

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie
und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

**Expression von Nestin und Osteopontin in
Melanomzelllinien und die Rolle der Transkriptionsfaktoren
BRN2, SOX9 und SOX10**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anna Flammiger
aus Bad Oldesloe
2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Carola Berking

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Hermeking
Prof. Dr. Wilhelm Stolz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen
Prüfung: 03.12.2009

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in einer Kooperation des Labors für Tumorbiologie (Leiterin: Prof. Dr. med. Carola Berking) der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Prof. Dr. Richard Sturm, University of Queensland, Brisbane, Australien im Zeitraum von 2006 bis 2008 erarbeitet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Malignes Melanom	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Klinische Subtypen und histopathologische Progressionsformen.....	1
1.2 Embryonalentwicklung der Melanozyten	3
1.3 Transkriptionelle Regulation in Melanozyten und Melanomzellen	4
1.3.1 POU-Domäne-Transkriptionsfaktoren.....	4
1.3.1.1 Der Transkriptionsfaktor BRN2.....	5
1.3.2 Sry-box-Transkriptionsfaktoren.....	7
1.3.2.1 Der Transkriptionsfaktor SOX9.....	8
1.3.2.2 Der Transkriptionsfaktor SOX10.....	9
1.4 Osteopontin als Zielgen von POU-Transkriptionsfaktoren	10
1.4.1 Struktur und Funktion von Osteopontin	10
1.4.2 Regulation des Osteopontin-Gens durch POU-Transkriptionsfaktoren.....	11
1.5 Nestin als Zielgen von POU- und SOX-Transkriptionsfaktoren	12
1.5.1 Das Intermediärfilament Nestin	12
1.5.2 Aktivierung des Nestin-Enhancers durch POU- und SOX-Transkriptionsfaktoren...	14
1.6 Fragestellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Geräte	16
2.2 Zelllinien und primäre Zellen	17
2.2.1 Melanomzelllinien	17
2.2.2 Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten.....	18
2.2.3 Knochenmarkzellen	18
2.3 Material	18
2.3.1 Zellkultur	18
2.3.2 Proteinisolierung und Western Blot.....	20
2.3.3 Immunhistochemie.....	22
2.3.4 Immunfluoreszenz	23

2.3.5 RNA-Isolation und RT-PCR	24
2.3.6 Transfektion mit siRNA	25
2.3.7 Bestimmung der Zellproliferation	25
2.4 Methoden.....	26
2.4.1 Zellkultur	26
2.4.2 Proteinisolierung.....	26
2.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	27
2.4.4 Western Blot	27
2.4.5 Immunhistochemische Färbung von humanem Melanomgewebe	29
2.4.6 Immunfluoreszenzfärbung von Melanomzellen	30
2.4.7 RNA-Isolation	31
2.4.8 RNA-Konzentrationsbestimmung	32
2.4.9 RT-PCR in zwei Schritten.....	32
2.4.9.1 Synthese der cDNA	32
2.4.9.2 Quantitative Real Time RT-PCR.....	33
2.4.10 Transfektion mit siRNA	36
2.4.11 Bestimmung der Zellproliferation	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Expression von BRN2 in Melanomzelllinien	38
3.1.1 mRNA-Expression von BRN2.....	38
3.1.2 Proteinexpression von BRN2.....	39
3.2 Expression von OPN in Melanomzelllinien	40
3.2.1 mRNA-Expression von OPN.....	40
3.2.2 Proteinexpression von OPN	41
3.2.3 Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von OPN.....	42
3.3 Die Rolle von BRN2 für die Expression von OPN.....	43
3.3.1 Korrelation der Expression von BRN2 und OPN	43
3.3.2 Inhibition der Expression von BRN2 in Melanomzelllinien	45
3.3.3 Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Expression von OPN.....	46
3.4 Expression von Nestin in Melanomzelllinien	48
3.4.1 mRNA-Expression von Nestin	48
3.4.2 Proteinexpression von Nestin	49
3.4.3 Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Nestin.....	49

3.5 Die Rolle von BRN2 für die Expression von Nestin	50
3.5.1 Korrelation der Expression von BRN2 und Nestin	50
3.5.2 Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Expression von Nestin	52
3.6 Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Zellproliferation	54
3.7 Koexpression von SOX9 und SOX10 mit Nestin im malignen Melanom	55
3.8 Die Rolle von SOX9 und SOX10 für die Expression von Nestin	57
3.8.1 Inhibition der Expression von SOX9 und SOX10 in Melanomzelllinien	57
3.8.2 Effekt der Inhibition von SOX9 und SOX10 auf die Expression von Nestin	59
4. Diskussion	61
4.1 Die Rolle von BRN2 im malignen Melanom.....	61
4.2 Die Rolle von SOX9 und SOX10 im malignen Melanom.....	67
4.3 Ausblick.....	69
5. Zusammenfassung	70
6. Literaturverzeichnis	72
7. Danksagung	81
8. Curriculum vitae	83

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AGO2	Argonaute 2
AJCC	Amerikanisches Komitee für Tumorerkrankungen (<i>American Joint Committee on Cancer</i>)
bFGF	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
BPE	Rinderhypophysenextrakt (<i>bovine pituitary extract</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
cDNA	Kopierte DNA (<i>copy DNA</i>)
CO	Kontroll-Oligonukleotid (<i>control oligonucleotide</i>)
Cy	Cyanin Farbstoff
d	Tag (<i>day</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA (<i>double stranded DNA</i>)
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ET-3	Endothelin-3
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (<i>fibroblast growth factor-2</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
G	Guanin
h	Stunde (<i>hour</i>)
HBSS	Hanks' Salzlösung (<i>Hanks' balanced salt solution</i>)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase

HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rEGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>recombinant epidermal growth factor</i>)
RGP	Radiäre Wachstumsphase (<i>radial growth phase</i>)
RISC	Komplex aus RNA- und Proteinanteilen (<i>RNA-inducing silencing complex</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SFM	Nährmedium ohne Zusatz von Serum (<i>serum free medium</i>)
siRNA	21 bis 28 Nukleotide lange doppelsträngige RNA Moleküle (<i>small interfering RNA</i>)
T	Thymin
T _m	Charakteristische Schmelztemperatur eines dsDNA Moleküls
TU 2%	Tumormedium mit 2% FKS
U	Uracil
UK	Großbritannien (<i>United Kingdom</i>)
VGP	Vertikale Wachstumsphase (<i>vertical growth phase</i>)
WB	Western Blot

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1:** Melanomentstehung über verschiedene Wachstumsphasen
- Abbildung 1.2:** POU Domäne mit der POU-spezifischen- und POU-Homeodomäne, verbunden durch die Linker-Region
- Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten
- Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der 258 bp langen Enhancer-Sequenz im zweiten Intron des Nestin.Gens mit SOX- und POU Bindestellen
- Abbildung 1.5:** OPN als mögliches Zielgen von BRN2. Nestin als mögliches Zielgen von BRN2 und den SOX-Transkriptionsfaktoren SOX9 und SOX10
- Abbildung 3.1:** mRNA-Expression von BRN2 in Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstufen
- Abbildung 3.2:** Proteinexpression von BRN2 in Melanozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und verschiedenen Melanomzelllinien
- Abbildung 3.3:** mRNA-Expression von OPN in Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstufen
- Abbildung 3.4:** Proteinexpression von OPN in Melanozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und verschiedenen Melanomzelllinien
- Abbildung 3.5:** Immunfluoreszenzdarstellung von OPN in den Melanomzelllinien WM278 und 1205Lu
- Abbildung 3.6:** Vergleich der Expression von BRN2 und OPN auf mRNA- und Proteinebene
- Abbildung 3.7:** Inhibition der Expression von BRN2 mit siRNA in den Zelllinien 1205Lu, WM9 und WM278
- Abbildung 3.8:** Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Expression von OPN auf mRNA- und Proteinebene
- Abbildung 3.9:** mRNA-Expression von Nestin in Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstufen
- Abbildung 3.10:** Proteinexpression von Nestin in Melanozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und verschiedenen Melanomzelllinien

- Abbildung 3.11:** Immunfluoreszenzdarstellung von Nestin in der Melanomzelllinie 1205Lu
- Abbildung 3.12:** Vergleich der Expression von BRN2 und Nestin auf mRNA- und Proteinebene
- Abbildung 3.13:** Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Expression von Nestin auf mRNA- und Proteinebene
- Abbildung 3.14:** BRN2 erhöht die Proliferation in der metastatischen Melanomzelllinie WM9
- Abbildung 3.15:** Immunhistochemische Darstellung der Expression von SOX9, SOX10 und Nestin in Melanomgewebeschnitten zweier unterschiedlicher Primärtumoren der Haut
- Abbildung 3.16:** Inhibition der Expression von SOX9 und SOX10 mit siRNA in den Zelllinien 1205Lu, WM793 und WM239A
- Abbildung 3.17:** Effekt der Inhibition von SOX9 und SOX10 auf die Expression von Nestin auf mRNA- und Proteinebene in den Melanomzelllinien 1205Lu, WM793 und WM239A

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Häufige klinische Subtypen des malignen Melanoms

Tabelle 1.2: Derivate des Ektoderms

Tabelle 1.3: Familie der POU-Transkriptionsfaktoren

Tabelle 1.4: Familie der SOX-Transkriptionsfaktoren

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Melanomzelllinien

Tabelle 2.2: Antikörper für den Western Blot

Tabelle 2.3: Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 2.4: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen

Tabelle 2.5: Primer Sequenzen für die SYBR Green I PCR

Tabelle 2.6: Primer Sequenzen für die Sonden PCR

Tabelle 2.7: siRNA Sequenzen

Tabelle 2.8: Protokoll für die SYBR Green I PCR

Tabelle 2.9: Protokoll für die Sonden PCR

1. Einleitung

1.1 Malignes Melanom

1.1.1 Definition

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der von den pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, ausgeht und sich überwiegend an der Haut manifestiert. Selten kommt das Melanom auch am Auge, an den Hirnhäuten und an Schleimhäuten verschiedener Lokalisation vor. Das Melanom ist zumeist stark pigmentiert, aber es gibt auch amelanotische Formen. Im Verhältnis zur Tumormasse besteht eine frühe Tendenz zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung, die mit einer sehr schlechten Prognose verbunden ist (Garbe, 2007).

1.1.2 Epidemiologie

Die Melanominzidenz hat in der hellhäutigen Bevölkerung während der letzten 30-40 Jahre weltweit stark zugenommen (Garbe et al., 2009). In Mitteleuropa betrug die Inzidenz im Jahr 2000 10-15 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr (Garbe et al., 2009). Die höchsten Inzidenzen werden mit 40-60 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr in Australien und Neuseeland registriert (Garbe et al., 2009).

Risikofaktoren für die Entstehung eines malignen Melanoms sind eine positive Familienanamnese, multiple benigne oder atypische Nävi, ein malignes Melanom in der Eigenanamnese, Immunsuppression, ein sonnenempfindlicher Hauttyp und UV-Exposition (Miller et al., 2006). Besonders eine intermittierende, hohe UV-Exposition ist mit einem erhöhten Melanomrisiko assoziiert (Chudnovsky et al., 2005). Neuere Daten weisen zudem darauf hin, dass nicht nur UV-B Strahlen sondern auch UV-A Strahlen (Sonnenstudios) das Melanomrisiko erhöhen können (Volkenandt, 2005).

1.1.3 Klinische Subtypen und histopathologische Progressionsformen

Klinisch wird das Melanom anhand der vorherrschenden Wachstumsform und der anatomischen Lokalisation unterschieden (Tabelle 1.1).

Histopathologisch kann man die Melanomentstehung anhand bestimmter Wachstumsphasen beschreiben (Miller et al., 2006; Abbildung 1.1). Der erste Schritt ist die Proliferation von strukturell unauffälligen Melanozyten entlang der Basalmembran und die Entstehung eines gutartigen Nävus. In einem zweiten Schritt

entwickeln sich entweder auf klinisch unauffälliger Haut oder innerhalb eines bereits bestehenden Nävus zelluläre Atypien und unregelmäßiges Wachstum, was sich klinisch in Asymmetrie, unregelmäßiger Begrenzung, Mehrfarbigkeit und wachsendem Durchmesser zeigen kann. Man spricht von einem dysplastischen Nävus. In einem dritten Schritt proliferieren die atypischen Zellen in der Epidermis. Diese Phase bezeichnet man auch als die horizontale oder radiäre Wachstumsphase (engl. radial growth phase = RGP). In einem vierten Schritt kommt es zum vertikalen Wachstum der Tumorzellen mit Invasion der Dermis, der vertikalen Wachstumsphase (engl. vertical growth phase = VGP). Im fünften und letzten Schritt bilden die Tumorzellen Metastasen in der Haut und in den inneren Organen.

