenen Veränderungen. Die Erfassung möglichst vieler Faktoren dieser transkriptionellen Dysregulation birgt ein enormes Potential sowohl für diagnostisch-prognostische als auch therapeutische Lösungsansätze beim malignen Melanom und anderen malignen Tumoren. Allerdings gleicht die Entschlüsselung des Zusammenspiels aller molekularen Faktoren, die an der Melanomentstehung und -ausbreitung beteiligt sind aufgrund der Komplexität einem riesigen Puzzle. Dies macht die Entwicklung entsprechend leistungsfähiger und zuverlässiger Verfahren, Genexpression zu studieren, notwendig.

Im Prinzip lassen sich expressionsgenetische Veränderungen auf verschiedenen Ebenen der Proteinbiosynthese nachweisen, auf der Ebene der Transkription oder anhand der gebildeten Proteine. Auf Proteinebene kann dieser Nachweis beispielsweise durch massenspektrometrische Identifizierung nach zweidimensionaler Auftrennung im Proteingel erfolgen (Boucherie H et al., 1995; Mann M, 1999). Hierbei wird jedoch nur ein kleiner Teil der zellulären Proteine erfasst. Außerdem ist das weitere "Handling" wie die Isolierung aus dem Gel und die weitere Identifizierung dieser Proteine schwierig.

Am praktikabelsten ist derzeit der direkte Nachweis auf RNA-Ebene. Hier stehen inzwischen zahlreiche unterschiedliche Techniken zur Erfassung und Quantifizierung differentieller Genexpression in Krebszellen zur Verfügung: z.B. der Northern Blot (Alwine JC et al., 1977), der S1 nuclease protection assay (Berk AJ and Sharp PA, 1977), oder das "Differential Screening", bei dem zu vergleichende radioaktiv markierte cDNA Proben gewissermaßen voneinander durch Hybridisierung subtrahiert werden und die verbleibenden cDNAs einem Pool möglicherweise differentiell exprimierter Gene entspricht. Allerdings bietet keine dieser Techniken ausreichende Sensitivität um auch seltene mRNA-Spezies nachweisen zu können. Hieraus ergibt sich ein weiteres Problem. Zur Durchführung dieser Methoden werden relativ große Mengen an RNA benötigt. In vielen Fällen, z.B. bei der Präparation von wenigen hundert Melanozyten aus melanozytären Nävi können oftmals nur wenige Nanogramm RNA gewonnen werden; zu wenig um damit beispielsweise einen Northern Blot durchführen zu können.

Eine Verbesserung dieser Problematik trat mit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion und der hierdurch eröffneten Möglichkeit, DNA und später auch RNA/cDNA zu amplifizieren ein.

Saiki und Mitarbeiter nutzten 1985 erstmals die Möglichkeiten der PCR in Verbindung mit der Fähigkeit der Reversen Transkriptasen, RNA in einzelsträngige cDNA zu kopieren, zur Amplifikation spezifischer mRNA Sequenzen. Diese neue, als RT-PCR bezeichnete Methode konnte nicht nur zum Nachweis niedrig-abundanter mRNA Spezies eingesetzt werden, sondern erlaubte auch die (semi-)quantitative Analyse einer spezifischen mRNA in verschiedener RNA-Proben – entsprechende Kontrollen vorausgesetzt.

Die Untersuchung komplexer expressionsgenetischer Veränderungen im Zuge der Tumorprogression erfordert jedoch die simultane Erfassung der Quantitätsunterschiede einer möglichst großen Zahl an mRNAs. Dies ist mithilfe der auf die Analyse einzelner mRNA Spezies ausgerichteten RT-PCR nicht möglich. Deshalb wurden neue, auf den Prinzipien der RT-PCR beruhende Techniken etabliert, die die Darstellung vieler, differentiell exprimierter "Messages" ermöglichen.

Gemeinsames Merkmal dieser unter dem Begriff "multiple arbitrary amplicon profiling" (MAAP) zusammengefassten Methoden ist die Verwendung von einem oder mehreren arbiträren Primern bei niedrig stringenten PCR-Bedingungen, sodass die Synthese eines PCR-Produktes auch dann beginnen kann, wenn die Bindung des Primers an das Template nicht optimal ist. Zwei Verfahren, die nach diesem Prinzip arbeiten sind die "random amplified polymorphic DNA" (RAPD) Analyse, bei der die PCR-Produkte im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel aufgetrennt werden (Williams JG et al., 1990) und die "arbitrarily primed PCR" (AP-PCR), die Polyacrylamidgele zur Auf trennung der PCR Fragmente verwendet (Welsh J und McClelland M, 1990). Beide Techniken wurden ursprünglich zur Erzeugung von DNA-Fingerprints entwickelt und zunächst bei Genkartierungen, bei phylogenetischen Studien und in der Populationsbiologie zum Nachweis von Polymorphismen herangezogen (Dinesh KR et al., 1993; Keis S et al., 1995). Bei einer Reihe von Organismen konnten so taxonomische Marker definiert werden. Beispielsweise wurde *Borrelia burgdorferi* in verschiedene Subspezies untergliedert (Lebech AM et al., 1994) und bei Patienten mit zystischer Fibrose konnten genetisch verschiedene Varianten von *Pseudomonas cepacia* unterschieden werden (Bingen EH et al., 1993).

Inzwischen findet die AP-PCR in zunehmendem Masse in der Krebsforschung Anwendung. Mithilfe arbiträr geprimter DNA-Fingerprints können genomische Unregelmäßigkeiten wie Deletions- oder Insertionsmutationen im Rahmen eines genomweiten Screenings nachgewiesen werden (Peinado MA et al., 1992).

Ausgehend von den DNA Techniken wurden schließlich zwei Verfahren zur arbiträr geprimten Amplifikation von RNA durch P. Liang bzw. J. Welsh/M. McClelland und Mitarbeiter etabliert. Bei der einen als Differential Display (DD) bezeichneten Methode wird nur ein arbiträrer Primer – für die PCR Reaktion – eingesetzt, während

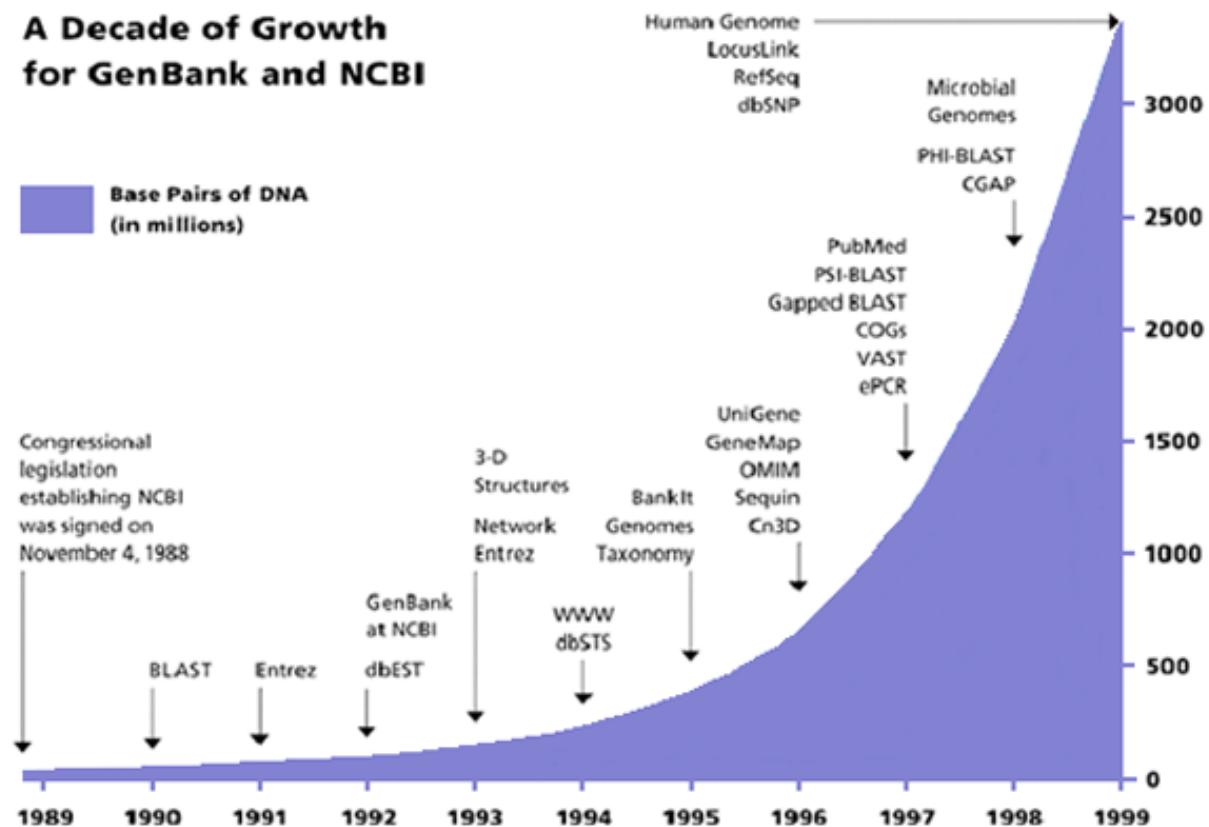
die Erststrangsynthese mit einem Oligo(dT)-Primer gestartet wird. Bei der zweiten Variante, der RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) – die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam – werden sowohl für die RT-Reaktion als auch für die Zweitstrangsynthese arbiträre Primer favorisiert. Die technischen Details sowie Vor- und Nachteile der beiden Techniken werden an anderer Stelle dieser Dissertation ausführlich erörtert.

4.4. Revolutionäre Möglichkeiten der Arraytechnik

In den letzten Jahren hat die in Genbanken gespeicherte Sequenzinformation eine enorme Zunahme erfahren. Sieht man sich die Entwicklung der Datenbestände der Genbanken an (siehe Abbildung 14: NCBI GenBank), so hat sich in der vergangenen Dekade die Zahl der bekannten Sequenzen von wenigen Millionen Basenpaaren auf über 3 Milliarden Basenpaare erhöht. Bei mehr als 30 Organismen wurde das komplette Genom inzwischen sequenziert, bei 100 weiteren hat man mit der Sequenzierung begonnen oder steht kurz vor dem Abschluss (Lockhart DJ und Winzeler EA, 2000). Das menschliche Genom soll in wesentlichen Teilen vollständig sequenziert sein. Dies erfolgte durch große weltweit und insbesondere in den USA staatlich geförderte Projekte und durch Wissenschaftler, die neue Sequenzinformation zur Datenbank beitragen. Entsprechend gibt es nationale Ressourcenzentren, die über die Klonbanken verfügen und für Wissenschaftler und Firmen die Möglichkeit bergen, von dieser Information und den Klonlibraries Gebrauch zu machen.

Allerdings reicht die bloße Kenntnis der Sequenzabfolge nicht aus, um zu verstehen, wie Zellen funktionieren und sich zu komplexen Organismen zusammenfügen, wie Krankheiten entstehen und was man gegen diesen Prozess tun kann. Mithilfe funktioneller Studien müssen nun die Rohdaten „mit Leben erfüllt werden“. Das Ziel bleibt nicht die bloße Auflistung aller Gene und deren Funktion, sondern das Verständnis des Zusammenspiels aller Komponenten, die an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind und beispielsweise zur Progression eines melanozytären Nävus zum malignen Melanom beitragen.

Abbildung 14: Zunahme der Sequenzinformation in den letzten zehn Jahren



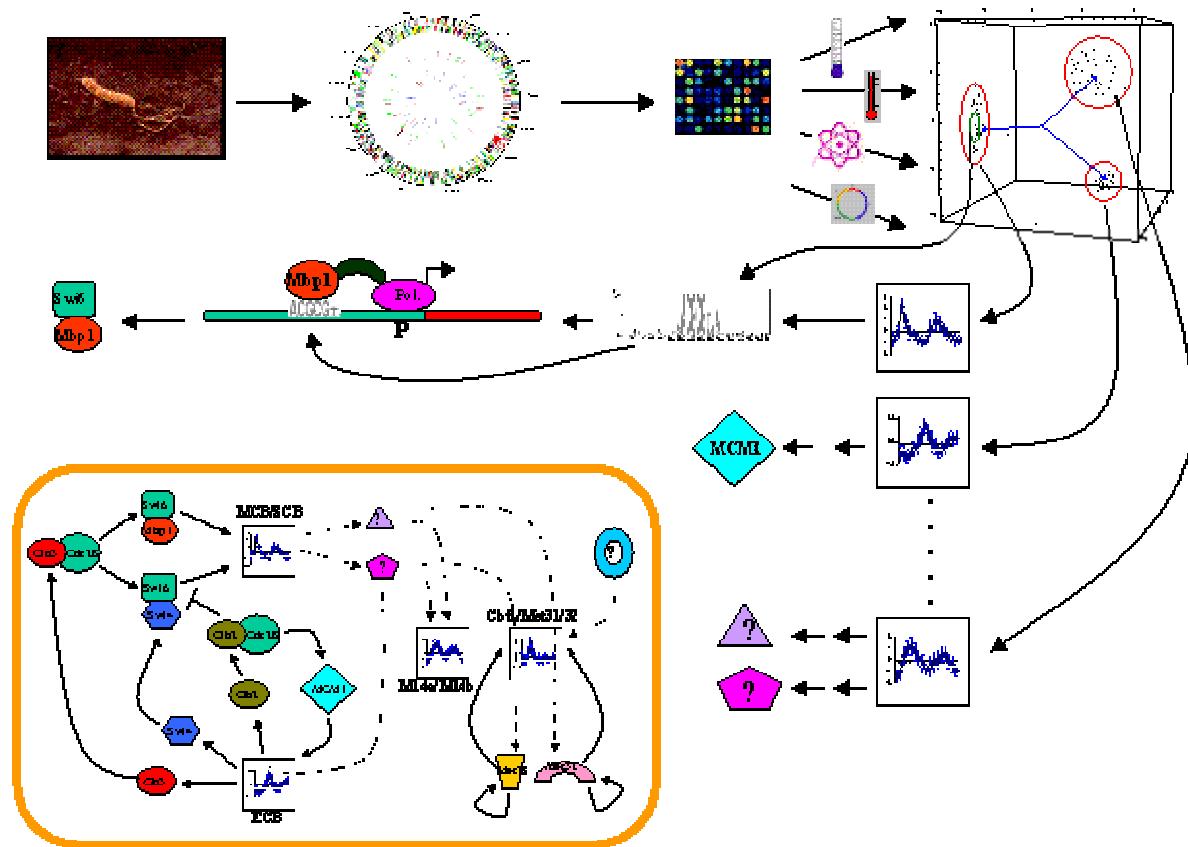
Um diese komplexe Aufgabe bewältigen zu können, sind neue innovative Verfahren erforderlich. Unter den jüngst etablierten Methoden besitzt die Array-Technik mit das größte Potential, gerade wenn es um die simultane Erfassung der Genexpression einer großen Zahl von Genen geht. Das Prinzip dieser Technik basiert auf der spezifischen Hybridisierung von markierter, in Lösung vorliegender RNA oder DNA an DNA-Moleküle, die an vorbestimmter Position auf Trägermaterialien fixiert sind (siehe Abschnitt 2.5.3, Abbildung 4). Solche mit Nukleinsäuren beladenen Arrays werden eigentlich schon seit Jahren in der molekularbiologischen Forschung verwendet (Hanawalt PC, 1994; Hirano S et al., 1992). Bislang wurden DNA-Fragmente, die aus cDNA, genomischer DNA oder Plasmid-Bibliotheken hergestellt wurden, vorwiegend auf Nylon- oder Nitrozellulosemembranen aufgebracht und mit radioaktiv markierten Proben hybridisiert. Aus technischen Gründen blieb die Anzahl der auf dem Array zusammengefassten cDNAs meist auf einige Dutzend beschränkt. Daher konzentrierte man sich auf ausgewählte Gene, von denen man vermutete,

dass sie in Hinblick auf die Fragestellung oder Hypothese, die durch das Array-Experiment untersucht werden sollte, eine Schlüsselposition einnehmen könnten. Das Potential der Array-Technologie wurde dabei aber bei weitem nicht ausgereizt. Die technische Entwicklung ermöglicht heute die Herstellung von winzigen "Array-chips", wobei Tausende von cDNAs oder Oligonukleotide in hoher Dichte auf Glasplättchen aufgebracht und Hybridisierungen komplementärer Nukleinsäuren mithilfe von fluoreszenzmarkierten Proben detektiert werden (Lipshutz RJ et al., 1999). Hiermit können komplexe Expressionsprofile unter verschiedensten Gesichtspunkten untersucht werden, ohne sich im Vorfeld Gedanken machen zu müssen, welche Gene transkriptionelle Veränderungen erfahren und somit in der Studie am ehesten berücksichtigt werden sollten. Hierbei werden oft unerwartete Ergebnisse zu Tage gefördert. Beispielsweise zeigte sich bei einer Studie, die in einem Set von 40000 Genen expressionsgenetische Veränderungen während des normalen Zellzyklus in humanen Zellen untersuchen sollte, dass neben – erwartungsgemäß – jenen Genen, die für die Initiation der DNA Replikation, der Chromosomensegregation und die Zellzykluskontrolle kodieren, in bestimmten Phasen auch eine ganze Reihe von Genen hochreguliert werden, die am Aufbau des Zellskelets, an interzellulären Adhäsionsvorgängen, an der Zellwanderung und an der Apoptose beteiligt sind (Cho et al., unveröffentlichte Daten).

Das enorme Wachstum der Datenfülle an Sequenzinformationen und die Entwicklung von neuen Methoden wie der Array-Technologie, die diese Informationen ausbeuten können, haben zu einem Umdenken in der biologischen und biomedizinischen Forschung geführt und rücken derzeit das Paradigma der differentiellen Genexpression (siehe Abschnitt 4.2.) in Kombination mit moderner Informationstechnologie und Bioinformatik in den Mittelpunkt der Betrachtungsweise. Ausgehend von cDNA-Arrays, die die gesamte bekannte Sequenzinformation eines Organismus abdecken können – manche bezeichnen diesen Prozess als "Download the genome on a chip", wird versucht anhand des Expressionsmusters einer Vielzahl von Genen Rückschlüsse auf die Funktion der von diesen Genen codierten Proteine zu ziehen. Anhand der Daten aus vielen verschiedenen expressionsgenetischen Studien werden Gene mit gleichsinnigem Expressionsmuster in Gruppen, sogenannten Clustern, zusammengefasst (Alon U et al., 1999). Hierzu wurden inzwischen verschiedene statistische Algorithmen entwickelt und softwaretechnisch umgesetzt. Das Ergebnis solcher Berechnungen wird zur besseren Anschaulichkeit

oft graphisch dargestellt. Gencluster erscheinen dabei z.B. als Punktwolken im dreidimensionalen, Euklidischen Raum (siehe Abbildung 15).

Abbildung 15: die Array-Technologie ebnet den Weg von der Sequenzanalyse zur funktionellen Genomik



Die grundlegende Idee besteht nun darin, dass Gene mit gleichem oder ähnlichem Expressionsverhalten, z.B. Hoch- oder Herunterregulation unter bestimmten Einflüssen oder zellbiologischen Bedingungen, auch ähnliche biologische Funktionen erfüllen oder mit jenen Prozessen funktionell verknüpft sind. In dieser Arbeit hofft man beispielsweise mit derlei Techniken Marker zu definieren für Melanomdiagnostik und Prognostik, gleichzeitig aber neue Ansätze zum funktionellen Verständnis der Melanomprogression zu entwickeln, was in anschließenden methodisch vertiefenden Projekten untersucht werden könnte. Die Abbildung 15 (zu finden auf der

Internetseite http://arep.med.harvard.edu/network_discovery) veranschaulicht den experimentellen Weg ausgehend von der Sequenzierung eines Organismus über die Expressionstudien und funktionelle Genomik hin zur Proteomik, also der Analyse der Protein-Proteininteraktionen.

4.5. Wahl des geeigneten Untersuchungsmaterials

4.5.1. Verwendung von Patientengewebe

Seit einigen Jahren wird an der dermatologischen Klinik der Universität Regensburg von Hautexzidaten melanozytärer Tumoren eine Gewebeprobe bei minus 80 Grad eingelagert. Deshalb konnte für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf eine Gewebebank mit mittlerweile mehr als 2000 Kryopräparaten zurückgegriffen werden. Insofern lag der Gedanke nahe, expressionsgenetische Veränderungen während der Melanomprogression an Patientenmaterial, also sozusagen *in vivo* zu studieren.

Allerdings traten bei der praktischen Durchführung einige Schwierigkeiten auf. Wie unter Material und Methoden beschrieben, wurden melanozytäre Tumorzellen teilweise direkt aus dem gefrorenen Gewebestück, teilweise aus Gefrierschnitten, die zuvor von der Gewebeprobe angefertigt wurden, präpariert. Trotz Einsatz von Stereomikroskop und feinsten Skalpellen konnte vermutlich eine Kontamination der Tumorzellfraktion mit anderen Gewebsanteilen nicht völlig ausgeschlossen werden. Die Gründe hierfür liegen zum einen an einer teilweise sehr limitierten Tumormasse – insbesondere bei melanozytären Nävi finden sich oft nur vereinzelt in die Übergangszone zwischen Dermis und Epidermis eingestreute Melanozytennester. Dieses Problem ließ sich zumindest teilweise umgehen, indem für die Präparation vorwiegend Gewebeproben mit deutlichem Tumoranteil, z.B. Melanommetastasen oder kongenitale Nävi herangezogen wurden. Allerdings musste hierbei eine Verarmung des Spektrums der untersuchten Phänotypen in Kauf genommen werden. Zum anderen muss das Präparat – vor allem Gewebeschnitte – gefärbt werden, um einzelne Strukturen und Zellverbände klar unterscheiden zu können. Die klassische Hämalaun/Eosinfärbung liefert zwar die besten Ergebnisse, verlangt jedoch den Einsatz von lauwarmem Leitungswasser, wodurch die Gefahr der Degradation der RNA durch RNasen massiv erhöht wird. Versuche, das Standardprotokoll der HE-Färbung, z.B. durch die Verwendung von DEPC-behandeltem Wasser zu modifizieren, brachte nur unbefriedigende Resultate.

Letztlich erwies sich eine leicht modifizierte Form der Methylenblaufärbung als brauchbarer Kompromiss. Diese Methode lieferte auch mit DEPC-behandeltem Wasser verwertbare Färbungen.

Leider standen zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente moderne Techniken zur Gewebedissektion wie z.B. die "Laser Capture Microdissection" noch nicht zur Verfügung. Mit dieser Technik konnte Dr. Becker aus unserer Arbeitsgruppe inzwischen einzelne Melanozytenverbände aus Gewebeschnitten präparieren. Allerdings besteht auch hier weiterhin z.B. die Gefahr der RNA-Degradation und entsprechende Anpassungen an Färbe- und Fixierverfahren waren teils enttäuschend (Publikation eingereicht).

Trotz des auf den ersten Blick großen Fundus an gelagerten Gewebestücken konnten letztendlich nur aus einem Set von rund 25 Gewebeproben hinlänglich Tumorzellen präpariert und daraus gesamtzelluläre RNA isoliert werden. Die Resultate der hiermit durchgeführten RAP-PCR werden einerseits belastet durch Maskierungseffekte aufgrund der oben erwähnten Kontamination mit RNA aus Bindegewebe oder Epidermis. Zum anderen leidet die Qualität der RNA-Fingerprints unter Qualitätseinbussen der verwendeten RNA, die durch ausgefallene oder mit verminderter Effizienz erfolgte PCR-Reaktionen sichtbar werden. Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit RNA und Ausschluss möglicher Gefahrenquellen z.B. bei der Präparation der Tumorzellen aus Geweben wurde die Qualität der RNA auch von Faktoren beeinflusst, auf die der Experimentator keinen Einfluss hatte, z.B. Lagerung ungefroren im OP-Saal, beginnende Nekrose des Tumors schon *in vivo* etc..

Ein weiteres Problem neben der Qualität ist wie schon mehrfach erwähnt die stark limitierte Quantität der aus Geweben extrahierbaren RNA. Dies erfordert eine quantitative Expansion der cDNA: In der Literatur finden sich zahlreiche Methoden, RNA effizient und reproduzierbar zu amplifizieren. Vorgeschlagen werden unter anderem auf PCR basierende Verfahren (Dulac C, 1998; Jena PK et al., 1996; Wang AM et al., 1989), aber auch Methoden, die eine lineare Amplifikation von cDNA über *in vitro* Transkription vorsehen (Eberwine J et al., 1992; Guatelli JC et al., 1990; Kwoh DY et al., 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde ein auf dem SMART-Verfahren (Firma Clontech) basierendes Protokoll etabliert und an die speziellen

Bedingungen des Labors angepasst. (Siehe Methodenteil 2.4.2.). Mit diesem Verfahren gelang es bis in den Bereich von 5 ng RNA hinein Untersuchungen anzustellen, nach Synthese ausreichender Mengen von doppelsträngiger cDNA. Diese cDNA öffnet prinzipiell den Weg zu Genexpressionstudien bei äußerst limitiertem Material, wie das in unserem Fall typisch ist. Versuche, diese SMART-cDNA als Template für eine arbiträr geprimte PCR, also gewissermaßen eine SMART-RAP-PCR, einzusetzen und so einem Fingerprinting im Sinne der RAP zuzuführen scheiterten allerdings. Eine mögliche Erklärung ist die Artefaktneigung zweier in Reihe hintereinander durchgeföhrter PCR Schritte: SMART-PCR gefolgt von AP-PCR. Es zeigte sich nämlich, dass die Reproduzierbarkeit der RNA-Fingerprints zwar überraschend unabhängig von der eingesetzten SMART-cDNA-Template-Konzentration ist, nicht jedoch von der Ausgangskonzentration der RNA. 5ng RNA lieferten andere Fingerprints als 50 ng oder 250 ng. Abschließend ist als Ergebnis festzuhalten, dass das SMART-Verfahren in Verbindung mit der AP-PCR, wie es im Rahmen dieser Arbeit erstmals versucht wurde, nur bedingt als Amplifikationsmethode einsetzbar ist, wegen der großen Zahl falsch positiver Resultate durch Variation der Fingerprintmuster (Abbildung 11).

4.5.2. Untersuchung an Zellkulturmodellen

Als Alternative und Ergänzung zu den Untersuchungen an Patientengeweben wurden Studien an in vitro Modellen durchgeführt. Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Zelllinien werden in den Abschnitten 2. und 3. ausführlich beschrieben. Wichtigster Vorteil der Verwendung von Zellkulturen ist die Verfügbarkeit ausreichend großer Mengen von qualitativ einwandfreier RNA. Allerdings muss man sich bei der Interpretation der Ergebnisse darüber im Klaren sein, dass es sich hier um artifizielle Systeme handelt, die die realen Verhältnisse in vivo nur modellhaft wiedergeben können. Die hierbei gewonnenen Daten, z.B. potentielle molekulare Marker für diagnostisch-prognostische und therapeutische Applikationen, müssen daher anschließend in weiteren Untersuchungen an Patientengeweben überprüft und in vertiefenden Experimenten funktionell validiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Auswahl besonders selektierter Zelllinien expressionsgenetische Merkmale a) des Tumorwachstums, b) der Invasion und c) der Metastasierung beleuchtet. Wenngleich hier eine Konzentration auf einzelne

Facetten des Gesamtprozesses erfolgt, wurden doch drei Hauptaspekte der Tumorprogression erfasst.

4.6. Diskussion der Methoden

4.6.1. RNA-arbitrarily primed PCR

Für die Untersuchung differentieller Genexpression wurden wie bereits eingehend erörtert, zahlreiche unterschiedliche Methoden entwickelt. Neben dem "klassischen" Verfahren des Northern Blots haben sich in jüngerer Zeit zwei auf den Grundlagen der RT-PCR basierende Techniken etabliert, die mithilfe von arbiträren Primern RNA- bzw. cDNA-Fingerprints generieren: das "Differential Display" und die RNA arbitrarily primed PCR, kurz RAP-PCR.

Während eines zweijährigen Forschungsaufenthalts am *Sidney Kimmel Cancer Center, La Jolla, USA* hatte Dr. Vogt, der dankenswerterweise die Projektleitung und praktische Betreuung der vorliegenden Arbeit übernommen hat, die Gelegenheit, die Technik der RAP-PCR bei den Entwicklern der Methode, J. Welsh und M. McClelland zu erlernen. Deshalb lag es nahe, die Vorteile der RAP-PCR für die in der vorliegenden Arbeit angestrebte Untersuchung des expressionsgenetischen Profils humaner melanozytärer Tumoren nutzbar zu machen.

Wie bereits mehrfach erwähnt, werden im Gegensatz zu den Protokollen des "Differential Display", die verankerte oligo(dT)-Primer für die Erststrangsynthese favorisieren (Liang P and Pardee A, 1992), in der RAP-PCR für die Erst- und Zweitstrangsynthese arbiträre Primer eingesetzt. Wesentlich ist, dass dabei der Primer in der RT-Reaktion *nicht* am nicht-codierenden Ende der mRNAs bindet, analog zu oligo(dT), sondern mit höherer Wahrscheinlichkeit im Bereich der tatsächlich kodierenden Sequenzen (Ralph D et al., 1993). Dies trägt zur eindeutigen Identifizierung von "Messages" bei, erleichtert die Reamplifizierung von Produkten unter Verwendung derselben Primer unter stringenten Bedingungen und macht die Technik zusätzlich für prokaryontische und mitochondriale RNA anwendbar, die keine Poly(A)-Enden tragen. Die Wahrscheinlichkeit, offene Leserahmen aufzufinden wird erheblich verbessert (McClelland M et al., 1993). Außerdem wird im Falle der Entdeckung neuer kodierender RNA-Sequenzen die Zuordnung zu bekannten Genfamilien durch die Möglichkeit der Übersetzung in konzeptuelle Proteinanaloge häufig erleichtert, da Proteinmotive gegenüber den Nukleinsäuren in der Evolution stärker konserviert sind (Vogt T et al., 1997).

Auch wenn die Bezeichnung "arbiträr" suggeriert, dass die Sequenz des Primers für die Durchführung einer RAP-PCR unwichtig erscheinen mag, so kann man doch durch Beachtung einiger "Regeln" bei der Wahl des Primers das Ergebnis der Reaktion in gewisser Weise beeinflussen. Zunächst ist darauf zu achten, dass der Primer keine komplementären oder palindromischen Sequenzabschnitte enthält, die die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen bei den typischerweise niedrigen Annealingtemperaturen ermöglichen könnte. Die Länge der verwendeten Primer sollte zwischen 10 und 20 Nukleotide betragen (McClelland M et al., 1997). Die Primer, die in den hier vorgestellten RAP-PCR Experimenten zum Einsatz kamen, bestanden aus 10 bzw. 11 Nukleotiden. In Verbindung mit dem Stoffelfragment der Taq-Polymerase eignen sich Primer dieser Länge hervorragend zur Erzeugung komplexer Fingerprints mit Darstellung einer großen Anzahl verschiedener PCR-Amplikons. Die Reproduzierbarkeit der PCR-Fingerprints scheint - zumindest bei arbiträren Primern mit 10 bis 20 Nukleotiden – ausgezeichnet zu sein. Nachteilig ist, dass bei einer zu großen Zahl visualisierter Fragmente die Interpretation des PCR-Fingerprints erschwert wird. Bei der Reduktion der Komplexität durch entsprechende Primerwahl (25mer und mehr) muss man sich jedoch der Auswirkungen des sogenannten Kontexteffektes bewusst sein. Dieser Effekt tritt besonders häufig bei sehr einfachen Fingerprintmustern mit nur wenigen (<10) prominenten PCR-Amplikons auf. Da jeder Fingerprint das sichtbare Ergebnis der Amplifikation untereinander konkurrierender PCR-Produkte ist, ist der Einfluss von einzelnen Produkten auf die Amplifikation der anderen Produkte größer, je weniger (dominante) PCR-Produkte vorhanden sind (McClelland M et al., 1997).