Als ungünstiger prognostischer Faktor in Hinblick auf die Tumorprogression gilt der Übergang von der radiären zur vertikalen Wachstumsphase (Chudnovsky et al., 2005).

Tabelle 1.1: Häufige klinische Subtypen des malignen Melanoms (modifiziert nach Chudnovsky et al., 2005)

Subtyp	Häufigkeit (%)	Häufige Lokalisationen	Charakteristika
Superfiziell spreitendes malignes Melanom (SSM)	65	Männer: Rumpf Frauen: Beine	Radiäre Wachstumsphase ca. 1-5 Jahre
Noduläres malignes Melanom (NMM)	20	Männer: Rumpf Frauen: Beine	Radiäre Wachstumsphase ca. 6-18 Monate
Lentigo Maligna Melanom (LMM)	10	Gesicht und Nacken	Ältere Patienten, chronische UV Exposition, lange radiäre Wachstumsphase (ca. 3-15 Jahre)
Akrolentiginöses malignes Melanom (AMM)	5	Handflächen, Fußsohlen und Nägel	30-70% aller Melanome bei dunklen Hauttypen

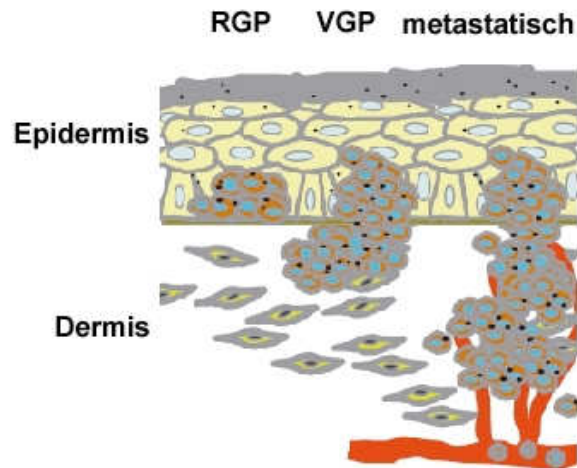


Abbildung 1.1: Melanomentstehung über verschiedene Wachstumsphasen (modifiziert nach Gaggioli et al., 2007). Radiäre Wachstumsphase (RGP), vertikale Wachstumsphase (VGP) und metastasiertes Melanom (metastatisch).

1.2 Embryonalentwicklung der Melanozyten

Die Melanozyten entstammen ontogenetisch der Neuralleiste, die aus dem Ektoderm (Tabelle 1.2) hervorgeht und auch Ursprungsort von Spinalganglienzellen, vegetativen Ganglienzellen des Grenzstrangs, Neuronen des enterischen Nervensystems, Schwannzellen und Zellen des Nebennierenmarks ist (Hong et al., 2005; Sadler, 2008). In der späten Embryonalperiode wandern die Vorläuferzellen der Melanozyten in die sich entwickelnde Dermis ein und differenzieren sich zu Melanoblasten (Moore et al., 2007b). Sie dringen in die Basalschicht der Epidermis ein, beginnen intrazelluläre Pigmentkörner zu bilden und werden dann als Melanozyten bezeichnet (Moore et al., 2007b).

Tabelle 1.2: Derivate des Ektoderms (modifiziert nach Moore et al., 2007a)

Zentrales Nervensystem
 Peripheres Nervensystem
 Sinneszellen von Auge, Ohr und Nase
 Hypophyse
 Haut und Hautanhangsgebilde
 Brustdrüse
 Unterhautdrüsen
 Zahnschmelz

1.3 Transkriptionelle Regulation in Melanozyten und Melanomzellen

1.3.1 POU-Domäne-Transkriptionsfaktoren

Die Klasse der POU-Faktoren ist eine heterogene Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die in verschiedenen Zelltypen exprimiert werden (Tabelle 1.3). Es sind 6 Klassen von POU-Transkriptionsfaktoren bekannt, die wichtige Funktionen bei der Organentwicklung, Zelldifferenzierung und Proliferation übernehmen und durch die hochkonservierte POU-Domäne charakterisiert sind (Andersen et al., 2001; Phillips et al., 2000). Die POU-Domäne besteht aus der ca. 75 Aminosäuren langen N-terminalen POU-spezifischen-Domäne (POU_S) und der 60 Aminosäuren langen C-terminalen POU-Homeodomäne (POU_H), die durch eine Linker-Region von variabler Länge verbunden sind (Cook et al., 2008; Abbildung 1.2). Die POU_S- und POU_H-Domäne bilden Helix-Turn-Helix Strukturen (Cook et al., 2008; Dailey et al., 2001). POU-Domäne-Proteine binden an die DNA-Oktamersequenz 5'-ATGCAAAT-3' (Cook et al., 2005a).

Tabelle 1.3: Familie der POU-Transkriptionsfaktoren

(modifiziert nach Cook et al., 2008)

Klasse	Gen	Protein	Expression
POU1F	POU1F1	PIT1	Hypophyse
POU2F	POU2F1	OCT1	ubiquitär
	POU2F2	OCT2	Lymphgewebe
	POU2F3	SKN1A	Haut
POU3F	POU3F3	BRN1	Nervensystem, Niere
	POU3F2	BRN2	Nervensystem, malignes Melanom
	POU3F4	BRN4	Neuralrohr
	POU3F1	OCT6	Blastozyste, embryonale Stammzellen, ZNS
POU4F	POU4F1	BRN3A	visuelles System
	POU4F2	BRN3B	visuelles System
	POU4F3	BRN3C	auditorisches System
POU5F	POU5F1	OCT4	embryonale Stammzellen, Oozyten
	SPRM1	SPRM1	Spermien
POU6F	POU6F1	BRN5	Nervensystem
	POU6F2	RPF1	Retina, Hypothalamus



Abbildung 1.2: POU-Domäne mit der POU-spezifischen (POU_S)- und POU-Homeodomäne (POU_H), verbunden durch die Linker-Region (nach Cook et al., 2008). Die POU_S-Domäne und die POU_H-Domäne bilden Helix-Turn-Helix Strukturen (H-T-H).

1.3.1.1 Der Transkriptionsfaktor BRN2

BRN2 (Synonyme: Brain-2, N-Oct-3) ist ein Transkriptionsfaktor der POU Familie, der eine wichtige Rolle für die Proliferation und Differenzierung von melanozytären Zellen spielt (Goodall et al., 2004a; Cook et al., 2003). Die Expression des POU3F2-Gens, das für den Transkriptionsfaktor BRN2 kodiert, wurde erstmals 1989 im zentralen Nervensystem (ZNS) beschrieben (He et al., 1989). Einige Jahre später wurde das POU3F2-Gen auf Chromosom 6q16 lokalisiert (Atanasoski et al., 1995).

In Melanoblasten, die wie die Zellen des Nervensystems aus dem Ektoderm hervorgehen, wird BRN2 ebenfalls exprimiert und scheint zudem eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des malignen Melanoms zu spielen (Eisen et al., 1995; Cook et al., 2003; Goodall et al., 2004a).

Die mRNA-Expression von BRN2 war in humanen Melanomzelllinien signifikant höher als in Melanozyten. Melanomzellen, in denen die BRN2-Expression durch Antisense-RNA gehemmt worden war, verloren die Fähigkeit, Tumore in immundefizienten Mäusen zu bilden (Eisen et al., 1995; Angus et al., 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass zwischen dem Differenzierungsgrad von Melanozyten und der BRN2-Expression eine negative Korrelation besteht (Cook et al., 2003). Humane Melanoblasten, die aus neonataler Vorhaut isoliert in einem Medium mit Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2), Stammzellefaktor (SCF) und Endothelin-3 (ET-3) kultiviert worden waren, wiesen eine relativ hohe BRN2-Expression auf, während sie in einem Medium ohne FGF-2, SCF und ET-3 mit zunehmender Pigmentierung und Differenzierung zu Melanozyten abnahm (Cook et al., 2003). Wurden Melanozyten in einem Medium mit Zusatz von FGF-2, SCF und ET-3 kultiviert, konnte eine Abnahme der Zellpigmentierung und eine Zunahme der BRN2-Expression beobachtet werden (Cook et al., 2003).

In einer anderen Studie wurde der Promotor von BRN2 über den MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg (MAP = engl. Mitogen Activated Protein) aktiviert (Goodall et

al., 2004a). Dieser Signaltransduktionsweg, der eine wichtige Rolle für die Kontrolle von Wachstumssignalen, Zellüberleben und Zellinvasion spielt, ist im malignen Melanom häufig durch Mutationen im BRAF-Gen aktiviert (Chudnovsky et al., 2005; Smalley 2003). In Melanomzellen mit aktiviertem BRAF führte BRN2 zu einer erhöhten Zellproliferation (Goodall et al., 2004a).

Der BRN2-Promotor stellt ferner ein Target für den WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg dar (Goodall et al., 2004b). Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Melanozyten. Seine Aktivierung in Melanomzellen scheint mit einem metastatischen Phänotyp mit erhöhter Zellmotilität einherzugehen (Goodall et al., 2004b; Murakami et al., 2001). In Melanomzellen, in denen die BRN2-Expression durch β -Catenin kontrolliert wurde, führte BRN2 zu einer erhöhten Zellproliferation (Goodall et al., 2004b).

Die siRNA vermittelte Hemmung der BRN2-Expression in Colo858-Melanomzellen war in einem Matrigel Assay von einem verminderten invasiven Wachstum begleitet, was die Vermutung nahe legte, dass BRN2 in dieser Zellart nicht nur das Proliferationsverhalten sondern auch die Invasivität steuert (Goodall et al., 2008). In Melanomgewebeschnitten war die BRN2-Expression mit einer größeren Tumordicke nach Breslow assoziiert (Richmond-Sinclair et al., 2008).

Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression häufig durch Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren, die entweder derselben oder einer anderen Klasse angehören (Cook et al., 2008). Für BRN2 konnte gezeigt werden, dass es in vivo mit hoher Affinität Homodimere bildet und mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor TATA-Box-Bindungsprotein, dem Transkriptionskoaktivator p300 sowie PAX3 und SOX10, die eine wichtige Rolle für die Entwicklung von Melanozyten spielen, interagiert (Smit et al., 2000). In Neuroblastomzellen aktivierte BRN2 zusammen mit dem NF-Y-Transkriptionsfaktor den Promotor des Aromatischen-L-Aminosäure-Decarboxylase-Gens (Dugast et al., 2001).

Eine weitere Klasse von Transkriptionsfaktoren, die zusammen mit POU-Domäne-Faktoren die Genexpression regulieren, stellen die SOX-Proteine dar (Dailey et al., 2001; siehe auch 1.3.2). In Schwanzzellen wurde beispielsweise beobachtet, dass über die Bindung der POU-Faktoren OCT6 und BRN2 zusammen mit SOX10 an den Krox20-Enhancer die Myelinisierung reguliert wird (Ghislain et al., 2006).

Als Zielgene von BRN2 in melanozytären Zellen konnten MITF und GADD45 identifiziert werden (Goodall et al., 2008; Lefort et al., 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass der Promotor des p53-Effektorgens GADD45 in Melanomzellen durch BRN2 in Abhängigkeit von UVB aktiviert wird (Lefort et al., 2001). Das MITF-Gen, das für den Mikrophthalmie-assoziierten-Transkriptionsfaktor kodiert, der im malignen Melanom Zellüberleben, Proliferation und metastatisches Potential reguliert, stellt ein weiteres Zielgen von BRN2 dar (Goodall et al., 2008; Vance et al., 2004). Goodall et al. konnten zeigen, dass BRN2 neben der TATA Box an den MITF-Promotor bindet und damit die MITF-Expression unterdrückt (Goodall et al., 2008). In einer anderen Studie wurde die Transkription von MITF durch BRN2 aktiviert (Wellbrock et al., 2008) und es wurde daraufhin die Vermutung geäußert, dass BRN2 in verschiedenen Kontexten entweder als Aktivator oder Repressor von MITF fungieren kann (Goodall et al., 2008).

Über PAX3 als ein weiteres mögliches Zielgen von BRN2 gibt es widersprüchliche Studien. Während Zhu et al. beobachteten, dass BRN2 in B16-Melanomzellen an den PAX3-Promotor bindet und die Genexpression stimuliert (Zhu et al., 2005), konnten Goodall et al. nach Inhibition der BRN2-Expression mit zwei verschiedenen siRNAs keine Veränderung in der PAX3-Proteinexpression gegenüber den Kontrollen feststellen (Goodall et al., 2008).

In einer Studie von Eisen et al. aktivierte BRN2 die Expression des MHC-Klasse-II-DR α -Promotors und unterdrückte die Aktivität des Melanozyten-spezifischen-Tyrosinase-Promotors (Eisen et al., 1995).