Die Kinetik der typischen RAP-PCR kann wie folgt skizziert werden: Nimmt man an, dass in einer PCR die Erstrangssynthese eines bestimmten Produkts mit der Wahrscheinlichkeit P_1 und die Zweitstrangsynthese mit der Wahrscheinlichkeit P_2 stattfindet, so kann man die exponentielle Zunahme der Produktmenge m mit der Formel:

$$m = P_1 P_2 C X^n$$

beschreiben, wobei C die Startkonzentration an eingesetzten "Template"-Molekülen, X ein Faktor zwischen 1 (keine Amplifikation) und 2 (optimale Amplifikation) und n die Zahl der PCR-Zyklen, in denen die Amplifikation exponentiell verläuft, repräsentiert

(McClelland M et al., 1997). Die Masse eines jeden Amplifikats wird prinzipiell durch die spezifischen Werte dieser Variablen bestimmt. Theoretisch scheint eine Selbstnormalisierung der Produktmassen der konkurrierenden Amplikons im Fingerprint ausgeschlossen zu sein. Experimentelle Daten aus den Arbeitsgruppen von McClelland und Welsh zeigen jedoch, dass vor allem gegen Ende einer PCR-Reaktion bei höheren Zyklenzahlen die Amplifikationsrate von mengenmäßig dominierenden PCR-Produkten durch "self-Annealing" stärker abnimmt, als die Amplifikationsrate von Produkten, die weniger stark vertreten sind (Mathieu-Daude F et al., 1996). Als Folge davon beobachtet man mit steigender Zyklenzahl eine Verringerung bestehender Unterschiede – also eine Normalisierung – der PCR Produktmengen. Das "self-Annealing", die Rehybridisierung von abundanten PCR-Produkten und die damit verbundene Behinderung der Primerbindung könnte eine mögliche Ursache für dieses Phänomen sein. Die Geschwindigkeit mit der die Rehybridisierung zweier DNA-Einzelstränge stattfindet, hängt jedoch von der DNA-Konzentration ab. Deshalb gilt, werden mehrere Produkte gleichzeitig in einem PCR Reaktionsansatz amplifiziert, läuft die Rehybridisierung der DNA-Einzelstränge bei einem Produkt höherer Konzentration schneller ab. Bei einem RNA-Fingerprint, wie ihn beispielsweise die RAP-PCR generiert, bewirkt dieser sogenannte "C₀t-Effekt" also eine Nivellierung der absoluten Unterschiede der Produktmengen, sodass die tatsächlichen Unterschiede der RNA-Konzentrationen in den zu vergleichenden Populationen unterschätzt werden (Mathieu-Daude F et al., 1996; McClelland M et al., 1997; Vogt T et al., 1997). Die Zyklenzahl einer RAP-PCR sollte daher möglichst gering gehalten werden, da vor allem bei höheren Zyklenzahlen der "C₀t-Effekt" die Ergebnisse des Experiments stärker verfälschen kann.

4.6.2. cDNA Array Technologie

Während dieser Arbeit hat die Array-Technologie eine bedeutsame Entwicklung erfahren. Neben zahlreichen kommerziellen Anbietern, die in zunehmendem Maße mit diversen Array-Formaten auf den Markt drängen, wurden auch teilweise mit öffentlichen Mitteln finanzierte, nicht-kommerzielle Einrichtungen wie das Ressourcenzentrum Primärdatenbank im Rahmen des weltweiten "Human Genome" Projekts geschaffen, die neben dem Aufbau und der Pflege von Genbanken auch cDNA-Arrays zu vergleichsweise günstigen Konditionen anbieten. Das enorme

Potential der Array-Technologie, die Expression multipler cDNAs parallel untersuchen zu können und die Möglichkeit, vom RZPD kostengünstige cDNA-Arrays mit Tausenden von ESTs aus einer Melanozyten-cDNA-Bibliothek zu beziehen, veranlasste uns, diese Technologie für die Untersuchung differentieller Genexpression im Rahmen der Melanomprogression zusätzlich zur RAP-PCR zu nutzen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse aus cDNA-Array Experimenten muss man jedoch die konzeptuellen Eigenheiten und Schwächen dieser Methode mit ins Kalkül ziehen. Im Grunde genommen stützt sich das Prinzip der Array-Technologie auf die Hybridisierung von Nukleinsäuren, d.h. Effektivität und Ablauf eines Array-Experiments werden im wesentlichen von der Hybridisierungskinetik der beteiligten Nukleinsäuren bestimmt (Duggan DJ et al., 1999; Southern E et al., 1999). Die Expressionsanalyse mithilfe eines cDNA-Arrays ist technisch gesehen die umgekehrte Form eines Northern Blots. Beim Northern Blot werden verschiedene RNA Proben auf einer Membran fixiert und mit einer radioaktiv markierten cDNA Sonde hybridisiert, die eine spezifische mRNA Spezies in diesen verschiedenen RNA Pools quantitativ nachweisen soll. Bei der cDNA-Array Technik wurde diese Strategie in zweierlei Hinsicht verändert: Auf einer Membran werden viele gen-spezifische cDNA-Sequenzen, die z.B. aus den 3'-Bereichen der RNAs revers transkribiert wurden auf einem Array zusammengefasst. Replikas eines solchen Array werden mit verschiedenen, markierten cDNA Proben hybridisiert, die jeweils zu vergleichende RNA Populationen repräsentieren. Zweifarbig fluoreszenzmarkierte Proben können auch simultan auf ein Array-Exemplar hybridisiert werden, während radioaktiv markierte Proben entweder nacheinander auf denselben Array oder parallel auf zwei identische Array-Exemplare (Replikas) hybridisiert werden. Nachteil bei Verwendung von Replikas ist, dass Unterschiede des „Spottings“, der Beladung der Replikas, als differentielles Signal gewertet werden können (Duggan DJ et al., 1999). Die „radioaktive Variante“ hat den Vorteil hoher Sensitivität und eines über weite Bereiche linearen Signals gegenüber den Fluoreszenzverfahren.

Da das Prinzip der Array-Technologie auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren basiert, wird das Ergebnis und die Qualität eines Array-Experiments maßgeblich von den Hybridisierungskinetiken zwischen den beteiligten Nukleinsäuren bestimmt. cDNA-Arrays werden vorwiegend auf Nitrozellulosemembranen, geladene

Nylonmembranen oder anderen Materialien wie Glas aufgebaut. Die Fixierung der cDNA auf diesen Trägermaterialien geschieht bei Verwendung von Membranen durch "UV cross-linking", bei Glas kommen andere Techniken, die dem Ink-Spot-Drucken angelehnt sind oder photolithographische Techniken in Betracht (Duggan DJ et al., 1999).

Bei Verwendung von Membranen, wie im vorliegenden Fall, ist nur ein Teil der an die Membran gebundenen DNA-Moleküle tatsächlich in einzelsträngiger Form für die Hybridisierung verfügbar (Duggan DJ et al., 1999). Ein Teil der cDNA ist entweder doppelsträngig, mit anderen DNA-Molekülen vernetzt oder weist über die gesamte Länge des DNA-Stranges verteilte multiple Verknüpfungen mit der Membranmatrix auf. (cDNA)-Polynukleotide geben somit wahrscheinlich nicht das beste "Target" für die Hybridisierung von Arrays ab, weshalb man zunehmend Arrays mit kürzeren Oligonukleotiden bestückt, die eine bessere Hybridisierungseffizienz aufweisen. Andererseits haben Oligonukleotide den Nachteil, dass aufgrund der geringeren Basenzahl die Probenspezifität vermindert ist und dass sich Unterschiede im GC-Gehalt einzelner Oligos in größeren Schwankungen in der Schmelz- bzw. "Annealing"-Temperatur bemerkbar machen können.

Ein weiteres Problem der Array-Technologie ist die relativ große Menge an RNA, die für die Probengenerierung aufgebracht werden muss. Je nach verwendeter Detektionsmethode ergeben sich hier große Unterschiede. Werden cDNA Proben, die durch direkten Einbau von fluoreszenzgefärbten Nukleotiden markiert wurden für die Untersuchung von Expressionsprofilen verwendet, sind mindestens 10 µg gesamtzelluläre RNA erforderlich (Duggan DJ et al., 1999). Solche Mengen können meist nur in Zellkultur-Experimenten bereitgestellt werden. Werden hingegen indirekt fluoreszenz- oder radioaktiv markierte Proben verwendet, sind etwas geringere Mengen an RNA notwendig, wie sie z.B. aus klinischen Biopsien und zum Teil auch aus histologischen Präparaten gewonnen werden können.

In den Array-Experimenten der vorliegenden Arbeit lieferte die Verwendung von Nylonarrays und die Markierung der Proben-cDNA mit ^{33}P -dCTP die besten Ergebnisse, da u.a. die Auflösung auch sehr nahe beieinanderliegender Spots ausgezeichnet ist, das Signal linear auf Phosphorimagern einfach auszulesen ist ohne aufwendige Lasermikroskope, wie sie zur Analyse von Arrays bei Verwendung

von Fluoreszenz-gelabelten Proben erforderlich wären. Mit der Sensitivität solche Nylon-cDNA-Arrays hat sich die Arbeitsgruppe um B.R. Jordan in einer ausführlichen Studie befasst (Bertucci F et al., 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass Nylonarrays, wenn sie mit radioaktiven Proben hybridisiert werden – im Gegensatz zu fluoreszenzmarkierten Proben, welche hier ein hohes Hintergrundsignal erzeugen – ein Expressions-“profiling” auch an sehr kleinen Gewebemengen erlauben. Durch Reduzierung des Hybridisierungsvolumen auf z.B. 100 µl bei entsprechender Miniaturisierung des Arrays (z.B. 200 Spots auf 4x5 mm²) reichen etwa 2x10⁵ Moleküle einer RNA Spezies in der Probe, um ein detektierbares Signal zu erzeugen. Das ist etwa 100mal weniger als in *allen* anderen Mikroarray-Systemen inklusive den aufwendigen kommerziellen Systemen, die mit Glaschips arbeiten. Dies hat zur Folge, dass Probenmengen von nur 100 ng – andere Arbeiten sprechen sogar von 50 ng – gesamtzelluläre RNA ausreichen, um einen solchen Array zu beschicken (Duggan DJ et al., 1999). Erklärbar ist dies durch die im Vergleich zu anderen Array-Systemen hohe Menge von “Target”-Molekülen von etwa 20 ng. Bei durchschnittlich 1000 bp Länge einer ds DNA entspricht dies 25x10⁹ Molekülen. Bei Glasarrays sind dagegen nur Bruchteile eines Nanogramms “Target”-DNA verfügbar. Aufgrund der hohen Bindungskapazität der “rauen” Nylonmembranoberfläche (Taschen und Noppen) sind entsprechend hohe “Target”-Mengen realisierbar. Bei einer durchaus realisierbaren Spotgröße von 0,8 mm und einer Dicke der Membran von ca. 100 µm verteilt sich die “Target”-DNA in einem Volumen in der Größenordnung von 10⁷ µm³. Legt man die Dimensionen eines einzelnen ds-DNA-Moleküls von 1000 bp zu Grunde ist dies mehr als das hundertfache des Volumens aller DNA-Moleküle zusammen. So kann jedes dieser Moleküle ohne gegenseitige sterische Behinderung als selbstständiges Fängermolekül (“Target”) wirksam werden.

4.6.3. Methodischer Vergleich der Verfahren zur Analyse der Genexpression

Die Möglichkeiten, expressionsgenetische Profile von klinischen Proben, z.B. melanozytären Hauttumoren, in größerem Maßstab zu erstellen, werden eingeschränkt durch die Schwierigkeit, mRNA in ausreichender Menge und Qualität aus diesen Proben zu gewinnen. Hinzu kommt, dass insbesondere bei malignen Läsionen ein Großteil des exzidierten Patientenmaterials für die histopathologische

Beurteilung aufgebraucht wird, sodass es schlicht unmöglich ist, die für die Expressionsstudien notwendigen Mikrogramm-Mengen an kontaminationsfreier RNA aufzubringen.

Für die Hybridisierung von Arrays werden, vor allem wenn man mit fluoreszenzmarkierten Proben in Verbindung mit Glaschips als Trägermaterial für Oligonukleotide arbeitet, mindestens ein Mikrogramm mRNA zur Probengenerierung benötigt (Bertucci F et al., 1999). Im Gegensatz dazu wurde argumentiert, dass RNA-Fingerprint-Techniken wie die RAP-PCR einen ähnlichen Informationsgehalt liefern, dabei jedoch viel weniger RNA verbrauchen (McClelland M et al., 1994). Dies stimmt allerdings nur teilweise. Nimmt man an, dass bei einen durchschnittlichen Fingerprint etwa 600 ng RNA benötigt werden, um zwischen 150 und 200 cDNA Fragmente zur Darstellung zu bringen, würde die genomweite Erfassung differentieller Genexpression ebenfalls mehrere Mikrogramm gesamtzellulärer RNA verbrauchen. Außerdem ist es aufgrund der wahrscheinlichen Kontamination mit unerwünschten Amplikons, absolut notwendig, die aus dem RAP-PCR Gel isolierten Zielfragmente durch bestätigende Experimente, wie z.B. Northern Blot Analysen oder Reverser Northern, zu überprüfen. Auch hierfür wird zusätzlich RNA benötigt.

Von den 24 Kandidatenamplikons, die in der hier vorgestellten Arbeit im RNA-Fingerprinting progressionsabhängige Genregulation zeigten, konnten letztendlich nur acht – rund ein Drittel – im Reversen Northern Blot bestätigt werden. Unsere Daten zeigten darüber hinaus, dass gerade die mittels RAP-PCR gefundenen „Messages“ zu wenig abundant sind um sie im Northern Blot überhaupt nachweisen zu können.

Trotzdem soll die Leistungsfähigkeit von RNA-Fingerprint-Techniken wie der RAP-PCR nicht geschmälert werden. Gerade beim parallelen Vergleich vieler Proben oder unter mehreren experimentellen Bedingungen spielt diese Methode ihre Vorteile aus. Ein Set von einem Dutzend arbiträrer Primer genügt um einige tausend cDNA Amplikons zu untersuchen, bei vergleichsweise niedrigen Kosten. Wollte man eine Auswahl von beispielsweise 40 Läsionen – eine durchaus realistische Anzahl an Proben für die Suche nach expressionsgenetischen Markern in humanen Hauttumoren – mithilfe von cDNA-Arrays vergleichend untersuchen, wäre hierfür ein enormer Zeit- und Kostenaufwand erforderlich. Unter Verwendung der in einem

normalen Fingerprint dominierenden nicht regulierten cDNAs als interne Kontrollen (Trenkle T et al., 1998; Vogt T et al., 1997) könnten Veränderungen der Genexpression in verschiedenen Phänotypen schnell zur Darstellung gebracht werden. Die RAP-PCR ist in solchen Fällen, wenn es nicht so sehr auf die Identifizierung einzelner regulierter Transkripte ankommt, sicherlich die Methode der Wahl.

Den meisten auf Arrays gespotteten cDNAs liegen mittlerweile bekannte Sequenzinformationen in entsprechenden Genbanken zugrunde. Deshalb zielt die Array-Technologie in der Regel auf die Überprüfung der Expression bereits bekannter Gene. Bei der RAP-PCR hingegen bestimmt der arbiträre (Zufalls-) Primer welche cDNAs im RNA-Fingerprint erscheinen. Häufig werden dabei neue, bislang unbekannte cDNAs aufgespürt. Dies ist ebenfalls eine unbestreitbare Stärke PCR-basierter Anätze zur Untersuchung differentieller Genexpression. In den Studien der vorliegenden Arbeit wurden 200 RAP-PCR Fragmente sequenziert und dabei 22 neue, bislang in keinem anderen System beschriebene cDNAs gefunden. Schon in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe führte die RAP-PCR zur Entdeckung einiger neuer Gene, die möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Progression des malignen Melanoms spielen (Vogt T et al., 1997). Für eines dieser Gene konnte z.B. eine Verwandtschaft zum Retinoblastoma-binding-Protein-2 nachgewiesen werden und somit ein neues Familienmitglied dieser Gruppe gefunden werden (Vogt T et al., 1999). Dieses Gen zeigt die typischen Merkmale eines Klasse II Gens (siehe Abschnitt 4.2.), d.h. die Expression ist in malignen Melanomen im Vergleich zu benignen Nävi vermindert, ohne dass das Gen Mutationen oder Deletionen aufweist.

4.7. Differentielle Genexpression im Rahmen der Melanomprogression

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit erlauben unseres Wissens nach erstmals eine Einschätzung des Ausmaßes expressionsgenetischer Veränderungen in isogenen Varianten von humanen Melanomzelllinien, die gegenüber den Parentallinien a) ein gesteigertes Tumorwachstum, b) ein zunehmendes Potential zur Invasion und c) Metastasierung aufweisen. Sowohl die Resultate der RAP-PCR als auch die Daten, die durch den Einsatz der cDNA-Array Technologie gewonnen

werden konnten deuten darauf hin, dass in den untersuchten Zelllinien etwa 2% aller exprimierten Gene von progressionsabhängigen Veränderungen der Genexpression betroffen waren. Auf den durchschnittlichen „Message-Gehalt“ einer Säugetierzelle bezogen, etwa 15.000 bis 20.000 Transkripte, wären dies etwa 400-800 Gene. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den Daten aus Untersuchungen anderer Tumorarten (Sager R, 1997).

Beide Ansätze, sowohl das auf PCR basierende RNA-Fingerprinting als auch die Array-gestützte Analyse der Genexpression führten zu der Identifizierung einer Reihe von Genen, die bei der Progression des malignen Melanoms eine bedeutende Rolle spielen und somit von diagnostisch-prognostischer Relevanz sein könnten: Als Beispiel sei im Vorgriff auf die ausführliche Diskussion unter Punkt 7.8.1. das Osteonectin-Gen erwähnt. SPARC/Osteonectin moduliert als sezerniertes Protein die Aktivität verschiedener Metalloproteininasen und wirkt so auf die Komposition und Textur der tumorumgebenden Matrix. Wir fanden dieses Gen in den Arrays und später bestätigt durch Northernblots positiv korreliert mit dem Tumorwachstum, der Invasion und der Metastasierung. Im zeitlichen Kontext unserer Arbeit erschien eine Arbeit von Massi, die die Expression von Osteonectin *in situ* untersuchte und einen signifikanten Bezug zu Prognose der Patienten darstellen konnte und noch aktueller eine Arbeit in *Nature Medicine*, in der Ledda und Mitarbeiter in einem Osteonectin-Antisenseansatz bei Melanomzellen die Tumorigenität und Metastasierungspotenz komplett blockieren konnten (Ledda MF et al., 1997; Massi D et al., 1999). Wir werten daher unseren Befund als Beispiel relevanter Ergebnisse und als Bestätigung des technischen Ansatzes und methodischen Aufbaus.

Trotzdem bleibt die Interpretation von Expressionsdaten spekulativ solange man sich dabei nur auf indirekte Informationen über die einzelnen Gene stützen kann, die man aus der einschlägigen wissenschaftlichen Literatur zieht. Die endgültige Bestätigung von tatsächlich progressionsabhängig regulierten Genen kann durch die RAP-PCR und die Hybridisierung von cDNA-Arrays nicht erbracht werden und erfordert weiterführende funktionelle Analysen.

4.7.1. RAP-Befunde an Geweben und in vitro Modellen

Die RAP-PCR setzt neben qualitativ einwandfrei präparierter RNA auch gewisse Quantitäten voraus. Im typischen Fall werden pro Probe etwa 500 ng gesamtzelluläre RNA benötigt. Bei dem Vergleich der RAP-Fingerprints aus Geweben ergaben sich durchaus einige informative Befunde differentieller Genexpression (siehe Ergebnisse: Abschnitt 1.1.1.). Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung als diagnostisch-prognostische Marker sind hier vor allem jene Transkripte interessant, die entweder einen durchgängigen Unterschied in der Gruppe der Melanome und/oder Melanommetastasen im Vergleich zu den melanozytären Nävi zeigen oder im Sinne einer zunehmenden Progression in einigen Primärmelanomen differentiell reguliert sind und somit eine aggressivere Variante des Primärmelanoms mit größerer Metastasierungsneigung andeuten. Aufgrund der begrenzten RNA Mengen, die aus den üblicherweise kleinen Melanom- und Nävusgewebeproben gewonnen werden können, bewegte sich die Zahl der darstellbaren Transkripte nur im Bereich einiger hundert Amplikons und engte damit auch die Auswahl an differentiell regulierten und klonierungswürdigen cDNAs stark ein.

Ein anderes Bild ergab sich bei der Untersuchung der in vitro Modelle. Hier standen ausreichende Mengen an RNA zur Verfügung, sodass insgesamt einige tausend cDNAs im RNA-Fingerprint dargestellt werden konnten. Bei 126 (über 2%) der erfassten Transkripte konnte eine den Kriterien entsprechende differentielle Expression beobachtet werden. Diese überraschend große Zahl differentiell regulierter Transkripte gibt zur Hoffnung Anlass, dass sich in der Tat in melanozytären Zellen mit unterschiedlich aggressivem Phänotyp charakteristische Expressionsprofile definieren lassen, da offensichtlich ein große Fülle von expressionsgenetischen Veränderungen mit solchen Selektionsprozessen einherzugehen scheint. Nachteilig ist, dass gerade wegen der hohen Komplexität der Veränderungen im Einzelfall schwer zu beurteilen ist, ob es sich um genetische Epiphänomene, ein Hintergrundrauschen, der Selektion handelt oder eine echte funktionelle Konsequenz aus der differentiellen Expression eines dieser Gene erwächst. In manchen Fällen lässt sich aber über die Zuordnung zu bestimmten Genfamilien und entsprechende funktionelle Implikationen eine biologische Bedeutung eines solchen Befundes antizipieren, z.B. im Falle der von Vogt et al. neu beschriebenen Befunde zur LERK-5/EPLG5- oder RBP2H1-Expression (Vogt T et

al., 1998; Vogt T et al., 1999). 46 der insgesamt 126 potentiell regulierten Fragmente wurden sequenziell weiterverfolgt. Die Wahrscheinlichkeit, beim Ausschneiden der Zielfragmente aus den Fingerprintgelen kontaminierende Amplikons mitzueluieren, machte es notwendig, von jedem Kandidatenfragment mehrere Klone zu überprüfen. Die Sequenzierung der insgesamt 200 klonierten cDNAs bestätigte das Vorhandensein einzelner kontaminierender Sequenzen. Nur bei einem kleinen Teil der sequenzierten Transkripte wurden durch Vergleich mit Einträgen in den Genbanken Übereinstimmungen zu bekannten Genen gefunden. Die Mehrzahl der Kandidatenfragmente hingegen lieferten lediglich eine Übereinstimmung zu cDNA- oder EST-Klonen unbekannter Funktion oder waren zu diesem Zeitpunkt in keiner Genbank registriert (siehe folgenden Abschnitt). Die Bestätigung der progressionsabhängigen differentiellen Expression mittels Reverser Northern Analysen gelang letztlich nur für einige der Kandidaten-cDNAs, da die Abundanz der meisten Transkripte, die im RNA-Fingerprint als differenziell exprimiert erscheinen, offensichtlich unter der Nachweisgrenze der gewählten Methode liegt.

Den aktuellen Entwicklungen folgend, wurde unsererseits die Suche nach molekularen Markern der Melanomprogression in den genannten *in vitro* Modellen mithilfe von cDNA-Arrays weiter komplettiert. Parallel dazu, da es schwierig ist Gewebe und diverse *in vitro* Modelle sinnvoll abzudecken, werden die expressionsgenetischen Untersuchungen von Patientengeweben seitens Dr. rer. nat. B. Becker und Prof. Stolz weitergeführt. Bei der Präparation von Melanozyten und Melanomzellen aus humanen Hauttumoren kann inzwischen auf die Möglichkeiten der hochpräzisen "laser capture microdissection" zurückgegriffen werden, die seit einiger Zeit am Institut für Pathologie in Regensburg zur Verfügung steht. In Verbindung mit den cDNA Arrays, die gemeinsam etabliert wurden, kann so möglicherweise ein "Melanomarray", Sammlung der relevanten und potentiell relevanten Gene auf einem Array, der die Daten beider Ansätze vereint, in naher Zukunft realisiert werden.

4.7.1.1. Entdeckung neuer, seltener cDNA-Sequenzen mithilfe der RAP-PCR

Die Sequenzierung der Kandidaten-Fragmente aus den RNA-Fingerprint-Studien führte wie schon erwähnt zur Entdeckung einer Reihe von seltenen cDNA-

Sequenzen, die zum damaligen Zeitpunkt in keiner Genbank registriert waren. Diese 22 Sequenzen wurden in der N.C.B.I.-“Genbank” publiziert (Rumpler G et al., “accession numbers”: AF119298 – AF119319). Mit fortschreitender Sequenzierung des menschlichen Genoms im Zuge des “Human Genome” Projekts wächst die Fülle an in Datenbanken gespeicherter Sequenzinformation. Eine kürzlich durchgeführte Überprüfung der 22 vormals (1998) neu entdeckten RAP-Fragmente ergab, dass für viele dieser Fragmente die Vollängen-Sequenz inzwischen bekannt ist (siehe Tabelle 7). Beispielsweise konnte dabei eine cDNA einem Gen zugeordnet werden, dass für das Protein HNRPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) codiert. Dieses Kernprotein ist maßgeblich an der Verlängerung der Telomeren beteiligt. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass HNRPA1 im Komplex mit seinem aminoterminalen Derivat UP1 an die einzelsträngigen 3'-Überhänge der Telomerenenden binden kann und telomere Sequenzen vor dem Abbau durch Nukleasen schützt (Glässl A et al., 1999). Im Kontext früherer Arbeiten zu Telomeraseexpression aus unserer Gruppe, ist diese Beobachtung sehr interessant und ruft nach weiterer Validierung und funktionellen Erhellung des Befundes.

Tabelle 7: Identifizierung neuer cDNAs mithilfe der RAP-PCR

Autor	GB-Nummer	1998	Zugeordnete Gene/Genloci: 28. 9. 2000
Rumpler et al.	AF_119319	EST	NH0395B14
Rumpler et al.	AF_119318	EST	-
Rumpler et al.	AF_119317	EST	RP5-1059L7
Rumpler et al.	AF_119316	EST	Mcl-1 (MCL-1)/BCL-2
Rumpler et al.	AF_119315	EST	-
Rumpler et al.	AF_119314	EST	-
Rumpler et al.	AF_119313	EST	-
Rumpler et al.	AF_119312	EST	RP5-1059L7
Rumpler et al.	AF_119311	EST	-
Rumpler et al.	AF_119310	EST	-
Rumpler et al.	AF_119309	EST	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRPA1)
Rumpler et al.	AF_119308	EST	-
Rumpler et al.	AF_119307	EST	-
Rumpler et al.	AF_119306	EST	-
Rumpler et al.	AF_119305	EST	NH0469M07
Rumpler et al.	AF_119304	EST	-
Rumpler et al.	AF_119303	EST	RP1-190I16
Rumpler et al.	AF_119302	EST	-
Rumpler et al.	AF_119301	EST	259m9 (LBNL H193)
Rumpler et al.	AF_119300	EST	RP11-224A1
Rumpler et al.	AF_119299	EST	RP11-224A1
Rumpler et al.	AF_119298	EST	RP3-485C17

4.7.2. cDNA-Array Befunde an in vitro Modellen

Die visuelle und densitometrische Auswertung der cDNA-Array-Experimente ergab, dass in allen drei untersuchten Progressionsmodellen insgesamt 41 cDNAs gefunden wurden, deren Signalintensität sich mindestens um einen Faktor von 2,5 unterschieden, und damit nach unseren Kriterien als möglicherweise differentiell exprimiert eingestuft wurden.

Die Anzahl der identifizierten Kandidatengene verteilte sich auf die einzelnen Progressionsmodelle wie folgt (Tabelle 6, Abschnitt 3.3.1.):

Im in vitro Modell, dass die Eigenschaft des lokal-aggressiven Tumorwachstums repräsentiert, waren 10 cDNAs reguliert exprimiert. Ausgehend von etwa 500-800 von insgesamt 27.000 ESTs auf dem verwendeten Array, die sichtbare Signale lieferten, liegt die Zahl der regulierten Transkripte in diesem System bei ca. 1,75 %. Im Progressionsmodell "Invasivität" erfüllten dagegen 13 cDNAs, also rund 2% der sichtbaren Spots, das Kriterium für differentielle Expression. Die meisten regulierten Kandidatengene wurden in Zelllinien gefunden, die hinsichtlich der Metastasierungsfähigkeit selektiert wurden. Hier wurden 18 differentiell exprimierte cDNAs detektiert, etwa 2,9 % der auswertbaren Spots.

Da eine erste Befundung durch visuellen, paarweisen Vergleich der Array-Autoradiografien vorgenommen wurde, war die Zahl der potentiell regulierten Spots ursprünglich größer. Einige der auf diese Weise zunächst selektierten cDNAs fielen jedoch nach der softwaregestützten Auswertung der Phosphorimagerdaten aufgrund der Unterschreitung des gesetzten Grenzwertes als mögliche Kandidatengene heraus.

4.8. Bestätigte molekulare Determinanten der Melanomprogression im Einzelnen

Aus methodischen Gründen, die der Arraytechnik immanent sind, wird im Allgemeinen zur Anerkennungsfähigkeit als differentiell reguliertes Gen ein bestätigendes Verfahren gefordert. Da der Northernblot bei Verwendung von Zellen einsetzbar ist und die "unbestechlichste" Methode zur RNA Quantifizierung darstellt, wurde für einige besonders interessante Kandidaten diese Bestätigung durchgeführt.

Einige der regulierten Kandidaten-cDNAs, die im Array-Experiment deutliche Expressionsunterschiede zeigten wurden durch Northern Blot Analyse überprüft. Erfreulicherweise konnten dabei sechs von sechs Genen in ihrer Regulation bestätigt werden, die im Hinblick auf die Melanomprogression von bedeutender Relevanz sein könnten und möglicherweise als molekulare Marker für Diagnostik und Prognostik des malignen Melanoms Verwendung finden könnten. Diese hohe Rate an Bestätigung spricht klar für ein technisch akkurate Vorgehen bei der Array-Analyse. Viele dieser Gene bieten darüber hinaus neue Ansatzpunkte für funktionell-genetische Anschlussprojekte, wie im Folgenden ausgeführt wird. Durch die breite und simultane Analyse verschiedener Progressionsmodelle ergeben sich zusätzlich interessante Quervernetzungen der verschiedene Aspekte der Melanomprogression.