1.3.2 Sry-box-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der Sry-box (SOX)-Transkriptionsfaktoren besteht aus 20 verschiedenen Transkriptionsfaktoren und wird in die Klassen A bis H eingeteilt (Tabelle 1.4). Sry-box-Transkriptionsfaktoren sind durch die DNA bindende high-mobility-group-Domäne charakterisiert (Bowles et al., 2000). Die Bezeichnung „high-mobility-group“ (HMG) wurde gewählt, da Proteine dieser Klasse wegen ihrer kleinen Größe besonders schnell auf Polyacrylamid-Gel wandern (Dailey et al., 2001). Mit der HMG-Domäne binden SOX-Proteine an die DNA-Sequenz 5'-AACAAAT-3' (Mertin et al., 1999) und regulieren verschiedene Abschnitte der Embryonalentwicklung wie die Entwicklung des Nervensystems, der Knochen, des Auges und des Immunsystems (Mollaaghababa et al., 2003). Auch die Entwicklung der Melanozyten aus Zellen der Neuralleiste ist abhängig von SOX-Transkriptionsfaktoren (Wegner 2005). Hier

spielen besonders SOX9 und SOX10 der Klasse E eine wichtige Rolle (Wegner 2005; Mollaaghababa et al., 2003).

Tabelle 1.4: Familie der SOX-Transkriptionsfaktoren
(modifiziert nach Wegner, 2005)

Klasse	Transkriptionsfaktor
A	Sry
B1	SOX1, SOX2, SOX3
B2	SOX14, SOX21
C	SOX4, SOX11, SOX12 (SOX22)
D	SOX5, SOX6, SOX13
E	SOX8, SOX9, SOX10
F	SOX7, SOX17, SOX18
G	SOX15 (SOX20)
H	SOX30

1.3.2.1 Der Transkriptionsfaktor SOX9

Während der Skelettentstehung erfüllt SOX9 wichtige Funktionen bei der Knorpelentwicklung (Wegner 2005). Mutationen in SOX9 führen zu Kampomeler Dysplasie, einem meistens letalen Skelettfehlbildungssyndrom, das durch Biegung der langen Röhrenknochen charakterisiert ist und bei männlichem Karyotyp häufig mit einem weiblichen Phänotyp einhergeht (Sack et al., 2003).

In melanozytären Zellen scheint SOX9 positiv mit dem Differenzierungsstatus der Zellen assoziiert zu sein, da pigmentierte Melanomzellen eine höhere SOX9-Proteinexpression als unpigmentierte Melanomzellen aufweisen und Melanoblasten nach Differenzierung zu Melanozyten mehr SOX9 exprimieren (Cook et al., 2005b).

Auch in einem sehr frühen Entwicklungsstadium der Melanozyten, der Entstehung der Neuralleiste, scheint SOX9 eine Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression von SOX9 in Zellen des Neuralrohres, die sich unbeeinflusst zu Neuronen des ZNS differenzieren würden, eine Differenzierung zu Zellen der Neuralleiste induziert (Cheung et al., 2003).

In adulten Melanozyten führte UV-B-Bestrahlung über die Aktivierung des cAMP-Signaltransduktionsweges und der Proteinkinase-A zu einer Hochregulation von SOX9 (Passeron et al., 2007).

SOX9 scheint ferner eine wichtige Rolle bei der Regulation der Pigmentierung zu spielen, indem es die Transkription von MITF, der Dopachrom-Tautomerase und der Tyrosinase induziert (Passeron et al., 2007).

1.3.2.2 Der Transkriptionsfaktor SOX10

Während der Migration in die Epidermis wird SOX10 in Zellen der Neuralleiste exprimiert und ist somit wichtig für die Entwicklung der Melanozyten (Wegner 2005; Gershon et al., 2005). SOX10-Mutationen führen zum Waardenburg-Shah-Syndrom-Typ-IV, einem Krankheitsbild, das durch Gehörlosigkeit, Pigmentierungsstörungen der Haut und Haare und Agangliose des distalen Colons charakterisiert ist (Mollaaghababa et al., 2003).

Wie BRN2 findet sich auch SOX10 in unpigmentierten Vorläuferzellen der Melanozyten, den Melanoblasten, im Gegensatz zu differenzierten Melanozyten (Cook et al., 2005b). Die synchronisierte Verringerung der Expression von BRN2 und SOX10 während der Differenzierung von melanozytären Zellen legt nahe, dass diese Proteine die Transkription von Zielgenen gemeinsam regulieren. Allerdings konnten bis jetzt noch keine Bindestellen für BRN2 und SOX10 in einem melanozytären Promotor identifiziert werden (Cook et al., 2005b).

Es sind mehrere Zielgene von SOX10 beschrieben worden, die verschiedene Abschnitte der Melanozytenentwicklung wie Migration und Differenzierung regulieren (Bondurand et al., 2000; Britsch et al., 2001; Murisier et al., 2007; Yokoyama et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor MITF wird von SOX10 beeinflusst und auch die Gene für die Dopachrom-Tautomerase und die Tyrosinase, beides Enzyme der Melaninbiosynthese, scheinen von SOX10 abhängig zu sein (Bondurand et al., 2000; Britsch et al., 2001; Murisier et al., 2007). Außerdem aktiviert SOX10 zusammen mit Sp1 den Promotor des Endothelin-B-Rezeptors (EDNRB), der zusammen mit seinem Liganden ET-3 eine Rolle bei der Migration der Melanoblasten in die Epidermis spielt (Yokoyama et al., 2006).

1.4 Osteopontin als Zielgen von POU-Transkriptionsfaktoren

1.4.1 Struktur und Funktion von Osteopontin

Osteopontin (OPN), auch bezeichnet als Secreted-phosphoprotein-1 (Spp1), 2ar, Uropontin, Early-t-lymphocyte-activation-1 (Eta-1), ist ein sezerniertes Glykophosphoprotein, das erstmals 1979 beschrieben wurde (Senger et al., 1979). Es gehört neben Bone-Sialoprotein, Dentin-Matrix-Protein-1, Dentin-Sialoprotein und dem Matrix-Extracellular-Phosphoglycoprotein zur Familie der Small-Integrin-Binding Ligand-N-linked-Glycoproteins (SIBLING) (Wai et al., 2008).

Das humane OPN-Protein ist 314 Aminosäuren lang mit einem Molekulargewicht je nach posttranslationaler Modifikation zwischen 41 und 75 kDa (Wai et al., 2008; Sturm et al., 2005). Es enthält verschiedene funktionelle Domänen, mit denen es zum Beispiel über die Bindung von Integrin- und CD44-Rezeptoren und die damit verbundene Aktivierung von Signaltransduktionswegen die Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix und von Zellen untereinander reguliert (Denhardt et al., 2001).

Eine hohe OPN-Expression geht in verschiedenen Tumortypen mit einer Tumorprogression einher und bestimmt über Apoptoseinhibition, Neovaskularisation, Migration und Invasion den metastatischen Phänotyp (Wai et al., 2008).

Auch im malignen Melanom scheint OPN eine wichtige Rolle für die Tumorprogression zu spielen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten, die OPN im Primärtumor exprimierten, im Krankheitsverlauf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Metastasen hatten (Alonso et al., 2007). In einer anderen Studie wurde OPN in Primärtumoren und Melanommetastasen untersucht und eine erhöhte Expression in den Melanommetastasen festgestellt (Jaeger et al., 2007). In zwei anderen Studien wurde OPN in Primärtumoren und Melanommetastasen im Vergleich mit Nävi überexprimiert (Smith et al., 2005; Zhou et al., 2005). Die Hemmung von OPN mittels siRNA in Melanomzellen hatte eine verminderte Zellproliferation zur Folge (Zhou et al., 2005).

OPN wurde als möglicher neuer prognostischer Marker für das maligne Melanom vorgestellt, weil in immunhistochemischen Untersuchungen an Primärtumoren von 345 Patienten eine hohe OPN-Expression mit einem geringeren rückfallfreien- und krankheitsspezifischen Überleben korreliert werden konnte (Rangel et al., 2007).

Außerdem wurde OPN im Primärtumor als ein unabhängiger prognostischer Marker für Melanometastasen im Sentinel-Lymphknoten identifiziert (Rangel et al., 2007). In vitro Daten weisen darauf hin, dass OPN eine wichtige Rolle für die Invasion und Migration von Melanomzellen spielt. Es konnte gezeigt werden, dass OPN über den PI3-Kinase-Signaltransduktionsweg zu einer erhöhten Zellmotilität und über NF- κ B zu einer Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen führt (Philipp et al., 2001; Philipp et al., 2003). In einer anderen Studie ging eine erhöhte OPN-Expression in Melanomzelllinien mit Mutationen im PI3-Kinase-Antagonisten PTEN einher (Packer et al., 2006). Die Rolle von OPN für die Zellinvasion wurde in OPN defizienten Mäusen untersucht (Ohyama et al., 2004). Nachdem B16-Melanomzellen in den Knochenmarksraum der Femurknochen injiziert worden waren, war im Vergleich mit Wildtyp Mäusen eine verminderte Invasion der Tumorzellen in die Kortikalis zu beobachten (Ohyama et al., 2004). Mit dem Einfluss von OPN auf das Migrationsverhalten von Melanomzellen beschäftigten sich auch Hayashi et al. (Hayashi et al., 2007). Das Serum von Wildtyp Mäusen förderte die Migration von B16-Melanomzellen, wohingegen das Serum von OPN defizienten Mäusen die Migration hemmte. Da die Inhibition des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges den gleichen Effekt zeigte, wurde vermutet, dass die OPN induzierte Migration von diesem Signaltransduktionsweg abhängig ist (Hayashi et al., 2007).

1.4.2 Regulation des Osteopontin-Gens durch POU-Transkriptionsfaktoren

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass POU-Transkriptionsfaktoren an der Regulation des OPN-Promotors beteiligt sind (Botquin et al., 1998; Wang et al., 2000). In einem frühen Entwicklungsstadium des Mausembryos wird die Genexpression von OPN durch OCT4 und SOX2 reguliert (Botquin et al., 1998). Zudem konnte in Astrozytomzellen ein OPN-Promotor-Element mit Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die synergistisch für eine hohe OPN-Expression in dieser Zellart sorgen (Wang et al., 2000). In Gel Shift Assays konnte das RE-1b-Element innerhalb dieser Promotorregion OCT1 binden (Wang et al., 2000).

Ob auch andere POU-Transkriptionsfaktoren an der Regulation des OPN-Gens beteiligt sind, ist nicht bekannt, wird aber spekuliert, da in mehreren Studien überlappende Funktionen bei der Regulation von Zielgenen durch POU-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnten (Friedrich et al., 2005; Sugitani et al.,

2002). Die Funktion von OCT6 während der Schwanzzellentwicklung konnte beispielsweise vollständig durch BRN1 ersetzt werden (Friedrich et al., 2005). Ebenso konnte während der Entwicklung des Neokortex eine Redundanz der POU-Faktoren BRN1 und BRN2 nachgewiesen werden (Sugitani et al., 2002).

Es gibt Hinweise darauf, dass der POU-Transkriptionsfaktor BRN2 eine Rolle bei der Regulation der OPN-Expression spielt. In Gel Shift Assays konnte gezeigt werden, dass BRN2 an die humane OPN-Promotorsequenz binden kann (Sturm, persönliche Mitteilung). Außerdem werden sowohl die BRN2-Expression als auch die OPN-Expression über den MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg reguliert (Guo et al., 1995; Goodall et al., 2004a). In Melanomzellen wird der BRN2-Promotor durch Mutationen im BRAF-Gen aktiviert (Goodall et al., 2004a) und in Zellen mit aktiviertem RAS sorgt ein RAS aktivierter Enhancer im OPN-Promotor für eine erhöhte OPN-Transkription (Guo et al., 1995).

1.5 Nestin als Zielgen von POU- und SOX-Transkriptionsfaktoren

1.5.1 Das Intermediärfilament Nestin

Intermediärfilamente sind wie Mikrotubuli und Mikrofilamente wesentliche Bestandteile des Zytoskeletts und werden in sechs verschiedene Klassen eingeteilt (Steinert et al., 1999). Die Klassen I und II bestehen aus den sauren und basischen Keratinen, die Klasse III setzt sich aus Desmin, dem Glial-Fibrillar-Acidic-Protein (GFAP), Peripherin und Vimentin zusammen, die Klasse IV enthält die Neurofilamente und α -Internexin und die Klasse V wird von den Laminen gebildet (Dahlstrand et al., 1992a). Nestin gehört zur Klasse VI der Intermediärfilamente, wird von multipotenten neuroektodermalen Stammzellen exprimiert und gilt als ein Marker für proliferierende und migrierende Zellen (Dahlstrand et al., 1992 a, b). In differenzierten Geweben kommt es gemeinhin zu einer verminderten Nestin-Expression (Michalczyk et al., 2005). Eine Ausnahme hiervon stellt die Re-Expression von Nestin im ZNS oder in der Muskulatur nach Gewebstraumen dar (Moon et al., 2004; Michalczyk et al., 2005). Außerdem konnte eine Re-Expression von Nestin in primären Hirntumoren und in Melanomgewebe demonstriert werden (Dahlstrand et al., 1992 a, b; Ehrmann et al., 2005; Florenes et al., 1994; Brychtova et al., 2007). Ferner wurde Nestin im Mammakarzinom, Prostatakarzinom und im

duktalen Pankreaskarzinom nachgewiesen (Li et al., 2007; Kleeberger et al., 2007; Kawamoto et al., 2009).