4.8.1. Osteonectin/SPARC

SPARC (secreted protein, acidic and rich in cystein), auch als Osteonectin oder BM-40 bekannt, ist ein Kalzium-bindendes Glykoprotein, das in verstärktem Maße im Knochengewebe exprimiert wird, jedoch auch in vielen anderen Zelltypen und Geweben nachweisbar ist (Maillard C et al., 1992). SPARC gilt als der Prototyp einer Familie von biologisch aktiven Glykoproteinen, zu denen neben Thrombospondin 1 und 2 auch Tenaskin C und X und Osteopontin gehören (Yan Q and Sage EH, 1999). Obwohl diese Proteine strukturell verschieden sind zeigen sie doch funktionelle Verwandtschaft. Aus dem Expressionsmuster lässt sich schließen, dass SPARC generell an Prozessen beteiligt ist, die den Umbau und die Reorganisation von Geweben betreffen (Murphey-Ulrich JE et al., 1995). Dazu zählen z.B. die Umgruppierung von Zellen in der Entwicklung und Regeneration, Angiogenese, sowie Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix während der normalen Gewebemorphogenese und Differenzierung, aber auch pathologische Gewebeveränderungen als Reaktion auf Verletzung oder Tumorbildung. Die biologischen Funktionen der SPARC Proteinfamilie unterscheiden sich allerdings von klassischen Proteinen der extrazellulären Matrix (Yan Q and Sage EH, 1999). Während z.B. adhäsive Proteine wie Fibronektin, Laminin oder Kollagen zur strukturellen Stabilität der extrazellulären Matrix und des Gewebeverbandes beitragen, ist die Wirkung von SPARC **gegen** die Adhäsion von Zellen und Bindungen in Geweben gerichtet, d.h., dass Osteonectin ähnlich wie Tenaskin oder

Thrombospondin die adhäsiven Bindungen zwischen Zellen und der umgebenden Matrix reduzieren kann indem es den Kontakt der Zelle zum Matrixsubstrat unterbricht und die Umordnung des Zytoskellets fördert (Murphy-Ullrich JE et al., 1995). In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass SPARC die Expression von Metalloproteininasen induzieren kann (Hasselaar P et al., 1991; Tremble PM et al., 1993) und Einfluss auf Änderungen der Zellform nimmt, indem es z.B. die Abrundung der Zellen stimuliert (Lane TF and Sage EH, 1990; Sage H et al., 1989). Während der Tumorprogression könnte die antiadhäsive Wirkung von SPARC und die Fähigkeit Enzyme zu aktivieren, die am Abbau der Basalmembranen und Matrixkomponenten beteiligt sind, die Invasion von Tumorzellen durch Gewebebarrieren erleichtern und so die Ausbreitung von Tumorzellen im menschlichen Körper fördern. Darüber hinaus wird in einigen Studien berichten, dass Osteonectin die Expression von Thrombospondin, einem starken Angiogenese-Inhibitor, vermindern kann und so durch Förderung der Gefäßneubildung die Angiogenese positiv beeinflusst (Iruela-Arispe ML et al., 1991; Vernon RB und Sage EH, 1995).

In der vorliegenden Arbeit beobachteten wir in Zelllinien mit zunehmender Metastasierungsneigung einen deutlich progressionsabhängigen Anstieg der Osteonectinexpression (Abb. 13). Die Ergebnisse der Northern Blot Analyse zeigen außerdem, im Sinne der erwähnten Quervernetzungen, eine verstärkte Expression in einem der beiden Progressionsmodelle mit stärkerem Tumorwachstum, grenzwertig auch im Invasionsmodell. Unsere Daten stimmen sehr gut mit zeitgleichen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein. So konnten Ledda et al. zeigen, dass Osteonectin in primären und metastasierenden Melanomen sehr stark, in dysplastischen Nävi eher mäßig und in melanozytären Nävi nur schwach exprimiert wird (Ledda F et al., 1997). Auch Massi et al. zeigten, dass die Osteonectinexpression signifikant mit einer aggressiveren Tumorprogression, mit der Bildung von Fernmetastasen und mit einer reduzierten Überlebensrate korreliert (Massi D et al., 1999). Andere Untersuchungen der Gruppe um Ledda, zeigten kürzlich funktionell mit Antisenseansätzen, dass infolge einer reduzierten Expression von Osteonectin die Invasion und das Tumorwachstum zweier unterschiedlicher humaner Melanomzelllinien unterdrückt wird (Ledda MF et al., 1997). Somit scheint Osteonectin nicht nur die von uns gesuchten Markerqualitäten zu haben sondern auch als Therapietarget interessant zu sein.

Doch nicht nur beim malignen Melanom, auch in Tumorgeweben anderer Krebstypen wurde eine Überexpression von SPARC nachgewiesen (Porter PL et al., 1995). Besonders deutlich ist der Zusammenhang zwischen einer verstärkten Osteonectinexpression und der Tumorprogression bei Brust- und Darmkrebs (Bellahcene A and Castronovo V, 1995; Ledda MF et al., 1996; Porte H et al., 1995).

Unsere eigenen Daten wie auch die Ergebnisse der zitierten Studien stützen die Annahme, dass Osteonectin eine Schlüsselposition bei der Initialisierung der Tumorinvasion und -metastasierung einnehmen könnte. Weiterführende Arbeiten sollen hierüber Aufschluss geben und helfen, weitere Einblicke in die biologische Funktionsweise von Osteonectin bei der Tumorprogression zu gewinnen. Beispielsweise könnte ein Yeast-Two-Hybrid-System weiterhelfen, die funktionellen Partner der SPARC in Melanomen weiter zu studieren.

4.8.2. Ubiquitin

Der Abbau von Proteinen in eukaryonten Zellen kann über zwei unterschiedliche proteolytische Wege erfolgen. Der erste, auch als lysosomaler Weg bezeichnet, wird hauptsächlich benutzt um extrazelluläre Proteine, die durch Endozytose oder Pinozytose in die Zelle eingeschleust wurden, abzubauen (Spataro V et al., 1998). Ein zweiter, nicht-lysosomaler Weg läuft über einen Multienzymkomplex, dem 26S Proteasom, und degradiert intrazelluläre Proteine, die zuvor durch die Bindung des Proteins Ubiquitin markiert wurden. Man bezeichnet diesen Weg deshalb auch als den Proteasom-Ubiquitin Pathway. Die Markierung der zum Abbau vorgesehenen Proteine erfolgt durch Anheftung multipler Monomere von Ubiquitin, ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, an spezifische Seitenketten in einem mehrstufigen Prozess.

Die wahre Bedeutung des Proteasom-Ubiquitin Pathways wurde lange Zeit verkannt als einfacher Mechanismus zum Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine. Inzwischen ist jedoch offensichtlich, dass diesem Mechanismus eine entscheidende Rolle bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse zukommt (Spataro V et al., 1998). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass dieser Weg der Proteolyse an der Regulation von Proteinen wie beispielsweise Zyklinen, Inhibitoren Zyklinabhängiger Kinasen oder Transkriptionsfaktoren p53, c-JUN und c-FOS beteiligt ist

(Hochstrasser M, 1995; King RW et al., 1996; Pahl HL und Baeuerle PA, 1996). Die Vielfältigkeit der biochemischen Prozesse, die durch Proteolyse der darin involvierten Proteine über den Proteasom-Ubiquitin Pathway beeinflusst wird, nährt die Vermutung, dass dieser Mechanismus auch für tumorassoziierte Veränderungen in der Zelle verantwortlich sein könnte. In der Tabelle 8 sind wichtige Substrate der Ubiquitin gesteuerten Proteolyse und mögliche Effekte einer dysregulierten Proteolyse auf die Tumorprogression aufgelistet. Hieraus ist ersichtlich, dass eine veränderte Ubiquitin-abhängige Proteolyse einerseits zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressor-Proteinen wie p53 oder p27, andererseits aber auch zu einer Aktivierung tumorpromovierender Proteine, wie z.B. AP1 oder NF-κB führen kann.

Tabelle 8: Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Pathways und möglicher Bezug zur Tumorprogression (aus Spataro et al.)

Substrat	Dysregulation der Proteolyse	Funktioneller Effekt	Biologischer Effekt
p53	verstärkt	p53 Inaktivierung	Transformation in HPV-induzierten Tumoren
p27	verstärkt	p27 Inaktivierung	Tumorprogression
Zyklin D1, E und B	vermindert ?	Zyklin D1, E oder B Überexpression	Tumorprogression
NF-κB Inhibitor IκB	verstärkt	verstärkte NF-κB Aktivierung	Resistenz gegen Zytotoxizität von TNF-α
Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie	vermindert	erhöhte AP-1 Aktivität	Tumorprogression

Das wiederholte, schnelle Durchschreiten des Zellzyklus proliferierender Zellen ist ein essentieller Aspekt der Tumorprogression. Der Zellzyklus wird durch das Zusammenspiel von Zyklinen/Zyklin-abhängiger Kinasen (CDKs) und CDK-Aktivatoren bzw. -Inhibitoren, reguliert. Anders als bei p21, einem weiteren Vertreter der CDK-Inhibitoren wird die Aktivität z.B. von p27 nicht durch Transkriptionsregulation sondern post-translationell durch Proteolyse über den Ubiquitin-Proteasom Weg kontrolliert (Hengst L and Reed SI, 1996; Pagano M et al.,

1995). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein niedriger Gehalt an p27 in Darmtumoren oder Mamakarzinomen sehr gut mit einer verschlechterten Prognose korreliert (Catzavelos C et al., 1997; Loda M et al., 1997; Porter PL et al., 1997). In beiden Tumorvarianten wurde eine Diskrepanz zwischen der Menge an p27 mRNA und der Menge an p27 Protein beobachtet, was darauf hindeutet, dass auch in Tumoren der Level des p27 Proteins post-translationell reguliert wird. In anderen Studien konnte darüber hinaus klar bestätigt werden, dass eine gesteigerte Ubiquitin-abhängige Proteolyse für niedrige p27 Level in Gewebeproben kolorektaler Karzinome verantwortlich ist (Spataro V et al., 1998).

Es gibt zunehmend Beweise, dass Proteasomen auch an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt sind, wie beispielsweise NF-κB, p53, c-JUN oder MATα2. Dies kann im Sinne einer Inaktivierung oder Aktivierung der Genexpression erfolgen (Pahl HL und Baeuerle PA, 1996). Ein interessantes Beispiel ist die Regulation von NF-κB. Dieses Protein wird durch zytotoxische Agenzien wie z.B. TNF-α, ionisierende Strahlung oder oxidativen Stress aktiviert (Wang CY et al., 1996). Die Aktivierung von NF-κB erfordert unter anderem die Degradation des Inhibitors IκB, wodurch der Eintritt von NF-κB in den Zellkern ermöglicht wird. Andererseits konnte in einer Studie gezeigt werden, dass im Falle einer Blockierung von NF-κB durch den Proteasomeninhibitor MG132 die zytotoxische Wirkung von TNF-α auf HT1080V Zellen stark erhöht war (Wang CY et al., 1996). In diesem Kontext stellt sich die Frage, inwieweit die zunehmende TNF-α Resistenz der von Kobayashi selektierten Varianten der Melanomlinien WM1341B und WM35, die in der vorliegenden Arbeit wie beschrieben als *in vitro* Modelle in den expressionsgenetischen Studien verwendet wurden, auf eine Störung der Proteasomenfunktion zurückgeführt werden kann.

Dieser Zusammenhang wird im malignen Melanom durch diese Arbeit erstmals aufgegriffen und bietet daher Raum für weitere, funktionelle Studien. So ist beispielsweise geplant, den Effekt einer Überexpression von Ubiquitin in verschiedenen Melanomzelllinien auf die Zytokinresistenz dieser Zelllinien zu untersuchen und erneut durch den Einsatz von Arrays möglicherweise pleiotrope Effekte der Ubiquitinüberexpression auf die Transkriptionsmaschinerie zu erforschen.

4.8.3. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)

Der „Macrophage Migration Inhibitory Factor“ (MIF) wurde zuerst als ein von T-Zellen synthetisiertes Lymphokin beschrieben, das in einer Reihe von makrophagen-spezifischen Funktionen, wie z.B. der Phagozytose oder der Steigerung der Adhärenz und der tumorizidalen Aktivität von Makrophagen involviert ist und die spontane Migration von Makrophagen inhibieren kann (Bloom BR und Bennett B, 1966; David JR, 1966). Inzwischen ist bekannt, dass MIF nicht nur in T-Zellen sondern in einer Vielzahl von Organen wie beispielsweise der Leber oder im Gehirn gebildet wird (Bucala R, 1996; Nishihira J, 1998). Außerdem wurde die Wirkung von MIF als proinflammatorisches Zytokin beschrieben. Makrophagen geben MIF als Reaktion auf Glucocorticoide ab, um der immunsuppressiven Wirkung der Glucocorticoide auf die Produktion anderer entzündungsfördernder Zytokine entgegenzuwirken (Calandra T et al., 1995). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass MIF die Expression von TNF- α , Interleukin-1 und Interleukin-6 stimuliert (Nishihira J, 2000).

Im Zusammenhang mit der Suche nach progressionsrelevanten Marker beim malignen Melanom ist interessant, dass neben möglichen Funktionen bei Entzündungs- und immunologischen Prozessen für MIF ebenfalls eine essentielle Funktion bei der Zellproliferation und -differenzierung postuliert wird (Nishihira J, 2000).

So wurde u.a. in Lymphknotenmetastasen von Prostatakarzinomen und in duktalen Brustkarzinomen eine verstärkte Expression von MIF gefunden (Bini L et al., 1997). Erhöhte Level an MIF mRNA fanden sich auch in Lymphomzellen und in Darmkrebszellen (Nishihira J et al., 1996; Takahashi N et al., 1998). Andererseits konnte mit einem Antisensekonstrukt gegen MIF die Zellproliferation von Kolonzellen einer murinen Adenokarzinom-Zelllinie signifikant supprimiert werden (Nishihira J, 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass Wachstumsfaktoren wie TGF- β , bFGF und PDGF die MIF Expression signifikant steigern können. Diese Resultate weisen eindeutig darauf hin, dass MIF entweder direkt oder in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren das Wachstum von Tumorzellen induzieren kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gehen mit den Daten aus anderen Studien konform. In den Array-Experimenten fiel MIF durch eine verstärkte Expression in den Zelllinien mit zunehmender Tumorigenität im Vergleich zur Parentallinie auf. Die Überprüfung im Northern Blot bestätigte diese Beobachtung. Auch hier war die Expression in der tumorigeneren Tochterlinie "22" gegenüber der Parentallinie WM1341B deutlich erhöht (Abbildung 13).

In Zusammenhang mit der Stimulation der Tumorzellproliferation ist interessant, dass MIF die Funktion des Tumorsuppressorgens p53 inhibieren kann (Nishihira J, 2000). Dieser Effekt wurde bisher beim malignen Melanom noch nicht näher untersucht. Andererseits haben frühere Arbeiten von Vogt et al. gezeigt, dass in Melanomen eine progressionsabhängige Überexpression von offenbar funktionslosem Wildtyp p53 vorkommt (Vogt T et al, 1997). Deshalb soll in weiteren Experimenten überprüft werden, ob in den von uns untersuchten Melanomzelllinien die p53-induzierte Apoptose, z.B. durch UV induziert, durch Überexpression von MIF inhibiert werden kann. MIF ist eines der wenigen Beispiele für ein proinflammatorisches Zytokin mit einem Link zum Zellwachstum. Hier ergeben sich interessante Aspekte für die nähere experimentelle Bearbeitung des alten Postulats der Tumorphäologie, dass die chronische Entzündung, z.B. durch dauernde Reizung eines Muttermals oder wiederholte Sonnenbrände, letztlich tumorigen wirkt, auch ohne p53 Mutation.

4.8.4. PMEL17

Das spezifisch in Melanozyten gebildete Protein PMEL17 wurde ursprünglich aus einer humanen Vorhaut cDNA Bibliothek isoliert und weist signifikante Sequenzhomologien zum melanosomalen Matrix-Protein gp100 und zum murinen Silver Locus auf (Lee ZH et al., 1996). Es gehört zu einer nach ihm benannten Familie von Proteinen, die neben der Tyrosinase-Gruppe an der Regulation der Melaninbiosynthese beteiligt ist.

Kutanes Melanin findet man in der Haut, in Haarfollikeln, und im Auge (Kwon BS, 1993). Es wird in den Melanozyten in speziellen Organellen, den Melanosomen synthetisiert und über Dendriten an die umgebenden Keratinozyten abgegeben. Die Melaninsynthese der beiden unterschiedlichen Formen Eumelanin und Pheomelanin

beginnt mit der Oxidation von L-Tyrosin zu L-DOPA (Dihydroxyphenylalanin) und der anschließenden Dehydrogenierung zu DOPAquinon. Letzteres ist eine sehr reaktive Verbindung, die sofort in den Eumelanin- oder Phäomelaninsyntheseweg eintritt. Im klassischen, von Raper und Mason postulierten Reaktionsschema erfolgen die einzelnen Schritte der Eumelaninsynthese spontan. Sie waren der Meinung, dass nur die ersten beiden Schritte der Melaninsynthese von einem Enzym, der Tyrosinase katalysiert werden. Logan und Weatherhead lieferten jedoch den ersten indirekten Beweis, dass weitere Enzyme an der Regulation der Melaninsynthese beteiligt sein könnten (Logan A and Weatherhead B, 1980). Inzwischen konnten einige Gene identifiziert werden, deren Produkte in der Melaninsynthese involviert sein könnten, z.B. Tyrosinase-related Protein (TRP) 1 und 2 und MART-1/Melan-A (Lee ZH et al., 1996; Sarantou T et al., 1997). Ein Teil dieser Gene wurde der Thyrosin-Genfamilie zugeordnet und könnte an den ersten Schritten der Melaninsynthese beteiligt sein, ein anderer Teil wurde in der PMEL17-Genfamilie zusammengefasst und reguliert wahrscheinlich die späteren Phasen der Melaninsynthese. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass in normalen humanen Melanozyten der Melaningehalt deutlicher mit dem Gehalt an PMEL17 mRNA korreliert, als mit der Menge an Tyrosinase mRNA (Kwon BS et al., 1987). Darüber hinaus erhöhen Substanzen, die eine Stimulation der Melaninproduktion in pigmentierten Melanomen bewirken, gleichzeitig die Expression von PMEL17. Diese Daten stützen die Annahme, wonach PMEL17 ein positiver Regulator der Melaninproduktion sein könnte. Die genaue Funktion von PMEL17 ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Viel wichtiger ist aber die Tatsache, dass PMEL17 zu den Melanomantigenen zählt, die das Target für tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) sind (Sarantou T et al., 1997). Somit ist der Nachweis von PMEL-Expression gegebenenfalls wichtig für die Entscheidung für bestimmte adoptive Immuntherapien. Typisch ist, dass PMEL17 in den Tumoren und selbst bei Metastasen ein und desselben Patienten sehr heterogen exprimiert wird (Sarantou T et al., 1997). Unsere Arrays spiegeln diese Heterogenität sehr gut wieder. Wir wählten PMEL17 zur Bestätigung u.a. auch aus, weil wir hier unser technisches Prozedere, d.h. die Effizienz solche heterogen exprimierten Targets aufzufinden, überprüfen wollten: Beim Vergleich der cDNA-Array-Signale fanden wir eine deutlich erhöhte Expression von PMEL17 in einer tumorigennten Tochterlinie gegenüber der Parentallinie. In der von A375 abstammenden Familie von Zelllinien und im HI/SI-System war PMEL17 im Northernblot überhaupt nicht

nachweisbar (Abb. 13). Inwieweit Veränderungen der Expression von PMEL17 bei der Melanomprogression eine Rolle spielen, bleibt fraglich. Eine Progressionsrelevanz ist jedoch wahrscheinlich auszuschließen.

Vielmehr ist eine veränderte PMEL17 Expression eher eine *Folge* progressionsabhängiger Veränderungen der Genexpression. So wurde gezeigt, dass Onkogene wie E1A, ras oder "neu", aber auch die verstärkte Expression des basic fibroblast growth factor, bFGF, die Expression melanozytenspezifischer Gene wie Tyrosinase und PMEL17 herunterregulieren können (Halaban R et al., 1996). Dies könnte ein möglicher Mechanismus sein für die Depigmentierung, die oft bei metastasierenden Melanomen im Zuge zunehmender Tumorprogression beobachtet wird. Unsere Daten aus der Northern Analyse scheinen dies zu bestätigen, da, wie schon erwähnt, eine PMEL17 Expression weder in den metastasierenden Zelllinien, noch in den nach Invasivität selektierten Zelllinien SI und HI nachzuweisen war, wohl aber in drei der vier Primärtumorlinien der Systeme von Bob Kerbel.

4.8.5. NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase

Nikotinamid Adenin Dinukleotid: Ubiquinon Oxidoreduktase (NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase oder Komplex I) ist der Einstiegspunkt von Elektronen in die Elektronentransportkette von Mitochondrien (Grigorieff N, 1999). Dieser Multienzymkomplex ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert die Elektronenübergabe von NADH in den Quinonpool. Die Überexpression des Enzyms im Tumorigenitätsmodell ist für das Melanom ausgesprochen neu, aber es gibt einige Befunde an anderen Tumorentitäten.

Spekulierend kann man sich zweierlei Konsequenzen der Überexpression vorstellen:

- a) Die Zelle wird besser mit ATP versorgt und erhält einen Wachstumsvorteil.
- b) Da NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase eine wesentliche Quelle toxischer Sauerstoffradikale ist, könnte eine toxische Wirkung auf das Genom der Zelle, nuklear und mitochondrial, resultieren mit der Folge progressiver genetischer Instabilität und Mutabilität. Die Folge der Generierung neuer Tumorzellklone mit verändertem Genotyp und Phänotyp im Rahmen der Progression wäre die Folge.

Folgerichtig hat die pharmazeutische Forschung ihr Augenmerk auf diese Zusammenhänge gerichtet. In einer Arbeit, die kürzlich in PNAS erschien, wurden neue zytostatische Pharmaka beschrieben, Rotenone, die speziell NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase hemmen (Fang und Cassida, 1998). Da NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase-Überexpression auch zu Zytostatikaresistenz führen kann, z.B. gegenüber Cisplatin, stellen diese Pharmaka eine deutliche Bereicherung des antitumoralen Arsenals dar.

Zukünftig kommt der simultanen Analyse von Markern vom Typ NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase also möglicherweise eine wichtige Stellung zu, um für einen Tumor eines Patienten die jeweils beste Therapie auszuwählen. Mit einem Melanomchip, der auch diesen neuen Aspekt miterfasst, wäre also zur Therapieoptimierung eine sinnvolle Ergänzung.

4.8.6. Kathepsin Z

Die zur Papain Familie zählenden Zystein Proteininasen oder Kathepsine bilden einen wichtigen Bestandteil des lysosomalen Proteolyseweges und erfüllen eine essentielle Funktion bei der Degradation und Modifikation von Proteinen (Santamaria I et al., 1998b). Außerdem sind diese Proteininasen vermutlich auch außerhalb der Zelle an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt wie z.B. dem Umbau von Knochengewebe, der Aktivierung von Prohormonen, an Erkrankungen wie Arthritis und Alzheimer, aber auch bei der Tumorinvasion und –metastasierung. Kathepsin Z wurde kürzlich als ein neues Mitglied der bis dato aus 13 Varianten bestehenden Kathepsin Gruppe beschrieben. Normalerweise werden die verschiedenen Zystein Proteininasen der Papain Familie als Präproenzyme synthetisiert, zu den entsprechenden Proenzymen umgebaut und zu den Lysosomen dirigiert, wo die abschließende Reifung zum aktiven Enzym erfolgt. Allerdings wurde beobachtet, dass unter bisher nicht bekannten Umständen der normale Reifungsprozess verlassen wird und lysosomale Proenzyme über den sekretorischen Weg in den extrazellulären Raum abgegeben werden (Kornfeld S und Mellman I, 1989). Während also unter normalen physiologischen Bedingungen Kathepsine vorwiegend in Lysosomen lokalisiert sind, können in Tumorzellen Veränderungen der Expression, der Proteinreifung und des Proteintransports zu einer verstärkten Sekretion lysosomaler Proteine und so zu

einer unkontrollierten extrazellulären Proteolyse führen (Recklies AD et al., 1982; Sloane BF et al., 1981). Erhöhte Level an Kathepsin B, D, H und L wurde in Geweben primärer und metastasierender Tumoren bei vielen Krebstypen gefunden. In klinischen Studien von Brust-, Darm- und Lungentumoren wurde gezeigt, dass die Überexpression von verschiedenen Kathepsinen mit einer aggressiveren Tumorprogression und einer geringeren Überlebenschance der Patienten korreliert (Santamaria I et al., 1998a). Auch für das Melanom legen jüngste Daten einen Zusammenhang zwischen Kathepsin D und ungünstigem klinischen Verlauf nahe (Bartenjev I et al., 2000). Die Expression von Kathepsin Z und möglicherweise die Korrelation mit aggressivem Melanomwachstum ist dagegen eine ganz neue Beobachtung und muss diesbezüglich weiter validiert werden.

Allerdings werfen unsere Daten einige Fragen auf. Wir beobachteten eine Kathepsin Z-Überexpression in beiden Modellen für lokal-aggressives Wachstum, während die zunehmend metastasierenden Varianten gegenläufig eine Minderexpression im Rahmen der zunehmenden Metastasierungspotenz zeigten (Abb. 13). Denkbar wäre demnach eine Modellvorstellung, dass entsprechend der Funktion dieser Proteine ein lokal-aggressives Tumorwachstum, wie im Mausmodell von Bob Kerbel impliziert, begünstigt wird durch Überexpression, während die Metastasierung und erfolgreiche Absiedelung und Anheftung in die Lunge nicht oder gegensinnig durch Kathepsin Z moduliert wird und somit die Selektion gegenläufig verlaufen kann.

Expressionsanalysen bestätigen auch für Kathepsin Z eine weite Verbreitung, sowohl in normalen humanen Geweben, was dafür spricht, dass dieses Enzym wie die anderen Kathepsine in der normalen Proteindegredation in Normalgeweben eine Rolle spielt. Ob die in der hier vorgestellten Arbeit erstmals bestätigte Überexpression von Kathepsin Z in humanen Melanomlinien mit einer Sekretion in die Umgebung gekoppelt ist muss weiter in in situ-Zymographischen Experimenten zur Frage der in situ Lokalisation untersucht werden.

4.9. Targetvalidierung zur prognostisch-diagnostischen und therapeutischen Anwendung: Ausblick und experimentelle Neuansätze

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit erbrachten eine Fülle von, z.B. im Falle der sechs im Northern Blot bestätigten cDNAs, für sich interessanten und in der Gesamtheit hochrelevanten molekularen Expressionsmarker für die Progression des malignen Melanoms von benignen Phänotypen hin zu malignen, d.h. höhergradig lokal tumorigen, höhergradig invasiven, und höhergradig metastasierungspotenten biologischen Phänotypen.

Die tatsächliche Relevanz der überwiegend im in vitro Modell als potentielle Marker identifizierten Kandidatengene für die Diagnostik und Prognostik beim malignen Melanom muss in weiterführenden Arbeiten, z.B. durch Immunhistologie und in situ Hybridisierung an Gewebeschnitten melanozytärer Hauttumoren *in vivo* überprüft werden. Zudem können jetzt, unter Verwendung der seit einiger Zeit am Institut für Pathologie in Regensburg verfügbaren „Laserpinzette“, in verstärktem Maße aus Gewebeproben von melanozytären Nävi, Primärmelanomen und Melanommetastasen Tumorzellen weitgehend kontaminationsfrei präpariert werden. Anschließend kann mithilfe der ebenfalls jetzt an mehreren Abteilungen des Klinikums verfügbaren „light-cycler PCR“ im Sinne einer quantitativen PCR die differentielle Expression der Auswahl von Kandidatengenen weiter validiert werden.

Außerdem ist geplant, eine Sammlung der relevanten und potentiell relevanten Gene aus dieser und anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe auf einem Melanom-Array zusammenfassen und die Verwendbarkeit der Kandidatengene als progressionsrelevante Marker für die Melanomdiagnostik und Prognostik zu testen. Wie oben ausführlich dargestellt wurde, lassen sich sämtliche in der Literatur beschriebenen Expressionsmarker hier mit einschließen. Die benötigten EST-Klone werden vom Ressourcen Zentrum des Deutschen „Human Genome“-Projektes bezogen. Alle oben erwähnten Gene (ca. 100), welchen in der Literatur eine Bedeutung beigemessen wird, und alle von uns erarbeiteten Kandidaten (ca. 100), sollen zusammen auf den ersten Prototypen eines „Melanom-Arrays“ repräsentiert sein. Die Daten aus diesen Experimenten sollen im Zeitrahmen von etwa 2 Jahren zu einem patentierungsfähigen Diagnostik- und Prognostikarray führen.

Eine weitere Option, die sich aus der vorliegenden Arbeit ergibt, ist die Überprüfung der 22 in den drei untersuchten Progressionsmodellen erstmals beschriebenen Sequenzen. Die Frage ob sich unter diesen Sequenzen progressionsrelevante, differenzierungsspezifische bzw. melanozytenspezifische Gene befinden, soll mittels semiquantitativer RT-PCR an "multi-tissue" cDNA-Banken untersucht werden, mit dem Ziel weitere potentielle Marker für den diagnostisch-prognostischen Einsatz, möglicherweise auch als Serummarker taugliche melanomspezifische Marker, zu finden.

Weiterführende funktionelle Studien der im Northern Blot bestätigten Gene könnten zu tieferen Einblicken in die biologische Bedeutung von Osteonectin, MIF, NADH-Ubiquinone Oxidoreduktase, Ubiquitin und Kathepsin Z insbesondere im Kontext der Melanomprogression führen. So soll, wie oben erwähnt, untersucht werden, auf welche Art und Weise Osteonectin die Expression von Metalloproteinasen induzieren kann. Mithilfe von Yeast-two-Hybrid Experimenten könnte man z.B. mögliche Interaktionspartner im Falle einer Osteonectin-Überexpression aufspüren.

Ein weiteres Beispiel ist die in der vorliegenden Arbeit erstmals beobachtete Überexpression von Kathepsin Z in Zelllinien mit lokal aggressivem Tumorwachstum. Hier könnten Versuche mit Antisense-Konstrukten zeigen, ob durch eine Blockade der Kathepsin Z-Expression das lokale Wachstum von Melanomzellen inhibiert werden kann, um so die in dieser Arbeit erstmals gezeigte Korrelation zwischen der Kathepsin Z-Überexpression und einem lokal aggressiven Wachstum zu validieren.

Weitere Untersuchungen der Vernetzung des nach unseren Ergebnissen gestörten Ubiquitin-Proteasom-Pathways und der Überexpression des p53-antagonisierenden proinflammatorischen Zytokins MIF mit der Zellzykluskontrolle stellen weitere attraktive experimentelle Ansatzmöglichkeiten dar.