Das 198 kDa schwere Protein Nestin besteht aus einem kurzen N-Terminus und einem ungewöhnlich langen C-Terminus, mit dem es vermutlich mit anderen Komponenten des Zytoskeletts wie Mikrotubuli und Mikrofilamenten interagiert (Wiese et al., 2004; Gilyarov, 2008; Abbildung 1.3). Mit den Intermediärfilamenten Vimentin und Desmin bildet Nestin Heteropolymere (Sjöberg et al., 1994; Abbildung 1.3). Zudem konnte gezeigt werden, dass Nestin zusammen mit Vimentin eine wichtige Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts während der Mitose einnimmt (Chou et al., 2003).

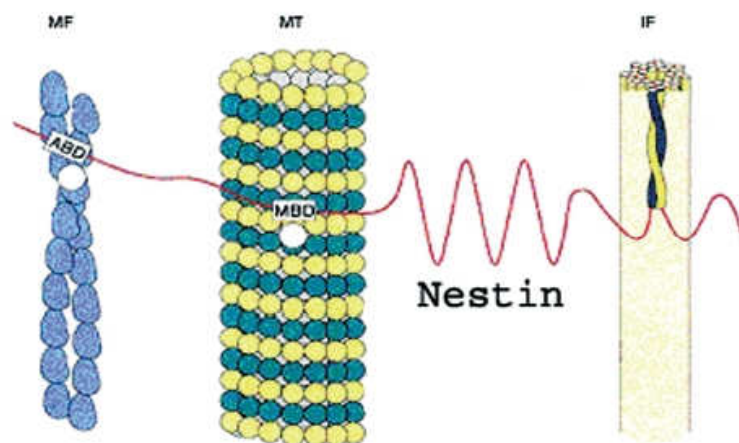


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Mikrofilamenten (MF), Mikrotubuli (MT) und Intermediärfilamenten (IF). Im Intermediärfilamentprotein ist ein Vimentin (gelb)/Nestin (blau)-Heterodimer hervorgehoben. Der lange Carboxyl-Terminus von Nestin verbindet das Intermediärfilament mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten (nach Michalczyk et al., 2005; modifiziert nach Herrmann et al., 2000).

1.5.2 Aktivierung des Nestin-Enhancers durch POU- und SOX-Transkriptionsfaktoren
Die Nestin-Expression wird während der Embryonalentwicklung des ZNS über einen spezifischen Enhancer reguliert, der im zweiten Intron lokalisiert ist (Josephson et al., 1998). Die Aktivierung dieses Enhancers ist abhängig von der Bindung von SOX- und POU-Transkriptionsfaktoren (Tanaka et al., 2004; Abbildung 1.4). Tanaka et al. konnten zeigen, dass BRN2 und SOX2 an den Nestin-Enhancer binden und diesen synergistisch aktivieren (Tanaka et al., 2004). Ferner wurde der Enhancer durch die Kombination von BRN2 mit den anderen Vertretern der Gruppe B1 der SOX Familie (SOX1 und SOX3) und SOX11 wie auch durch die Kombination von SOX2 mit anderen Proteinen der Klasse POU3F (BRN1, BRN4 und OCT6), OCT3/4 sowie OCT2 aktiviert.

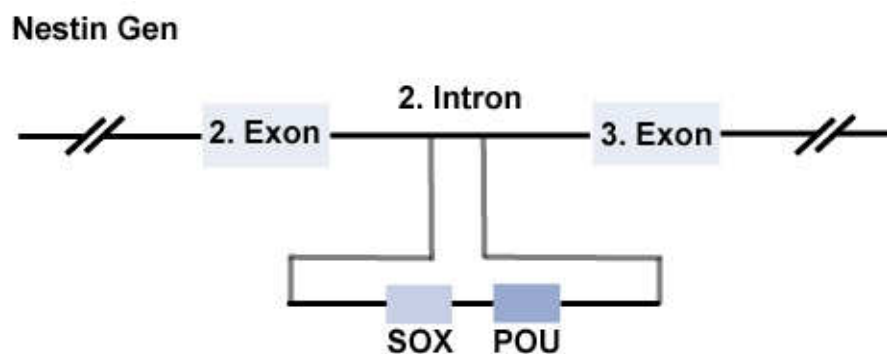


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der 258 bp langen Enhancer-Sequenz im zweiten Intron des Nestin-Gens mit SOX- und POU-Bindestellen (modifiziert nach Tanaka et al., 2004).

1.6 Fragestellung

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors BRN2 im malignen Melanom näher zu charakterisieren, sollte (1) die Expression auf mRNA- und Proteinebene in Melanomzelllinien unterschiedlicher Tumorprogressionsstufen untersucht werden. Außerdem sollte (2) die Frage beantwortet werden, ob OPN oder Nestin in Melanomzellen durch BRN2 reguliert werden können. Schließlich sollte (3) geklärt werden, ob die Transkriptionsfaktoren SOX9 und SOX10 in Melanomzellen an der Genregulation von Nestin beteiligt sind (Abbildung 1.5).

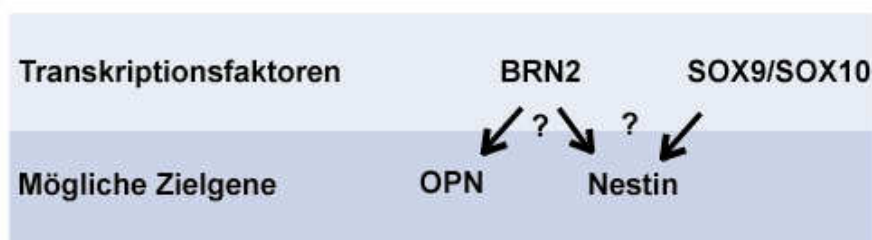


Abbildung 1.5: OPN als mögliches Zielgen von BRN2. Nestin als mögliches Zielgen von BRN2 und den SOX-Transkriptionsfaktoren SOX9 und SOX10.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Abzug	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Brutschrank Heracell	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine Scotsman	Fa. Hierhammer Kältetechnik (München, D)
Entwicklungsgerät X-Omat	Fa. Kodak (Rochester, NY, USA)
Fluorimeter Cytofluor 2350	Fa. Millipore Corp. (Isle of Man, UK)
Kühlschrank	Fa. Bosch (Stuttgart, D)
Gefrierschränke:	
-30°C	Fa. Bosch (Stuttgart, D)
-80°C	Fa. Hierhammer Kältetechnik (München, D)
Kameras:	
3CCD Color Video Camera	Fa. Sony (Tokio, Japan)
Axiocam	Fa. Zeiss (Jena, D)
Mikroskope:	
CK2	Fa. Olympus (Tokio, Japan)
Axioskop 2	Fa. Zeiss (Jena, D)
Axiovert 25	Fa. Zeiss (Jena, D)
PCR Gerät Lightcycler	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Robocycler 40	Fa. Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Schüttler Swip	Fa. Edmund Bühler (Hechingen, D)
Spectrophotometer Smart Spec 3000	Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Stromversorgungsgerät Power Pac 300	Fa. Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Thermomixer 5436	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Vortex Genie 2	Fa. Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Wasserbad	Fa. Bachofer (Reutlingen, D)
X Cell Sure Lock Mini Cell System	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Zentrifugen:	
5415R	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
5415C	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
ROTIXA 50 RS	Fa. Hettich (Tuttlingen, D)

2.2 Zelllinien und primäre Zellen

2.2.1 Melanomzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Melanomzelllinien waren ein Geschenk von Prof. Meenhard Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA). Die Zellen wurden entweder aus Primärtumoren oder aus Melanommetastasen isoliert und nach histopathologischen Kriterien in ein horizontales/radiäres Wachstumsmuster (RGP), vertikales Wachstumsmuster (VGP) oder metastatisches Wachstumsmuster eingeteilt (Herlyn et al., 1985). Zu den meisten Melanomzelllinien liegen Informationen zu klinischem Stadium, Invasionstiefe, Mutationsstatus und Lokalisation des Primärtumors bzw. der Metastase vor (Tabelle 2.1). Das Staging erfolgte nach der AJCC-Klassifikation. Die Eindringtiefe des Primärtumors wurde entsprechend der Klassifikation nach Clark angegeben.

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Melanomzelllinien

Histo-pathologisches Stadium	Bezeichnung	AJCC-Stadium	Clark Level/ Tumordicke (mm)	Lokalisation	Mutation
RGP	SbCl-2	-		-	-
	WM3211	1		Fußgelenk	-
	WM3208	-		Gesäß	-
VGP	WM35	1	I/0,69	Kopfhaut/ Nacken	BRAF V600E
	WM1366	-		-	-
	WM793	1	I/0,55	Sternumregion	BRAF V600E
Metastatisch	WM278	2	V/3,7	-	BRAF V600E
	1205Lu	-		Lunge	BRAF V600E
	WM1158	2	II/2,75	Lymphknoten	-
	451Lu			Lunge	BRAF V600E
	WM239A	-	II/2,24	Leistenlymphknoten, Hautmetastase	-
	WM9	-		Lymphknoten Axilla	-
	WM1232	-		-	-

2.2.2 Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten

Die Melanozyten und Keratinozyten wurden aus der Epidermis und die Fibroblasten aus der Dermis kindlicher Vorhäute im Labor isoliert und als Zellkultur etabliert. Verwendet wurden Primärkulturen: Vier verschiedene Melanozytenlinien (HM9, HM47, HM77, HM84), drei verschiedene Keratinozytenlinien (HK9, HK35, HK87) und drei verschiedene Fibroblastenlinien (HF2, HF9, HF34).

2.2.3 Knochenmarkszellen

Das humane kindliche Knochenmark stammte von einem gesunden Spender und war ein Geschenk von der Arbeitsgruppe um Prof. Arndt Borckhardt (Hauersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität, München, D).

2.3 Material

2.3.1 Zellkultur

Antibiotic-/Antimycotic Solution	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
bFGF	Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Calciumchlorid	Fa. Sigma (Carlsbad, CA, USA)
Chelex 100 (sodium form)	Fa. Sigma (Carlsbad, CA, USA)
Cholera Toxin	Fa. Sigma (Carlsbad, CA, USA)
DMEM	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
ET-3	Fa. Merck (Darmstadt, D)
FKS	Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe, D)
HBSS	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Insulin	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Glutamin	Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe, D)
L-15 Leibovitz-Medium mit Glutamin	Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe, D)
MCDB 153 Medium	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
SCF	Fa. BD Biosciences (Heidelberg, D)
SFM für Keratinozyten	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Trypsin-EDTA	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

TU 2% Medium:

MCDB 153

20% L-15 Leibovitz-Medium

2% FKS

5 µg/ml Insulin

1,68 mM Calciumchlorid

Melanoblastenmedium:

MCDB 153

2% FKS

10% cheliertes FKS

2 mmol/l L-Glutamin

20 pmol/l Cholera Toxin

150 pmol/l bFGF

100 nmol/l ET-3

10 ng/ml SCF

Herstellung von cheliertem FKS:

15 g Chelex-100 in 500 ml FKS

Fibroblastenmedium:

DMEM

10% FKS

Keratinozytenmedium:

SFM für Keratinozyten

rEGF (0,1-0,2 ng/ml)

BPE (25 µg/ml)

2.3.2 Proteinisolierung und Western Blot

Aqua ad injectabilia	Fa. Delta Select (Pfullingen, D)
BCA Protein Assay Kit	Fa. Pierce (Rockford, IL, USA)
Blotting Pads	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
BSA	Fa. New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
EDTA	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
EGTA	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Hyperfilm ECL	Fa. Amersham (Little Chalfont, UK)
Methanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Natriumazid	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Natriumchlorid	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Natriumfluorid	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Natriumvanadat	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Nupage Antioxidant	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Nupage 4-12% Bis Tris Gel 1-200 kDa	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Nupage LDS Sample Buffer	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Nupage MES SDS Running Buffer	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Nupage Sample Reducing Agent	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Nupage Transfer Buffer	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PBS Medium	Fa. Apotheke Innenstadt Uni München
Protease Inhibitor Cocktail Tablet	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
PVDF Filterpapier Sandwich	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
SeeBlue Plus2 Prestained Standard	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Tris	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Triton X 100	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Tween 20 for electrophoresis	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Western Blocking Solution	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Fa. Amersham (Little Chalfont, UK)

CSH Puffer für die Proteinisolierung:

50 mM Tris; pH 7.4

0,25 M Natriumchlorid

1 mM EDTA

0,1% Triton X 100

0,1 mM EGTA

5 mM Natriumvanadat

50 mM Natriumfluorid

Protease Inhibitor Cocktail Tablet

Laufpuffer für den Western Blot:

50 ml Nupage MES SDS Running Buffer

Aqua ad injectabilia ad 1000 ml

davon 200 ml mit 500 µl Nupage Antioxidant für die innere Kammer

davon 600 ml für die äußere Kammer

Transferpuffer für den Western Blot:

25 ml Nupage Transfer Buffer

50 ml Methanol

500 µl Nupage Antioxidant

Aqua ad injectabilia ad 500 ml

Waschpuffer für den Western Blot:

500 ml PBS

500 µl Tween 20

Blocking Lösung für den Western Blot:

450 ml PBS

50 ml Western Blocking Solution

50 ml 0,5 M Natriumfluorid

Tabelle 2.2: Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Molekulargewicht (kDa)
Primärantikörper	SOX9 Kaninchen polyklonal	Chemicon (Temecula, CA, USA)	1:1000	60
	SOX10 (N-20) Ziege polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:200	58
	Brn-2 (C-20) Ziege IgG polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:200	50
	Nestin (10c2) Maus IgG ₁ monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:200	188
	Anti-Osteopontin Kaninchen IgG	Sigma (St. Louis, MO, USA)	1:1000	50
	Anti-β-Actin Maus IgG ₁ monoklonal (Klon AC-15)	Sigma (St. Louis, MO, USA)	1:4000	42
Sekundärantikörper	Pferd anti-Maus IgG, HRP konjugiert	Cell Signaling Technology, INC. (Danvers, MA, USA)	1:5000	-
	Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert	Cell Signaling Technology, INC. (Danvers, MA, USA)	1:2000	-
	Esel Anti-Ziege IgG, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:40000	-

2.3.3 Immunhistochemie

Xylol

Fa. Merck (Darmstadt, D)

Zitratpuffer

Fa. Chemicon (Temecula, CA, USA)

Tris

Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)

Fast Red

Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)

Kaisers Glyceringelatine

Fa. Merck (Darmstadt, D)

Tabelle 2.3: Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung
Primärantikörper	Kaninchen anti-humaner SOX9 Antikörper	Abcam (Cambridge, UK)	1:200
	Kaninchen anti-humaner SOX10 Antikörper	Abcam (Cambridge, UK)	1:200
	Nestin (10c2) Maus IgG ₁ monoklonal (200 µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:500
Sekundär- und Tertiärantikörper	Maus anti-Kaninchen Antikörper	Dako (Glostrup, Dänemark)	1:100
	Kaninchen anti-Maus Antikörper	Dako (Glostrup, Dänemark)	1:20
	Maus anti-Kaninchen APAAP Antikörper	Dako (Glostrup, Dänemark)	1:50

2.3.4 Immunfluoreszenz

FKS	Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe, D)
Mounting Medium	Fa. Dako (Hamburg, D)
Paraformaldehyd	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
PBS	Fa. Apotheke Innenstadt Uni München
Triton X 100	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Falcon Culture Slide 4 Chamber	Fa. Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NY, USA)

Tabelle 2.4: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen

Antikörper	Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung
Primärantikörper	OPN (AKm2A1) Maus IgG ₁ monoklonal (200 µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:50
	Nestin (10c2) Maus IgG ₁ monoklonal (200 µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA)	1:500
Sekundärantikörper	Ziege Anti-Maus IgG Cy3 konjugierter Zweitantikörper (1,5 mg/ml)	Jackson Immunoresearch Laboratories, INC. (West Grove, PA, USA)	1:200

2.3.5 RNA-Isolation und RT-PCR

Chloroform	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Ethanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Expand Reverse Transcriptase Kit	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Isopropanol	Fa. Sigma (St. Louis, MO, USA)
Trizol Reagent	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Primer für cDNA Synthese pdT15	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Light Cycler Taq Man Master	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Light Cycler Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	Fa. Promega (Madison, WI, USA)

DEPC-Wasser:

0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) in 1000 ml H₂O

Primer für die SYBR Green I PCR:

Die Sequenzen der Osteopontin Primer wurden nach Zhou et al. (2005) ausgewählt.
Alle Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, D) bezogen.

Tabelle 2.5: Primer Sequenzen für die SYBR Green I PCR

Gen	Sequenzen
BRN2	Forward 5'-GCAAAAGGAAAGCAACTAAGAC-3' Reverse 5'-CCATCTCTCTGTCTCTCTCTC-3'
Nestin	Forward 5'-CTCCAGAAACTCAAGCACC-3' Reverse 5'-TGATTCCTGATTCTCCTCTTCC-3'
OPN	Forward 5'-CTGACATCCAGTACCCTGATGC-3' Reverse 5'-GGCCTTGATGCACCATTCA-3'
HPRT	Forward 5'-GACTTTGCTTTCCTTGGTCA-3' Reverse 5'-GGCTTTGTATTTGCTTTTCC-3'

Primer für die Sonden PCR:

Alle Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, D) bezogen.

Tabelle 2.6: Primer Sequenzen für die Sonden PCR

Gen	Sequenzen
BRN2	Forward 5'-TTTGCAGGCGAGTAACCAG-3' Reverse 5'-TTCTAGCTATCACACACTCTCCTCA-3'
Nestin	Forward 5'-GAGGTGGCCACGTACAGG-3' Reverse 5'-CTGGGGTCCTAGGGAATTG-3'
OPN	Forward 5'-GAGGGCTTGGTTGTCAGC-3' Reverse 5'-CAATTCTCATGGTAGTGAGTTTTCC-3'
SOX9	Forward 5'-GTACCCGCACTTGCACAAC-3' Reverse 5'-TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC-3'
SOX10	Forward 5'-GACCAGTACCCGCACCTG-3' Reverse 5'-CGCTTGTCACCTTTCGTTTCAG-3'
HPRT	Forward 5'-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC-3' Reverse 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'

2.3.6 Transfektion mit siRNA

Lipofectamine RNAiMax Reagent Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

OPTIMEM Medium Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Oligonukleotide:

Die Sequenz der BRN2 spezifischen siRNA wurde von Goodall et al. beschrieben (2004a). Die siRNAs wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, D) bezogen.

Tabelle 2.7: siRNA Sequenzen

Bezeichnung	Sequenzen
BRN2	Sense 5'-GCGCAGAGCCUGGUGCAGGTT-3' Antisense 5'-CCUGCACCAGGCUCUGCGCTT-3'
SOX9	Sense 5'-CAGCGAACGCACAUCAAGATT-3' Antisense 5'-UCUUGAUGUGCGUUCGUGGTT-3'
SOX10	Sense 5'-CCGUAUGCAGCACAAGAAATT-3' Antisense 5'-UUUCUUGUGCUGCAUACGGTT-3'
CO3	Sense 5'-GCGCAUUCAGCUUACGUATT-3' Antisense 5'-UACGUAAGCUGGAAUGCGCTT-3'
CO4	Sense 5'-GCGCUAUCCAGCUUACGUATT-3' Antisense 5'-UACGUAAGCUGGAUAGCGCTT-3'

2.3.7 Bestimmung der Zellproliferation

Cell Titer Blue Cell Viability Assay Fa. Promega (Madison, WI, USA)

2.4 Methoden

2.4.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 ml Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C und einem 5%igen CO₂/Luftgemisch. Die Zellen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Zeichen des Zelluntergangs oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert und unter einem Mikroskop mit integrierter Kamera der Firma Zeiss fotografiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

Die Melanomzellen wurden in TU 2% Medium kultiviert. Das Medium wurde zweimal in der Woche gewechselt und die Zellen bei Bedarf gesplittet. Die Melanozyten wurden in Melanoblastenmedium herangezogen. Der Mediumwechsel und das Splitten der Zellen erfolgte dem Melanozytenwachstum entsprechend. Die Kultivierung der Fibroblasten und Keratinozyten wurde in DMEM mit 10% FKS bzw. SFM für Keratinozyten durchgeführt.

Für die Experimente mit siRNA und den Proliferationsassay wurden 100.000 bzw. 50.000 Melanomzellen pro Well in 2 ml TU 2% Medium in 3,5 cm 6-Well Platten ausgesetzt.

Das Splitten der Zellen wurde unter sterilen Bedingungen unter dem Abzug durchgeführt. Vor dem Splitten wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen. Dann wurden die Zellen für ca. 3 min mit Trypsin im Brutschrank inkubiert und danach vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Um die Reaktion mit Trypsin zu stoppen, wurde DMEM mit 10% FKS in gleichem Volumen dazu gegeben, das Gemisch in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm und 20°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in TU 2% Medium resuspendiert.

2.4.2 Proteinisolierung

Die Zellen wurden zweimal mit HBSS gewaschen, bevor sie mit 0,2% PBS/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst wurden. Dazu wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C für 5-10 min inkubiert und danach in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß bzw. ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm und 20°C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal in PBS resuspendiert und bei 2000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das trockene Pellet wurde nun entweder bei -80°C vorübergehend aufbewahrt oder gleich im Anschluss zur Proteinisolierung auf Eis in

60 µl CSH Puffer aufgenommen. Zur Zellyse wurde das CSH-Zellgemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden unlösliche Substanzen bei 13.000 rpm und 4°C für 20 min abzentrifugiert und der Überstand mit dem in CSH Puffer gelösten Protein in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Pierce Proteinassay bestimmt. Es wurde eine Standardverdünnungsreihe von 80 µg bis 5 µg mit BSA hergestellt und die optische Dichte (OD) bei 562 nm gemessen. Dabei entsprach 1 OD einer Konzentration von 10 µg/µl.

2.4.4 Western Blot

Die Western Blot Analyse dient dem Nachweis von spezifischen Proteinen in einem Proteingemisch. Dazu werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen (geblottet) und anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen. Es kann damit auch eine semiquantitative Aussage über die Menge eines gewissen Proteins in einer Probe getroffen werden. Vor dem eigentlichen Western Blot wird ein Proteingemisch mittels Gel-Elektrophorese entsprechend der Größe der einzelnen Proteine aufgetrennt. Kleine Proteine wandern dabei schneller als große Proteine. Zum Blotten wird ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel angelegt. So wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran (z.B. Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran). An der Membranoberfläche bleiben die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteinbanden können nun auf der Membran mit Hilfe von Antikörpern identifiziert werden. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran müssen allerdings erst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich die Antikörper sonst an diese Stellen heften und den spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgt mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein. Die Membran wird nun mit einem antigenspezifischen Primärantikörper behandelt. Nach einigen Waschschritten, die schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran entfernen, wird der gegen die Fc-Region des Primärantikörpers gerichtete Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Die Sichtbarmachung des Proteins erfolgt über eine Chemilumineszenzreaktion, die durch ein an den

Sekundärantikörper gekoppeltes Enzym, eine Peroxidase aus dem Meerrettich (engl. horseradish peroxidase (HRP)), katalysiert wird. Die Lumineszenz entsteht bei der Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Sie kann auf einem Film in einem Entwicklungsgerät sichtbar gemacht werden.

Proteingelelektrophorese:

10 µg Proteinlysate wurde mit H₂O ad 15,6 µl, 6 µl Nupage LDS Sample Buffer und 2,4 µl Nupage Reducing Agent auf ein Gesamtvolumen von 24 µl verdünnt. Durch den Reducing Agent werden reduzierende Bedingungen zur Vermeidung von Proteinkomplexen geschaffen. Die Proben wurden dann bei 70°C für 10 min auf einem Heizblock inkubiert. Der Gellauf wurde im Xcell SureLock Mini-Cell-System der Firma Invitrogen auf einem Nupage Bis-Tris Polyacrylamid Gel mit einer Acrylamidkonzentration von 4-12% durchgeführt. Nach Einsetzen des Gels und Befüllen der inneren und äußeren Kammer mit Laufpuffer wurden jeweils 20 µl der Proteinlysate in die Gelkammern pipettiert. Als Marker wurden 15 µl vom SeeBlue Plus2 Prestained Standard verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 150 V für 1 h. Dies entspricht anfangs ca. 150 mA und am Ende ca. 70-80 mA.

Blot:

Zur Vorbereitung wurde die PVDF Membran für 30 s in 100% Methanol angefeuchtet, für 2 min in H₂O gewaschen und dann für 15 min in Transferpuffer eingeweicht. Blotting Pads und Filterpapier wurde ebenfalls vor Gebrauch kurz in Transferpuffer angefeuchtet. Für den Transfer wurde mittels Gel, PVDF Membran, Filterpapier und Blotting Pads ein „Sandwich“ gebaut, das nach folgendem Aufbau in die Blotting Apparatur geklemmt wurde: Kathode (-) - Blotting Pads – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier - Blotting Pads - Anode (+). Die negativ geladenen Proteine wandern so aus dem Gel in die Membran zur Anode. Die Blotting Apparatur wurde daraufhin mit Transferpuffer und die äußere Kammer zur Kühlung mit Aqua ad injectabilia gefüllt. Der Transfer erfolgte dann bei 30 V, dies entspricht anfangs ca. 200 mA, in einem Zeitraum von 1 h und 10 min.