Die aus funktionellen Studien gewonnenen Kenntnisse können dazu beitragen, neue Therapieansätze beim malignen Melanom zu entwickeln, oder wie im Falle von NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase schon bei der Planung einer Therapie bei der Beurteilung der prospektiven Chancen eines Ansprechens einer Therapieform Bedeutung erlangen.

5. Zusammenfassung

Das maligne Melanom, ist ein überaus aggressiver Tumor der Haut, dessen klinische Relevanz aufgrund der weltweit stark ansteigenden Inzidenz und einer, trotz verbessertem Patientenmanagement ungebrochen hohen Mortalität stetig zunimmt.

Der wesentliche Mangel im klinischen Management dieses Tumors ist das Fehlen verlässlicher molekularer Marker für die Diagnostik und Prognostik, die sich bis zum heutigen Tag auf die klinische und histopathologische Beurteilung der melanozytären Hautläsionen stützt. Für die Mehrzahl der Tumoren ist dieser Weg zwar in der Praxis bisher ausreichend, aber die zunehmende Diversifizierung der therapeutischen Ansätzen und der Wunsch nach präziser Information mündiger Patienten ruft nach einer molekularbiologisch fundierten Klassifikation der Tumoren. Eine präzise Abgrenzung gutartiger, bösartiger, nicht-invasiver, invasiver, nicht-metastasierungsfähiger und metastasierungsfähiger melanozytärer Tumoren und Aussagen über therapeutische Ansatzmöglichkeiten im individuellen Fall, stellen eine große Herausforderung an die molekulare Medizin dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Erstellung einer expressionsgenetischen Studie am malignen Melanom, um

- a) einen Überblick über das Ausmaß der expressionsgenetischen Veränderungen im Zuge der Melanomprogression zu erhalten
- b) potentielle Marker zu finden, die einerseits die diagnostisch-prognostische Abgrenzung unterschiedlich progressiver Phänotypen des Melanoms erleichtern, andererseits eine effizientere Therapieplanung ermöglichen und darüber hinaus als molekulare "Targets" für neue Therapieansätze dienen könnten

Zahlreiche Indizien sprechen dafür, dass die Progression vom benignen melanozytären Nävus hin zum malignen, metastasierenden Melanom schrittweise erfolgt. Die dabei akkumulierten Veränderungen der Genexpression erfassen eine Vielzahl verschiedenster Aspekte der Tumorprogression, von der Zellproliferation über die Angiogenese bis hin zur Invasion und Metastasierung. Diesem Sachverhalt

wurde Rechnung getragen indem für die Suche nach expressionsgenetischen Markern des Melanoms in erster Linie drei Progressionsmodelle ausgewählt wurden, deren Zelllinien Unterschiede im lokalen Tumorwachstum, in der Invasionsfähigkeit und in der Metastasierungspotenz aufwiesen. Flankierend wurden Untersuchungen an mikrodissezierten Geweben humaner melanozytärer Tumoren durchgeführt.

Für die Untersuchung differentieller Genexpression in den Progressionsmodellen und in Gewebepräparaten von benignen und malignen Hauttumoren wurde zunächst eine dem Differential Display vergleichbare RNA-Fingerprint-Technik gewählt: die von J. Welsh und M. McClelland Anfang der 90er Jahre entwickelte RNA arbitrarily primed PCR, kurz RAP-PCR. Im Verlauf der Arbeit hat die cDNA-Array-Technologie eine bedeutsame Entwicklung erfahren und wurde nicht zuletzt aufgrund der Eigenschaft, die Expression von Tausenden von mRNAs schon bekannter Sequenz simultan untersuchen zu können, von uns als weitere Methode für die Studie der differentiellen Genexpression in den Progressionsmodellen hinzugezogen.

Sowohl die Ergebnisse des RNA-Fingerprintings als auch die Daten aus der Hybridisierung von cDNA-Arrays ergaben übereinstimmend, dass in den untersuchten Progressionsmodellen etwa 2% der erfassten Transkripte Unterschiede in der Expression aufwiesen, die sich im Rahmen der Selektion höhergradig aggressiver Phänotypen ereignen. Rechnet man dies hoch auf die mittlere Zahl von etwa 15.000 - 30.000 Transkriptspezies in einer Tumorzelle, bedeutet dies, dass wahrscheinlich mehrere hundert potentielle Melanom-Marker existieren, also ein reicher Fundus von Progressionsdeterminanten, die helfen könnten obigen Zielen einer Molekularpathologie des Melanoms näher zu kommen.

Mithilfe der RAP-PCR wurden dabei u.a. 22 neue, bis zu diesem Zeitpunkt in keinem anderen System beschriebene Sequenzen entdeckt und in der GenBank des N.C.B.I. bzw. E.M.B.L. veröffentlicht. In den cDNA-Array-Experimenten wurden darüber hinaus 41 cDNAs identifiziert, die hinsichtlich zunehmender Tumorigenität, zunehmender Invasivität oder gesteigerter Metastasierungsfähigkeit vermehrt oder vermindert (mindestens 2,5fach), also differentiell exprimiert wurden. Aus dieser Sammlung potentieller Progressionsmarker wurden sechs prominent regulierte Transkripte ausgewählt, da sie für sich besonders tumorrelevant erscheinen und/oder neue Aspekte der Melanomprogression beleuchten: Osteonectin, Ubiquitin,

MIF (macrophage migration inhibitory factor), PMEL17, NADH-Ubiquinone Oxidoreduktase und Kathepsin Z. Alle sechs Kandidaten konnten ohne Ausnahme in anschließenden Northern Blots bestätigt werden, was für eine hohe Effizienz der eingesetzten Techniken spricht. Sie bilden die Basis weiterführender, vertiefender Arbeiten und sind als potentielle Marker in der klinischen Anwendung interessant. Bei einem Teil dieser Gene ist die Progressionsrelevanz einer verstärkten Expression in verschiedenen Tumorentitäten und auch im Melanom zeitgleich von anderen Gruppen arbiträr aufgegriffen worden und bestätigt worden; beispielsweise für Osteonectin einen sezernierten Modulator der extrazellulären Matrix. Im Fall von Kathepsin Z, Ubiquitin, macrophage migration inhibitory factor (MIF), NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Überexpression in Melanomzelllinien und eine Korrelation mit aggressiveren Phänotypen dieser Zelllinien nachgewiesen und bestätigt werden. Letztere wurden ausgewählt, weil sich hierauf aufbauend ganz neue Ansätze in der Melanomforschung auftun.

Kathepsine sind wesentliche Faktoren in der peritumoralen Umstrukturierung der extrazellulären Matrix, Ubiquitin ein wesentlicher "Schalter" des beim Melanom bisher nicht untersuchten Proteasompathways, der für die Degradation einer Vielzahl von progressionshemmenden Proteinen verantwortlich ist, die Feststellung einer Überexpression von MIF stellt einen interessanten Link von der in Melanomen und dysplastischen Vorstufen typischen Entzündung zur Zellzykluskontrolle dar, die Überexpression von NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase impliziert mögliche neue Therapieansätze bei einem Subset der Melanome.

Insgesamt konnten in den hier vorgestellten Untersuchungen eine Fülle von für sich interessanten und in der Gesamtheit hochrelevanten molekularen Expressionsmarkern für die Progression des malignen Melanoms bereitgestellt werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus anderen Arbeiten unserer Arbeitgruppe bilden die hier gezeigten Daten die Grundlage zu einem möglicherweise patentierungsfähigen Diagnostik- und Prognostikarray für das Melanom. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden so möglicherweise zu einer verbesserten Diagnostik und Prognostik des malignen Melanoms beitragen und in jedem Fall zu vielversprechenden neuen experimentellen Ansätzen führen.

6. Literaturverzeichnis

- Albino A, Davis B, Nanus D. Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: markers of transformation. *Cancer Res* 1991; **51**: 4815-4820.
- Albino A, Shea C, McNutt N. Oncogenes in melanomas. *J Dermatol* 1992; **19**: 853-867.
- Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 6745-6750.
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**: 5350-5354.
- Anderlini P, Buzaid AC, Legha SS. Acute rhabdomyolysis after concurrent administration of interleukin-2, interferon-alfa, and chemotherapy for metastatic melanoma. *Cancer* 1995; **76**: 678-679.
- Bartenjev I, Rudolf Z, Stabuc B, Vrhovec I, Perkovic T, Kansky A. Cathepsin D expression in early cutaneous malignant melanoma. *Int J Dermatol* 2000; **39**: 599-602.
- Becker D, Lee P, Rodeck U, Herlyn M. Inhibition of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation. *Oncogene* 1992; **7**: 2303-2313.
- Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell- mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1991; **147**: 4398-4401.
- Becker JC, Czerny C, Brocker EB. Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10. *Int Immunol* 1994; **6**: 1605-1612.
- Bellahcene A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol* 1995; **146**: 95-100.
- Berk AJ, Sharp PA. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* 1977; **12**: 721-732.
- Bertucci F, Bernard K, Loriod B, Chang YC, Granjeaud S, Birnbaum D, Nguyen C, Peck K, Jordan BR. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples [published erratum appears in Hum Mol Genet 1999 Oct;8(11):2129]. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 1715-1722.
- Bingen EH, Weber M, Derelle J, Brahimi N, Lambert-Zechovsky NY, Vidailhet M, Navarro J, Elion J. Arbitrarily primed polymerase chain reaction as a rapid method to differentiate crossed from independent *Pseudomonas cepacia* infections in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 2589-2593.
- Bini L, Magi B, Marzocchi B, Arcuri F, Tripodi S, Cintorino M, Sanchez JC, Frutiger S, Hughes G, Pallini V, Hochstrasser DF, Tosi P. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis* 1997; **18**: 2832-2841.
- Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966; **153**: 80-82.

- Bogenrieder T, Landthaler M, Stolz W. [p16(INK4A)/CDKN2--the "melanoma gene"? Status of research and outlook]. *Hautarzt* 1998; **49**: 91-100.
- Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R, Stolz W, Buettner R. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res* 1997; **57**: 3149-3153.
- Boucherie H, Dujardin G, Kermorgant M, Monribot C, Slonimski P, Perrot M. Two-dimensional protein map of *Saccharomyces cerevisiae*: construction of a gene-protein index. *Yeast* 1995; **11**: 601-613.
- Braun-Falco O, Landthaler M, Holzel D, Konz B, Schmoeckel C. [Classification, diagnosis and differential diagnosis of malignant melanomas]. *Chirurg* 1986; **57**: 593-600.
- Bucala R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *Faseb J* 1996; **10**: 1607-1613.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995; **377**: 68-71.
- Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE, et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13- p22 [see comments]. *Science* 1992; **258**: 1148-1152.
- Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer [see comments]. *Nat Med* 1997; **3**: 227-230.
- Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; **29**: 705-727.
- Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; **15**: 1147-1165.
- Cowan J, Francke U. Cytogenetic analysis in melanoma and nevi. *Cancer Treat Res* 1991; **54**: 3-16.
- Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Brocker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin- receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology* 1994; **24**: 249-256.
- David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966; **56**: 72-77.
- de Martin R, Haendler B, Hofer-Warbinek R, Gaugitsch H, Wrann M, Schlusener H, Seifert JM, Bodmer S, Fontana A, Hofer E. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *Embo J* 1987; **6**: 3673-3677.
- Denton KJ, Stretch JR, Gatter KC, Harris AL. A study of adhesion molecules as markers of progression in malignant melanoma. *J Pathol* 1992; **167**: 187-191.
- Dinesh KR, Lim TM, Chua KL, Chan WK, Phang VP. RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zoolog Sci* 1993; **10**: 849-854.

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; **21**: 10-14.

Dulac C. Cloning of genes from single neurons. *Curr Top Dev Biol* 1998; **36**: 245-258.

Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, Zettel M, Coleman P. Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 3010-3014.

Faassen A, Mooradian D, Tranquillo R, Dickinson R, Letourneau P, Oegema T, McCarthy J. Cell surface CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan is required for transforming growth factor-beta-stimulated mouse melanoma cell motility and invasive behavior on type I collagen. *J Cell Sci* 1993; **105 (Pt 2)**: 501-511.

Fang N, Casida JE: Anticancer action of cube insecticide: correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH:ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**:3380-3384

Farmer E, Gonin R, Hanna M. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between expert pathologists. *Human Pathol.* 1996; **27**: 528-531.

Goldberg G, Frisch S, He C, Wilhelm S, Reich R, Collier I. Secreted proteases. Regulation of their activity and their possible role in metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 1990; **580**: 375-384.

Grigorieff N. Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) [see comments]. *Curr Opin Struct Biol* 1999; **9**: 476-483.

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

Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer KJ, Richman DD, Gingeras TR. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Oct;87(19):7797]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**: 1874-1878.

Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape [see comments]. *Science* 1996; **274**: 1363-1366.

Halaban R, Bohm M, Dotto P, Moellmann G, Cheng E, Zhang Y. Growth regulatory proteins that repress differentiation markers in melanocytes also downregulate the transcription factor microphthalmia. *J Invest Dermatol* 1996; **106**: 1266-1272.

Hanawalt PC. Transcription-coupled repair and human disease. *Science* 1994; **266**: 1957-1958.

Hart IR, Fidler IJ. Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res* 1980; **40**: 2281-2287.

Hasselaar P, Loskutoff DJ, Sawdey M, Sage EH. SPARC induces the expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13178-13184.

Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 1996; **271**: 1861-1864.

- Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, Hirohashi S, Takeichi M. Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* 1992; **70**: 293-301.
- Hochstrasser M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 215-223.
- Houde M, de BG, Bracke M, Ingelman-Sundberg M, Skoglund G, Masure S, van DJ, Opdenakker G. Differential regulation of gelatinase B and tissue-type plasminogen activator expression in human Bowes melanoma cells. *Int J Cancer* 1993; **53**: 395-400.
- Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996; **1**: 188-194.
- Iruela-Arispe ML, Hasselaar P, Sage H. Differential expression of extracellular proteins is correlated with angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 1991; **64**: 174-186.
- Jacob K, Bosserhoff A, Wach F, Knuchel R, Klein E, Hein R, Buettner R. Characterization of selected strongly and weakly invasive sublines of a primary human melanoma cell line and isolation of subtractive cDNA clones. *Int J Cancer* 1995; **60**: 668-675.
- Jena PK, Liu AH, Smith DS, Wysocki LJ. Amplification of genes, single transcripts and cDNA libraries from one cell and direct sequence analysis of amplified products derived from one molecule. *J Immunol Methods* 1996; **190**: 199-213.
- Johnson J, Stade B, Holzmann B, Schwable W, Riethmuller G. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 641-644.
- Johnson J, Rothbacher U, Sers C. The progression associated antigen MUC18: a unique member of the immunoglobulin supergene family. *Melanoma Res* 1993; **3**: 337-340.
- Keis S, Bennett CF, Ward VK, Jones DT. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *Int J Syst Bacteriol* 1995; **45**: 693-705.
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996; **274**: 1652-1659.
- Kobayashi H, Man S, MacDougall J, Graham C, Lu C, Kerbel R. Variant sublines of early-stage human melanomas selected for tumorigenicity in nude mice express a multicytokine-resistant phenotype. *Am. J. Pathol.* 1994; **144**: 776-786.
- Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 1989; **5**: 483-525.
- Kozlowski JM, Hart IR, Fidler IJ, Hanna N. A human melanoma line heterogeneous with respect to metastatic capacity in athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1984; **72**: 913-917.
- Kwoh DY, Davis GR, Whitfield KM, Chappelle HL, DiMichele LJ, Gingeras TR. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 1173-1177.
- Kwon BS, Halaban R, Kim GS, Usack L, Pomerantz S, Haq AK. A melanocyte-specific complementary DNA clone whose expression is inducible by melanotropin and isobutylmethyl xanthine. *Mol Biol Med* 1987; **4**: 339-355.
- Kwon BS. Pigmentation genes: the tyrosinase gene family and the pmel 17 gene family. *J Invest Dermatol* 1993; **100**: 134S-140S.