Hybridisierung:

Die PVDF Membran wurde kurz mit Waschpuffer gewaschen und dann für 30 min in Blocking Lösung inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper

verdünnt in 20 ml Blocking Lösung mit 200 µl Na-azid bei 4°C über Nacht. Dann wurde die PVDF Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 30 min in Blocking Lösung inkubiert. Die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper verdünnt in 20 ml Blocking Lösung erfolgte für 60 min bei RT. Schließlich wurde die PVDF Membran nochmals dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen.

Detektion:

Für die Film-Entwicklung wurde die Membran mit 2 ml ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Reagent A und B in einer Mischung von 40:1) für 5 min bei RT in einer Plastikfolie inkubiert. Die Aufnahme wurde in einer Dunkelkammer an einem Entwicklungsgerät der Firma Kodak mit Hyperfilm ECL durchgeführt. Die Belichtungsdauer des Films war abhängig vom verwendeten Antikörper und lag im Bereich von 1 s bis 10 min.

2.4.5 Immunhistochemische Färbung von humanem Melanomgewebe

Die Immunhistochemie ist eine Methode, bei der Proteine mit Hilfe von Antikörpern und geeigneten Farbstoffen in Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden können. In dieser Arbeit wurden die immunhistochemischen Färbungen nach der alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase-(APAAP) Methode durchgeführt (Schaumburg-Lever 1987). Die in Paraffin eingebetteten 5 µm dicken Melanomgewebeschnitte wurden in zwei Schritten mit Xylol für jeweils 10 min entparaffiniert und danach in einer absteigenden Konzentrationsreihe mit Isopropanol (100%, 96%, 80% und 70%) für je 4 min rehydriert. Die Denaturierung der Antigene erfolgte durch Kochen in einer Mikrowelle in Zitratpuffer bei pH 6,0. Anschließend kühlten die Schnitte für 20 min bei RT ab. Für jeweils 4 min folgte eine zweimalige Waschung mit Tris-Puffer. Unspezifische Bindungen wurden durch 20-minütige Inkubation mit FKS/Tris 20% blockiert. Die Inkubation des Primärantikörpers (Kaninchen Antikörper) in geeigneter Verdünnung fand bei RT über Nacht statt. Es folgte eine zweimalige Waschung mit Tris-Puffer für je 4 min. Dieser Waschschrift wiederholte sich nach allen weiteren unten aufgeführten Inkubationsschritten. Der Sekundärantikörper (Maus anti-Kaninchen Antikörper) wurde mit einer Inkubationszeit von 60 min und der Tertiärantikörper (Kaninchen anti-Maus

Antikörper) für 30 min auf die Schnitte aufgebracht. Im letzten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem APAAP-Antikörper für 30 min.

Im Fall des Nestin Antikörpers, der im Gegensatz zu den SOX9- und SOX10 Antikörpern ein Maus-Antikörper war, wurde nur mit dem Kaninchen anti-Maus- und dem APAAP Antikörper inkubiert.

Als Substrat des APAAP-Antikörpers wurde Fast Red verwendet. Danach wurde dreimal mit Tris-Puffer gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hematoxylin und das Eindecken der Objektträger mit Deckgläsern und Kaisers-Glyceringelatine.

2.4.6 Immunfluoreszenzfärbung von Melanomzellen

Mit dieser Methode wird das Protein über eine Antikörperreaktion in intakten, fixierten Zellen sichtbar gemacht. Dazu wird in zwei Schritten vorgegangen. Der Primärantikörper erkennt das Protein. Durch den Sekundärantikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist und zusätzlich an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, wird das Protein sichtbar gemacht.

Die Anzucht der Zellen erfolgte auf Falcon Culture Slide 4 Chamber Objektträgern der Firma Becton Dickinson mit je 40.000 Zellen in 800 µl TU 2% Medium pro Kammer. Zwei Tage nach dem Aussetzen waren die Zellen nahezu 100% konfluent gewachsen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen für 5 min mit ca. 100 µl PBS pro Kammer gewaschen. Die Wände der Kammern wurden vom Objektträger entfernt und die Zellen mit je 50 µl 4% PFA/PBS pH 7,4 pro Kammer für 20 min bei RT zur Fixierung der Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit je 50 µl PBS pro Kammer dreimal 5 min gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde je 50 µl 0,5% Triton X 100 auf die Zellen gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden nochmals zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Dann wurden unspezifische Bindungen mit 50 µl 20% FKS/PBS pro Kammer für 15 min blockiert. Die Primärantikörper wurden in 50 µl PBS zu angemessener Konzentration verdünnt und auf die Zellen gegeben. Für die Negativkontrolle wurde 50 µl PBS anstelle des Primärantikörpers verwendet. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper. Dazu wurden die Zellen zuerst zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde zur Vermeidung vorzeitiger Fluoreszenzanregung in einem abgedunkelten Raum in 50 µl PBS/FKS

12,5% verdünnt und den Zellen für 1 h hinzugegeben. Dann wurden die Zellen zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Schließlich wurden 2 Tropfen Dako Mounting Medium auf den Objektträger getropft, ein Deckglas auf dem Objektträger fixiert und mit Nagellack versiegelt. Die Zellen wurden unter einem Mikroskop der Firma Zeiss beurteilt und mit einer Kamera der Firma Sony fotografiert.

2.4.7 RNA-Isolation

Es wurde das Reagenz Trizol verwendet, das eine saure Mischung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat ist. Es lysiert Zellen und stabilisiert gleichzeitig die RNA. Durch Zugabe von Chloroform wird die Lösung in eine wässrige und phenolische Phase aufgetrennt, wobei die RNA in der wässrigen Phase ist. In der phenolischen Phase sind die Proteine und die DNA.

Zuerst wurden die adhärennten Zellen zweimal mit HBSS gewaschen. Dann wurde 1 ml Trizol pro Well (6-Well-Platte) bzw. 2 ml Trizol (75 ml Zellkulturflasche) auf die Zellen gegeben und unter regelmäßigem Schwenken für 5 min bei RT inkubiert. Das zähflüssige Lysat wurde dann mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Trizol Lysat wurde dann bei Bedarf bei -80°C aufbewahrt oder gleich im Anschluss nach Zugabe von 200 µl Chloroform durch kräftiges Schütteln für 15 s und Inkubation für 3 min bei RT in die wässrige und phenolische Phase aufgetrennt. Zur vollständigen Phasentrennung wurden die Lysate bei 13.000 rpm und 4°C für 18 min zentrifugiert. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige obere Phase (etwa 400 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 400 µl Isopropanol 100% 10 min bei RT stehen gelassen. Nach Zentrifugation bei 13.200 rpm und 4°C für 15 min war am Boden des Reaktionsgefäßes oftmals schon ein zartes Pellet sichtbar. Die RNA wurde zweimal gewaschen. Dazu wurde der Überstand entfernt, 1 ml eiskaltes Ethanol 70% in DEPC Wasser dazugegeben und die Lösung bei 13.200 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet unter einem Abzug für ca. 10 min luftgetrocknet. Die Lösung des RNA Pellets erfolgte in 25 µl DEPC-Wasser unter regelmäßigem Vortexen für ca. 2 h auf Eis.

2.4.8 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA wurde 1:20 in DEPC-Wasser verdünnt und die OD bei 260 nm gemessen. Dabei entsprach 1 OD einer Konzentration von 40 µg/ml.

2.4.9 RT-PCR in zwei Schritten

Um die mRNA Expression von Zellen zu untersuchen, muss die RNA zuerst in DNA umgeschrieben werden, da RNA nicht als Matrize für die PCR Reaktion eingesetzt werden kann. Dieser Schritt wird vom Enzym Reverse Transkriptase durchgeführt. Die umgeschriebene DNA, copy DNA (cDNA) genannt, wird dann in einem zweiten Schritt mittels PCR vervielfältigt. Dieses Verfahren ermöglicht es, ein spezifisches DNA-Stück aus dem cDNA Gemisch zu amplifizieren. Die zu amplifizierende DNA-Matrize wird auf Englisch auch als Template bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar, das den Enden der Matrize homolog ist. Die Reaktion durchläuft drei Schritte: 1. Denaturierung, d.h. Aufschmelzen der beiden Stränge der Matrizen-DNA, 2. Hybridisierung, d.h. spezifische Anlagerung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA und 3. Elongation, d.h. von den Primern ausgehende DNA-Synthese. Durch die ständige Wiederholung dieser drei Schritte wächst die Anzahl an kopierten DNA Molekülen exponentiell.

2.4.9.1 Synthese der cDNA

Zur cDNA Synthese wurde das Expand Reverse Transkriptase Kit der Firma Roche eingesetzt. Das Enzym ist eine gentechnisch modifizierte Version der Reversen Transkriptase vom Moloney Murine Leukemia Virus. Durch Reduktion der endogenen RNase Aktivität des Enzyms können besonders lange cDNA Abschnitte gewonnen werden. Ferner wurden 1,4-Dithiothreitol (DTT) zur Optimierung der Reaktionsbedingungen, Oligo (dT)₁₅ Primer, das sind Oligomere von 15 bp Länge, die an den poly A Schwanz am 3' Ende von eukaryoten mRNAs binden, Nukleotid Mix, RNase Inhibitoren und MgCl₂ Pufferlösung verwendet.

Primerhybridisierung:

1 µg RNA wurde mit DEPC-Wasser ad 8,5 µl verdünnt und mit 2 µl Oligo (dT)₁₅ Primern (250 ng/µl) zu einem Endvolumen von 10,5 µl versetzt. Zur

Primeranlagerung wurde die RNA für 10 min bei 65°C im Thermocycler mit Heizdeckel inkubiert und sofort danach auf Eis gekühlt.

Reverse Transkription:

Zur hybridisierten RNA wurde auf Eis 4 µl Expand Reverse Transcriptase Puffer (Endkonzentration 5 mM MgCl₂), 2 µl 100 mM DTT (Endkonzentration 10 mM), 2 µl 10 mM Nukleotid Mix (Endkonzentration je 1 mM), 0,5 µl RNasin (20 U/Reaktion) und 1 µl Expand Reverse Transkriptase (50 U/Reaktion) gegeben und zur cDNA Synthese für 1 h bei 43°C im Wasserbad inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden 20 µl cDNA mit DEPC-Wasser 1:3 verdünnt und bei -80°C gelagert.

2.4.9.2 Quantitative Real Time RT-PCR

Die PCR wurde mit der Real Time Methode in einem LightCycler Gerät der Firma Roche durchgeführt. Ein Real Time PCR Gerät ermöglicht die Messung der entstehenden PCR Produkte schon während der Amplifikation im Gegensatz zur Analyse der PCR Produkte nach dem PCR Lauf. Dies hat den Vorteil, dass die Messung noch während der exponentiellen Bildung der PCR Produkte durchgeführt wird. In dieser Phase lässt sich die Bildung mit einer mathematischen Formel genau beschreiben. So kann aus den Daten die Anzahl der PCR Produkte während der exponentiellen Bildung und durch Extrapolation auch die anfängliche Menge der Matrizen-cDNA berechnet werden. Die PCR Produkte werden fluorimetrisch gemessen, d.h. das PCR Gerät detektiert ein Fluoreszenzsignal und korreliert die Stärke des Signals mit der Menge an PCR Produkten.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedenen Methoden der Fluoreszenzdetektion angewendet. Die Expressionstudien wurden mit einem sequenzunabhängigen Verfahren, dem SYBR Green I System (LightCycler Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I, Roche), und die Experimente mit siRNA mit einem sequenzspezifischen Verfahren, der Sonden PCR (LightCycler Taq Man Master, Roche), durchgeführt. Beide Verfahren verwenden als Polymerase eine thermostabile rekombinante Taq DNA Polymerase. Das Enzym ist nur bei sehr hohen Temperaturen, bei denen die Primer nicht mehr unspezifisch binden können, aktiv.