- Lane TF, Sage EH. Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca⁺(+)-binding sites modulate cell shape. *J Cell Biol* 1990; **111**: 3065-3076.
- Lebech AM, Hansen K, Wilske B, Theisen M. Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1994; **183**: 325-341.
- Ledda F, Bravo AI, Adris S, Bover L, Mordoh J, Podhajcer OL. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* 1997; **108**: 210-214.
- Ledda MF, Adris S, Bover L, Bravo AL, Mordoh J, Podhajcer OL. [The role of SPARC gene in tumorigenic capacity of human melanoma cells]. *Medicina* 1996; **56**: 51-54.
- Ledda MF, Adris S, Bravo AI, Kairiyama C, Bover L, Chernajovsky Y, Mordoh J, Podhajcer OL. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* 1997; **3**: 171-176.
- Lee ZH, Hou L, Moellmann G, Kuklinska E, Antol K, Fraser M, Halaban R, Kwon BS. Characterization and subcellular localization of human Pmel 17/silver, a 110-kDa (pre)melanosomal membrane protein associated with 5,6,-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) converting activity. *J Invest Dermatol* 1996; **106**: 605-610.
- Liang P, Pardee A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [see comments]. *Science* 1992; **257**: 967-971.
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gineras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1999; **21**: 20-24.
- Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; **405**: 827-836.
- Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas [see comments]. *Nat Med* 1997; **3**: 231-234.
- Logan A, Weatherhead B. Post-tyrosinase inhibition of melanogenesis by melatonin in hair follicles in vitro. *J Invest Dermatol* 1980; **74**: 47-50.
- Lohmann CP, Kroher G, Bogenrieder T, Spiegel D, Preuner J. Severe loss of vision during adjuvant interferon alfa-2b treatment for malignant melanoma [letter]. *Lancet* 1999; **353**: 1326.
- MacGeoch C, Bishop JA, Bataille V, Bishop DT, Frischau AM, Meloni R, Cuzick J, Pinney E, Spurr NK. Genetic heterogeneity in familial malignant melanoma. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 2195-2200.
- Maelandsmo G, Florenes V, Hovig E, Oyjord T, Engebraaten O, Holm R, Borresen A, Fodstad O. Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. *Br J Cancer* 1996; **73**: 909-916.
- Maillard C, Malaval L, Delmas PD. Immunological screening of SPARC/Osteonectin in nonmineralized tissues. *Bone* 1992; **13**: 257-264.
- Mann M. Quantitative proteomics? [news]. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 954-955.
- Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol* 1999; **30**: 339-344.

- Mathieu Daude F, Cheng R, Welsh J, McClelland M. Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single stranded conformation polymorphism (SSCP) gels. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 1504-1507.
- Mathieu-Daude F, Welsh J, Vogt T, McClelland M. DNA rehybridization during PCR: the 'cot effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 2080-2086.
- McClelland M, Chada K, Welsh J, Ralph D. Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA applied to mapping differentially expressed genes. *Exs* 1993; **67**: 103-115.
- McClelland M, Ralph D, Cheng R, Welsh J. Interactions among regulators of RNA abundance characterized using RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 4419-4431.
- McClelland M, Mathieu-Daude F, Honeycutt R, Vogt T, JW (1997) RNA Arbitrarily primed PCR. In: Liang P, AB P (eds) in press
- Montgomery AM, Reisfeld RA, Cheresh DA. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 8856-8860.
- Murphy-Ullrich JE, Lane TF, Pallero MA, Sage EH. SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca(2+)-binding EF-hand. *J Cell Biochem* 1995; **57**: 341-350.
- Nachbar F, Stolz W, Merkle T, Cognetta AB, Vogt T, Landthaler M, Bilek P, Braun-Falco O, Plewig G. The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 1994; **30**: 551-559.
- Nelson MA, Thompson FH, Emerson J, Aickin M, Adair L, Trent JM, Leong SP, Taetle R. Clinical implications of cytogenetic abnormalities in melanoma. *Surg Clin North Am* 1996; **76**: 1257-1271.
- Netland PA, Zetter BR. Organ-specific adhesion of metastatic tumor cells in vitro. *Science* 1984; **224**: 1113-1115.
- Nishihira J, Koyama Y, Mizue Y. Identification of macrophage migration inhibitory factor in human leukemia HL-60 cells and its induction by lipopolysaccharide. *Biochem Mol Biol Int* 1996; **40**: 861-869.
- Nishihira J. Novel pathophysiological aspects of macrophage migration inhibitory factor (review). *Int J Mol Med* 1998; **2**: 17-28.
- Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth [In Process Citation]. *J Interferon Cytokine Res* 2000; **20**: 751-762.
- Ohta M, Nagai H, Shimizu M, Rasio D, Berd D, Mastrangelo M, Singh AD, Shields JA, Shields CL, Croce CM, et al. Rarity of somatic and germline mutations of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, CDK4I, in melanoma. *Cancer Res* 1994; **54**: 5269-5272.
- Orioli D, Klein R. The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion. *Trends Genet* 1997; **13**: 354-359.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 [see comments]. *Science* 1995; **269**: 682-685.

- Pahl HL, Baeuerle PA. Control of gene expression by proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 340-347.
- Peinado MA, Makhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 10065-10069.
- Perucho M, Welsh J, Peinado MA, Ionov Y, McClelland M. Fingerprinting of DNA and RNA by arbitrarily primed polymerase chain reaction: applications in cancer research. *Methods Enzymol* 1995; **254**: 275-290.
- Porte H, Chastre E, Prevot S, Nordlinger B, Empereur S, Basset P, Chambon P, Gespach C. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer* 1995; **64**: 70-75.
- Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SE, Gown AM. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem* 1995; **43**: 791-800.
- Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients [see comments]. *Nat Med* 1997; **3**: 222-225.
- Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1980; **283**: 139-146.
- Ralph D, McClelland M, Welsh J. RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR identifies differentially regulated RNAs in mink lung (Mv1Lu) cells growth arrested by transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 10710-10714.
- Ray J, Stetler-Stevenson W. Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading. *EMBO J* 1995; **14**: 908-917.
- Recklies AD, Poole AR, Mort JS. A cysteine proteinase secreted from human breast tumours is immunologically related to cathepsin B. *Biochem J* 1982; **207**: 633-636.
- Reed J, Loganzo FJ, Shea C, Walker G, Flores J, Glendening J, Bogdany J, Shiel M, Haluska F, Fountain J, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995; **55**: 2713-2718.
- Reinhold U, Hartl C, Hering R, Hoeft A, Kreysel HW. Fatal rhabdomyolysis and multiple organ failure associated with adjuvant high-dose interferon alfa in malignant melanoma [letter]. *Lancet* 1997; **349**: 540-541.
- Rigel DS, Friedman RJ. The rationale of the ABCDs of early melanoma [letter; comment]. *J Am Acad Dermatol* 1993; **29**: 1060-1061.
- Rodeck U, Melber K, Kath R, Menssen H, Varello M, Atkinson B, Herlyn M. Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. *J Invest Dermatol* 1991; **97**: 20-26.
- Sage H, Vernon RB, Funk SE, Everitt EA, Angello J. SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989; **109**: 341-356.
- Sager R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 1989; **246**: 1406-1412.

- Sager R, Sheng S, Anisowicz A, Sotiropoulou G, Zou Z, Stenman G, Swisshelm K, Chen Z, Hendrix MJ, Pemberton P, et al. RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; **59**: 537-546.
- Sager R. Expression genetics in cancer: Shifting the focus from DNA to RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; **94**: 952-955.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Santamaria I, Velasco G, Cazorla M, Fueyo A, Campo E, Lopez-Otin C. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1998a; **58**: 1624-1630.
- Santamaria I, Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Lopez-Otin C. Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* 1998b; **273**: 16816-16823.
- Sarantou T, Chi DD, Garrison DA, Conrad AJ, Schmid P, Morton DL, Hoon DS. Melanoma-associated antigens as messenger RNA detection markers for melanoma. *Cancer Res* 1997; **57**: 1371-1376.
- Schackert G, Price JE, Zhang RD, Bucana CD, Itoh K, Fidler IJ. Regional growth of different human melanomas as metastases in the brain of nude mice. *Am J Pathol* 1990; **136**: 95-102.
- Schafer M, Messer T, Wegner U, Schmid-Wendtner MH, Volkenandt M. [Psychiatric side effects during adjuvant therapy with interferon-alpha in patients with malignant melanoma. Clinical evaluation as well as diagnostic and therapeutic possibilities]. *Hautarzt* 1999; **50**: 654-658.
- Scheibenbogen C, Mohler T, Haefele J, Hunstein W, Keilholz U. Serum interleukin-8 (IL-8) is elevated in patients with metastatic melanoma and correlates with tumour load. *Melanoma Res* 1995; **5**: 179-181.
- Schena M, Shalon D, Davis R, Brown P. Quantitative Monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; **270**: 467-470.
- Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D, Ewen ME, Rollins BJ. Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1995; **55**: 6200-6209.
- Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 1989; **49**: 2128-2133.
- Singh R, Gutman M, Reich R, Bar-Eli M. Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous malignant melanoma via induction of interleukin 8. *Cancer Res* 1995; **55**: 3669-3674.
- Sloane BF, Dunn JR, Honn KV. Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. *Science* 1981; **212**: 1151-1153.
- Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bomblet J, Spatz A, Stoppa-Lyonnet D, Benard J, Bressac-de Paillerets B. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1998 May;7(5):941]. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 209-216.
- Southern E, Mir K, Shchepinov M. Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* 1999; **21**: 5-9.

- Spataro V, Norbury C, Harris AL. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br J Cancer* 1998; **77**: 448-455.
- Stolz W, Vogt T, Landthaler M, Hempfer S, Bingler P, Abmayr W. Differentiation between malignant melanoma and benign melanocytic nevi by computerized DNA cytometry of imprint specimens. *J. Cutan. Pathol.* 1994; **121**: 7-15.
- Stolz W, Schiffner R, Pillet L, Vogt T, Harms H, Schindewolf T, Landthaler M, Abmayr W. Improvement of monitoring of melanocytic skin lesions with the use of a computerized acquisition and surveillance unit with a skin surface microscopic television camera. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996; **35**: 202-207.
- Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, Une Y, Todo S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 1998; **4**: 707-714.
- Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991; **251**: 1451-1455.
- Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* 1993; **121**: 1433-1444.
- Trenkle T, Welsh J, Jung B, Mathieu-Daude F, McClelland M. Non-stoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 3883-3891.
- van Duinen CM, van den Broek LJ, Vermeer BJ, Fleuren GJ, Bruijn JA. The distribution of cellular adhesion molecules in pigmented skin lesions. *Cancer* 1994; **73**: 2131-2139.
- Velculescu V, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler K. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995; **270**: 484-487.
- Vernon RB, Sage EH. Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. *Am J Pathol* 1995; **147**: 873-883.
- Vogt T, Stolz W, Welsh J, Jung B, Kerbel RS, Kobayashi H, Landthaler M, McClelland M. Overexpression of Lerk-5/Eplg5 messenger RNA: a novel marker for increased tumorigenicity and metastatic potential in human malignant melanomas. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 791-797.
- Vogt T, Kroiss M, McClelland M, Gruss C, Becker B, Bosserhoff AK, Rumpler G, Bogenrieder T, Landthaler M, Stolz W. Deficiency of a novel retinoblastoma binding protein 2-homolog is a consistent feature of sporadic human melanoma skin cancer. *Lab Invest* 1999; **79**: 1615-1627.
- Vogt T, Welsh J, Stolz W, Kullmann F, Jung B, Landthaler M, McClelland M. RNA fingerprinting displays UVB-specific disruption of transcriptional control in human melanocytes. *Cancer Res* 1997; **57**: 3554-3561.
- Vogt T, Mathieu-Daude F, Kullmann F, Welsh J, McClelland M (1997) Arbitrarily primed PCR of DNA and RNA. In: Caetano-Anolles G, PM G (eds) DNA Markers: Applications and Overviews. J. Wiley & Sons, Inc., pp 202-255
- Volkenandt M, Schmidt M, Konz B, Gummer M, Hein R, Plewig G, Holzel D. [Clinical and epidemiological data of patients with malignant melanoma from the Munich Tumor Center 1977-1997]. *Hautarzt* 1999; **50**: 470-478.

- Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID, Fountain JW. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; **22**: 157-163.
- Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Apr;87(7):2865]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 9717-9721.
- Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB [see comments]. *Science* 1996; **274**: 784-787.
- Wang Y, Becker D. Differential expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p16 and p21 in the human melanocytic system. *Oncogene* 1996; **12**: 1069-1075.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990; **18**: 7213-7218.
- Welsh J, McClelland M. Genomic fingerprinting with AP-PCR using pairwise combinations of primers: Application to genetic mapping of the mouse. *Nucleic Acids Res.* 1991; **19**: 5275-5279.
- Welsh J, Petersen C, McClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: Application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res.* 1991; **19**: 303-306.
- Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* 1992a; **20**: 4965-4970.
- Welsh J, Pretzman C, Postic D, Saint Girons I, Baranton G, McClelland M. Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups. *Int J Syst Bacteriol* 1992b; **42**: 370-377.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 6531-6535.
- Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999; **47**: 1495-1506.
- Yao R, Cooper GM. Regulation of the Ras signaling pathway by GTPase-activating protein in PC12 cells. *Oncogene* 1995; **11**: 1607-1614.

7. Anhang

Abkürzungen

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
CPM	Counts Per Minute
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
ds-cDNA	double strand cDNA
ECM	Extra Cellular Matrix
FKS	Fötales Kälber Serum
HE	Hämalaun/Eosin
I.M.A.G.E.	Integrated Molecular Analysis of Genome Expression
kB	Kilobasen
LB	Luria-Bertani (Medium)
M	molar
Mbp	Megabasenpaare
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate-Buffered Saline
s.c	subcutan
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sek.	Sekunden
SSC	Sodium Chloride/Sodium Citrate
ss-cDNA	single strand cDNA
TE	Tris-EDTA
U	Units

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danken möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Landthaler für die Möglichkeit diese Dissertation an der Dermatologischen Klinik der Universität Regensburg durchzuführen zu können.

Herrn Prof. Dr. R. Schmitt möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die Begutachtung der Dissertation und die Bereitschaft, diese Arbeit vor der naturwissenschaftlichen Fakultät III zu vertreten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Vogt für die Überlassung eines höchst interessanten Themas in der Tumorforschung. Er war ein hervorragender Betreuer der Promotionsarbeit, der mich in jeder Phase dieser Dissertation unermüdlich und mit Geduld unterstützt hat.

Herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. A.-K. Bosserhoff für die Bereitstellung von RNA-Material aus Varianten der Melanomlinie Mel-Im.

Meinen ehemaligen und jetzigen Laborkolleginnen und Kollegen, allen voran Petra Weiderer, Dörte Rochelt und Bernd Becker danke ich ganz herzlich für die Hilfsbereitschaft und für das hervorragende Arbeitsklima. Ihr ward wie eine Familie und es war toll mit euch zu arbeiten.

Darüber hinaus bedanke ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Dermatologischen Klinik für ihre Hilfe und Kollegialität.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich mich auch ganz besonders bei Herrn Dr. A. Glässl bedanken, der mich auf die Arbeitsgruppe an der Dermatologischen Klinik aufmerksam gemacht und damit die Durchführung dieser Dissertation sozusagen in die Wege geleitet hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die Unterstützung, die sie mir während der gesamten Zeit gegeben haben.

Hiermit erkläre ich, daß diese Arbeit von mir selbstständig verfaßt wurde und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel zur Anwendung kamen.

Regensburg, im Februar 2001

Gerhard Rumpler