SYBR Green I ist ein Fluorophor, das durch Konformationsänderung bei Bindung an doppelsträngige DNA (dsDNA) und Anregung durch blaues Licht fluoresziert. Das bei

530 nm gemessene Fluoreszenzsignal korreliert mit der Menge des amplifizierten PCR Produkts. Da SYBR Green I an jede dsDNA, also auch an unspezifische PCR Produkte wie Primer Dimere bindet, sollte bei diesem PCR Verfahren immer eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, mit deren Hilfe spezifische und unspezifische Produkte unterschieden werden können. Die Schmelzkurvenanalyse funktioniert nach dem Prinzip, dass jedes dsDNA Molekül eine charakteristische Schmelztemperatur (T_m) hat, bei der 50% der DNA als dsDNA und 50% als Einzelstrang DNA vorliegen. Der PCR Reaktionsmix wird langsam bis 95°C aufgeheizt. Wenn die Temperatur die T_m eines PCR Produkts erreicht, nimmt das Fluoreszenzsignal schlagartig ab. Die Software zeigt dieses Phänomen als eine Kurve mit dem Scheitelpunkt als Ausdruck der T_m an. Zusätzliche Scheitelpunkte sprechen dafür, dass sich neben dem spezifischen PCR Produkt auch unspezifische PCR Produkte gebildet haben.

Bei der sequenzspezifischen Methode werden Oligonukleotid Sonden (engl. hydrolysis probes) eingesetzt, die mit der komplementären Sequenz des Ziel PCR Produkts hybridisieren. Die Sonden sind an Fluorophoren gekoppelt, deren Fluoreszenzsignal wiederum gemessen werden kann. Da sich das Fluoreszenzsignal nur erhöht, wenn das Ziel PCR Produkt zugegen ist, werden unspezifische PCR Produkte nicht detektiert, was eine Schmelzkurvenanalyse überflüssig macht. Die Sonden PCR funktioniert nach dem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer Prinzip (FRET). FRET beruht auf dem Energietransfer von einem Fluorophor zu einem anderen räumlich nahen Fluorophor. Die Sonde ist mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen, dem Reporter und dem Quencher gekoppelt und am 3'-Ende phosphoryliert, so dass sie nicht von der Polymerase verlängert werden kann. Solange die Sonde intakt ist, sind der Reporter und der Quencher in enger räumlicher Nähe und der Quencher unterdrückt das Fluoreszenzsignal des Reporters. Sobald die Sonde jedoch an die Ziel DNA Sequenz gebunden hat, wird sie von der 5'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase gespalten und Reporter und Quencher werden getrennt, wodurch es zum Fluoreszenzsignal des Reporters kommt. Mit wachsender Menge an amplifiziertem DNA Produkt werden mehr und mehr Sonden gespalten und so das Fluoreszenzsignal erhöht, das bei entsprechender Wellenlänge gemessen werden kann. Die genspezifischen Sonden stammen aus der Universal Probe Library (Roche). Die Sonden sind 8 bis 9 Nukleotide lang. Eine Sonde bindet ungefähr 7000 Transkripte und jedes Transkript wird von ungefähr 16 verschiedenen

Sonden erkannt. Die Bindung an nur ein Transkript während einer PCR Reaktion wird durch die Spezifität der Primer gewährleistet. Mit Hilfe der Software unter <http://www.universalprobelibrary.com> können Sonden und die Sequenzen der Primer für das gewünschte Transkript gefunden werden.

Zur Quantifizierung des Zielgens wurde die Expression des untersuchten Gens als relativer Wert, nämlich als Verhältnis des Zielgens zu einem Referenzgen im selben Ansatz ausgedrückt. Bei dem Referenzgen handelte es sich um die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), ein hochreguliertes Gen, das sich in gleicher Menge in allen Ansätzen findet.

Um Unterschiede in der Amplifikationseffizienz von Zielgen und Referenzgen zu korrigieren, wurde bei jedem PCR Lauf eine Standardkurve eingesetzt. Eine Probe mit Wasser anstelle von cDNA diente als Negativkontrolle.

SYBR Green PCR Protokoll:

Für die Herstellung des PCR Mix wurden 4 µl des Master Mix (bestehend aus der Taq DNA Polymerase, Pufferlösung, MgCl₂, dem SYBR Green I Farbstoff und dNTPs mit dUTP anstelle von dTTP) mit 1 µl des vorwärts laufenden und 1 µl des rückwärts laufenden Primers (je 10 pmol) und 8 µl H₂O in n-fachem Ansatz in einem Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend wurden jeweils 14 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 6 µl cDNA (entsprechend 100 ng) zu einem Endvolumen von 20 µl dazugegeben. Der PCR Mix wurde in vorgekühlte Glaskapillaren pipettiert, die danach bei 1000 rpm und RT für 30 s zentrifugiert wurden. Der PCR Lauf erfolgte nach Protokoll (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Protokoll für die SYBR Green I PCR

Programm	Zyklen	Segment	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Präinkubation	1		95	600
Amplifikation	40	Denaturierung	95	15
		Anlagerung	55 ¹	10
		Verlängerung	72	15 ²
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	30
		Anlagerung	50	1
		Schmelzen	95	0
Kühlen	1		30	600

¹ 60°C für OPN ² 10 s für OPN

Sonden PCR Protokoll:

Für die Herstellung des PCR Mix wurden in n-fachem Ansatz in der Reihenfolge wie aufgelistet 4,5 µl H₂O, 0,1 µl Sonde (100 nM), 0,2 µl des vorwärts laufenden Primers und 0,2 µl des rückwärts laufenden Primers (je 200 nM) und 2 µl Master Mix (bestehend aus der Taq DNA Polymerase, Pufferlösung, MgCl₂, und dNTPs mit dUTP anstelle von dTTP) in einem Eppendorfgefäß gemischt. Anschließend wurden jeweils 7 µl des PCR Mix in ein Eppendorfgefäß pipettiert und 3 µl cDNA (entsprechend 50 ng) zu einem Endvolumen von 10 µl dazugegeben. Der PCR Mix wurde in vorgekühlte Glaskapillaren pipettiert, die danach bei 1000 rpm und RT für 30 s zentrifugiert wurden. Die PCR erfolgte nach den Bedingungen in Tabelle 2.9.

Tabelle 2.9: Protokoll für die Sonden PCR

Programm	Zyklen	Segment	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Präinkubation	1		95	600
Amplifikation	40-45	Denaturierung	95	10
		Anlagerung	60	30
		Verlängerung	72	1
Kühlen	1		40	30

2.4.10 Transfektion mit siRNA

Um die Funktion von bestimmten Genen zu untersuchen, kann mittels small interfering RNA (siRNA) die Expression der mRNA effektiv gehemmt werden. Diesen Vorgang nennt man auch RNA Interferenz (RNAi). Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass kurze doppelsträngige RNA Oligonukleotide (genannt siRNAs) mittels liposomaler oder viraler Transfektion in die Zellen eingebracht werden. Im Zytoplasma werden die siRNA Moleküle in einen Multienzymkomplex, der Argonaute 2 (AGO2) und den RNA-inducing silencing complex (RISC) beinhaltet, aufgenommen. Dort wird der sense Strang der siRNA von AGO2 geschnitten. So entsteht aktiviertes RISC, das den antisense Strang der siRNA beinhaltet. Der antisense Strang erkennt die zu ihm komplementäre mRNA Sequenz und AGO2 schneidet die mRNA und hemmt so ihre Expression. Die siRNA ist in RISC vor der enzymatischen Aktivität von AGO2 geschützt und kann somit für den Abbau weiterer mRNA Moleküle sorgen.

Die Transfektion wurde in dieser Arbeit mit dem liposomalen Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMax der Firma Invitrogen durchgeführt. Dieses Transfektionsmittel funktioniert nach dem Prinzip, dass die positiv geladene Oberfläche der Liposomen die Fusion der Nukleinsäuren mit der negativ geladenen Zellmembran vermittelt. Es wird angenommen, dass der Liposom-Nukleinsäurekomplex dann mittels Endozytose in das Zellinnere aufgenommen wird. Einen Tag vor der Transfektion mit siRNA wurden die zu transfizierenden Zellen in 6-Well Platten ausgesetzt, je 100.000 Zellen pro Well in einem Volumen von 2 ml TU 2% Medium, so dass die Konfluenz am Tag der Transfektion ungefähr 70% betrug. Für die Transfektion wurden 1,25 µl Lipofectamine RNAiMax in 125 µl OPTIMEM Medium in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dann wurde 1,5 µl 20 µM siRNA in 125 µl OPTIMEM Medium gegeben. Die Lösungen wurden vorsichtig gemischt und ca. 20 min bei RT zur Komplexbildung inkubiert. Bei den Melanomzellen wurde vorsichtig das Medium abgesaugt und durch 1250 µl TU 2% Medium ersetzt. Dann wurde das Transfektionsgemisch zugegeben, so dass man mit 1,5 ml pro Well eine siRNA Endkonzentration von 20 nM erreicht hatte. Bei einer Versuchsdauer von über 3 Tagen wurden die Zellen am 3. Tag retransfiziert. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, durch 1250 µl frisches TU 2% Medium ersetzt und das Transfektionsgemisch in der oben beschriebenen Konzentration zugegeben.

2.4.11 Bestimmung der Zellproliferation

Der Anteil an lebenden Zellen wurde mit Hilfe des Cell Titer Blue Cell Viability Assay der Firma Promega bestimmt. Dieser Assay funktioniert nach dem Prinzip, dass lebende Zellen den Redoxfarbstoff Resazurin zu dem fluoreszierenden Resorufin umwandeln. Die Fluoreszenz kann dann bei 530 nm in einem Fluorimeter gemessen werden.

Die Zellen wurden in einer 6-Well Platte mit 50.000 Zellen pro Well angezüchtet. Für den Proliferationsassay wurde das Medium abgenommen und durch 750 µl frisches TU 2% Medium ersetzt. Dann wurden je Well 150 µl des Cell Titer-Blue Reagenz zugegeben und gründlich mit dem TU 2% Medium vermischt. Die Zellen wurden daraufhin im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurde aus jedem Well 100 µl der Flüssigkeit abgenommen, in eine 96-well Platte überführt und bei 530 nm in einem Fluorimeter gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von BRN2 in Melanomzelllinien

3.1.1 mRNA-Expression von BRN2

Die mRNA-Expression von BRN2 wurde in 13 humanen Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstufen mit quantitativer Real Time RT-PCR untersucht (Abbildung 3.1). BRN2-mRNA wurde in allen untersuchten Melanomzelllinien exprimiert. Die VGP-Zelllinien und hier besonders die Zelllinien WM278 und WM793 wiesen die höchste BRN2-Expression auf. Bei den metastatischen Zelllinien exprimierte 1205Lu am meisten BRN2. Im Vergleich zu Melanozyten war die Expression in den Melanomzelllinien bis zu 10^3 -fach erhöht. Die BRN2-Expression war auf Zellen melanozytären Ursprungs beschränkt. In humanen Keratinozyten und Fibroblasten ließ sich keine BRN2-mRNA nachweisen.

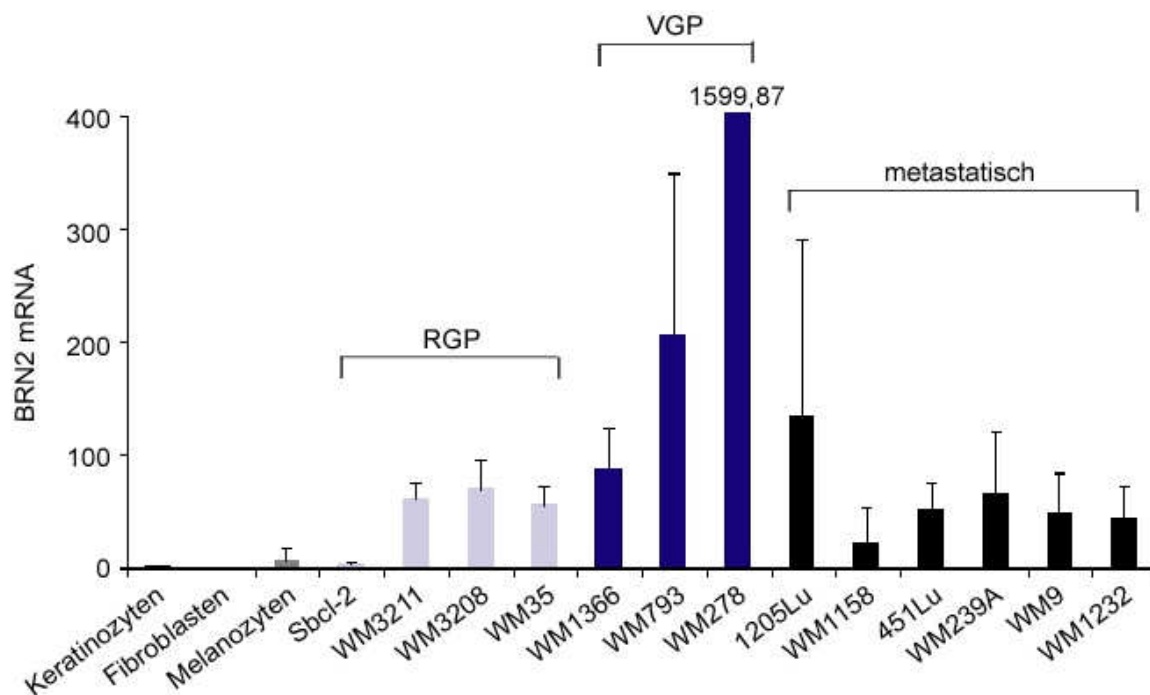


Abbildung 3.1: mRNA-Expression von BRN2 in Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstufen: Radiäre Wachstumsphase (RGP), vertikale Wachstumsphase (VGP) und metastatische Wachstumsphase (metastatisch). Die mRNA-Expression von BRN2 wurde mittels RT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung normalisiert zur mRNA-Expression von HPRT. Die Standardabweichung der Zelllinie WM278 betrug 444,95.

3.1.2 Proteinexpression von BRN2

Die Proteinexpression von BRN2 wurde mittels Western Blot ermittelt (Abbildung 3.2). Sie korrelierte in den verschiedenen Melanomzelllinien abgesehen von einigen Ausnahmen mit der mRNA-Expression von BRN2. BRN2-Protein wurde in 8 von 13 Melanomzelllinien, aber nicht in Melanozyten, Keratinozyten oder Fibroblasten exprimiert. Die höchste BRN2-Proteinmenge war in den Zelllinien WM278 und 1205Lu zu beobachten, die auch eine relativ hohe mRNA-Expression aufwiesen. Auch die metastatische Zelllinie WM9 zeigte viel BRN2-Protein. Die Zelllinien Sbc1-2 und WM1158, die auf mRNA-Ebene eine eher niedrige Expression aufwiesen, exprimierten kein BRN2-Protein. Ebenso war bei den RGP-Zelllinien WM3211, WM35 und WM3208 keine Proteinexpression von BRN2 nachweisbar. BRN2-Protein in der Zelllinie WM793, die eine relativ hohe mRNA-Expression von BRN2 zeigte, war im Western Blot nur als schwache Bande nachweisbar.

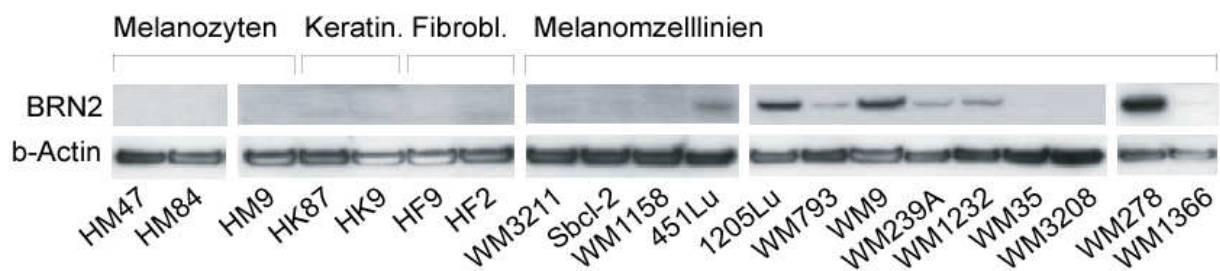


Abbildung 3.2: Proteinexpression von BRN2 in Melanozyten, Keratinozyten (Keratin.), Fibroblasten (Fibrobl.) und verschiedenen Melanomzelllinien. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot ermittelt. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten. Die Detektion von β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.2 Expression von OPN in Melanomzelllinien

3.2.1 mRNA-Expression von OPN

Die Expression von OPN-mRNA wurde in 13 verschiedenen Melanomzelllinien und in humanen Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten mittels Real Time RT-PCR untersucht (Abbildung 3.3). OPN-mRNA wurde in allen Melanomzelllinien exprimiert, allerdings schwankte die Höhe der Expression zwischen den verschiedenen Zelllinien stark. Eine eher niedrige OPN-Expression war in den Melanomzelllinien Sbc1-2, WM3211, WM3208, WM793 und 1205Lu zu beobachten. Die höchste mRNA-Expression von OPN zeigte sich in den Zelllinien WM35, WM278 und WM1232. Die höchste OPN-Expression war in den metastatischen Zelllinien zu beobachten. OPN-mRNA wurde auch in Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten exprimiert, allerdings in geringerem Ausmaß als in den meisten Melanomzelllinien. Auch im Vergleich mit der mRNA-Expression von OPN in humanen Knochenmarkszellen, die als Positivkontrolle dienten, war die Expression in den Melanomzellen höher (Expression von OPN-mRNA in Knochenmarkszellen nicht dargestellt).

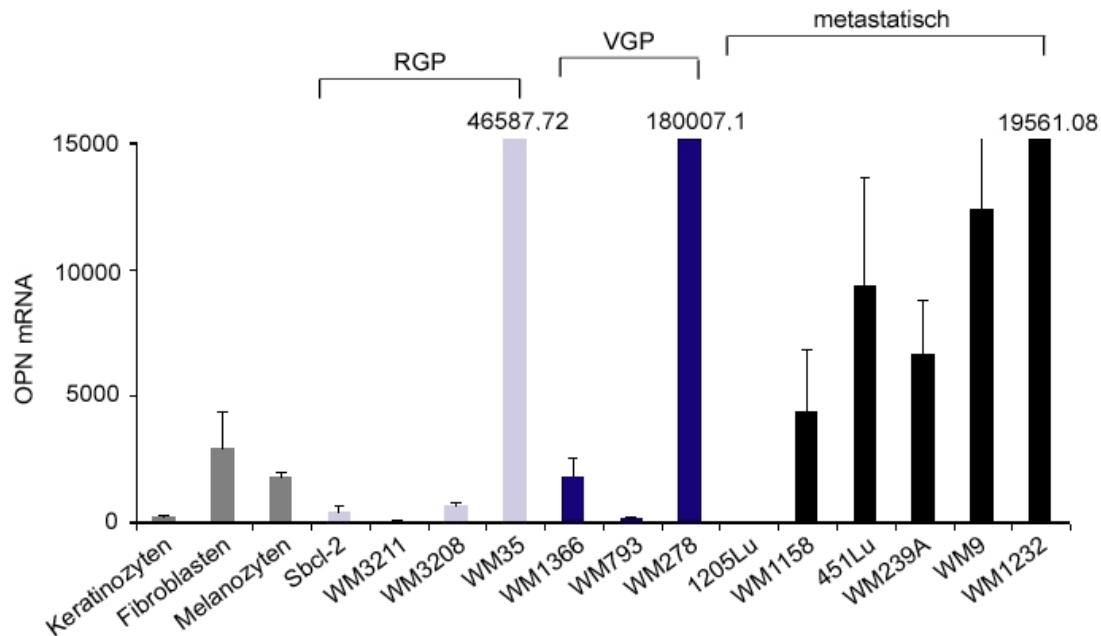


Abbildung 3.3: mRNA-Expression von OPN in Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstufen: Radiäre Wachstumsphase (RGP), vertikale Wachstumsphase (VGP) und metastatische Wachstumsphase (metastatisch). Die mRNA-Expression von OPN wurde mittels RT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung normalisiert zur mRNA-Expression von HPRT. Die Standardabweichung der Zelllinien WM35, WM278 und WM1232 betrug 27836,68, 135529,71 und 6801,20. Die mRNA-Expression von OPN betrug in der Zelllinie 1205Lu 18,48 mit einer Standardabweichung von 4,45.

3.2.2 Proteinexpression von OPN

Das OPN-Protein wurde entsprechend der mRNA-Expression von OPN in allen untersuchten Melanomzelllinien, Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten exprimiert (Abbildung 3.4). Im Gegensatz zu den RT-PCR Ergebnissen waren aber kaum Unterschiede in der Höhe der Proteinexpression zu beobachten. Die Melanomzelllinien Sbc1-2, WM3211, WM3208, WM793 und 1205Lu, die wenig OPN-mRNA exprimierten, zeigten auf Proteinebene eine relativ hohe Expression.

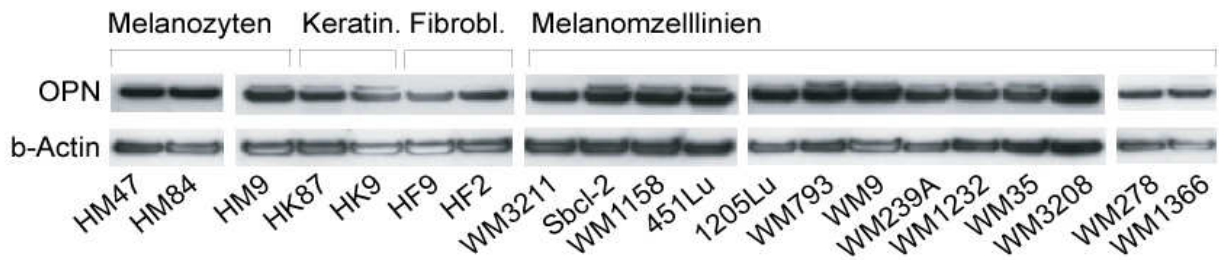


Abbildung 3.4: Proteinexpression von OPN in Melanozyten, Keratinozyten (Keratin.), Fibroblasten (Fibrobl.) und verschiedenen Melanomzelllinien. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot ermittelt. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten. Die Detektion von β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.2.3 Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von OPN

Die intrazelluläre Lokalisation von OPN wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung in den Zelllinien WM278 und 1205Lu untersucht (Abbildung 3.5). Das Protein färbte sich intranukleär sowie wie im Zytoplasma an.

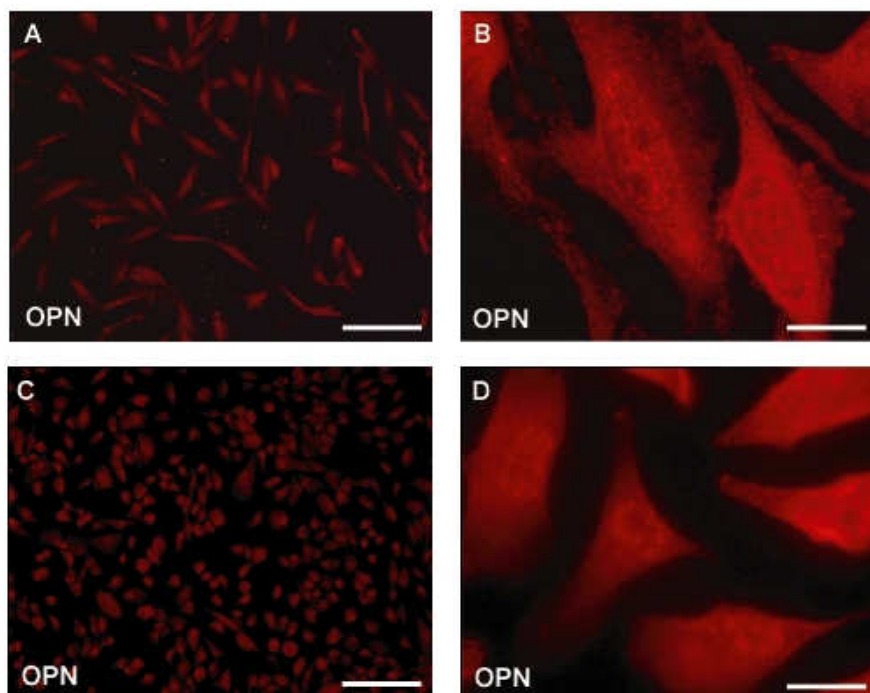


Abbildung 3.5: Immunfluoreszenzdarstellung von OPN (rote Färbung) in den Melanomzelllinien WM278 (A, B) und 1205Lu (C, D). Die Zellen wurden bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Mikroskop beobachtet und bei den Vergrößerungen $\times 100$ (A, C) und $\times 630$ (B, D) fotografiert. Messbalken = 100 μm (A, C) und Messbalken = 10 μm (B, D).

3.3 Die Rolle von BRN2 für die Expression von OPN

3.3.1 Korrelation der Expression von BRN2 und OPN

Um die Frage zu beantworten, ob OPN in Melanomzellen ein Zielgen von dem Transkriptionsfaktor BRN2 darstellt, wurde zunächst die Expression von BRN2 und OPN auf mRNA- und Proteinebene in den verschiedenen Melanomzelllinien verglichen (Abbildung 3.6). Auffällig war die hohe Expression von BRN2 und OPN auf mRNA- und Proteinebene in der VGP-Zelllinie WM278. Abweichungen ergaben sich im Vergleich der mRNA-Expression von BRN2 und OPN vor allem bei den Zelllinien WM35 und WM1232, die eine relativ hohe OPN-Expression, aber eine eher niedrige BRN2-Expression aufwiesen (Abbildung 3.6 A). Die Zelllinien WM793 und 1205Lu, die eine relativ hohe mRNA-Expression von BRN2 zeigten, exprimierten nur geringe Mengen an OPN-mRNA (Abbildung 3.6 A).

Im Hinblick auf die Proteinexpression zeigten die Zelllinien 1205Lu und WM9 eine vergleichbar hohe BRN2- und OPN-Expression (Abbildung 3.6 B).

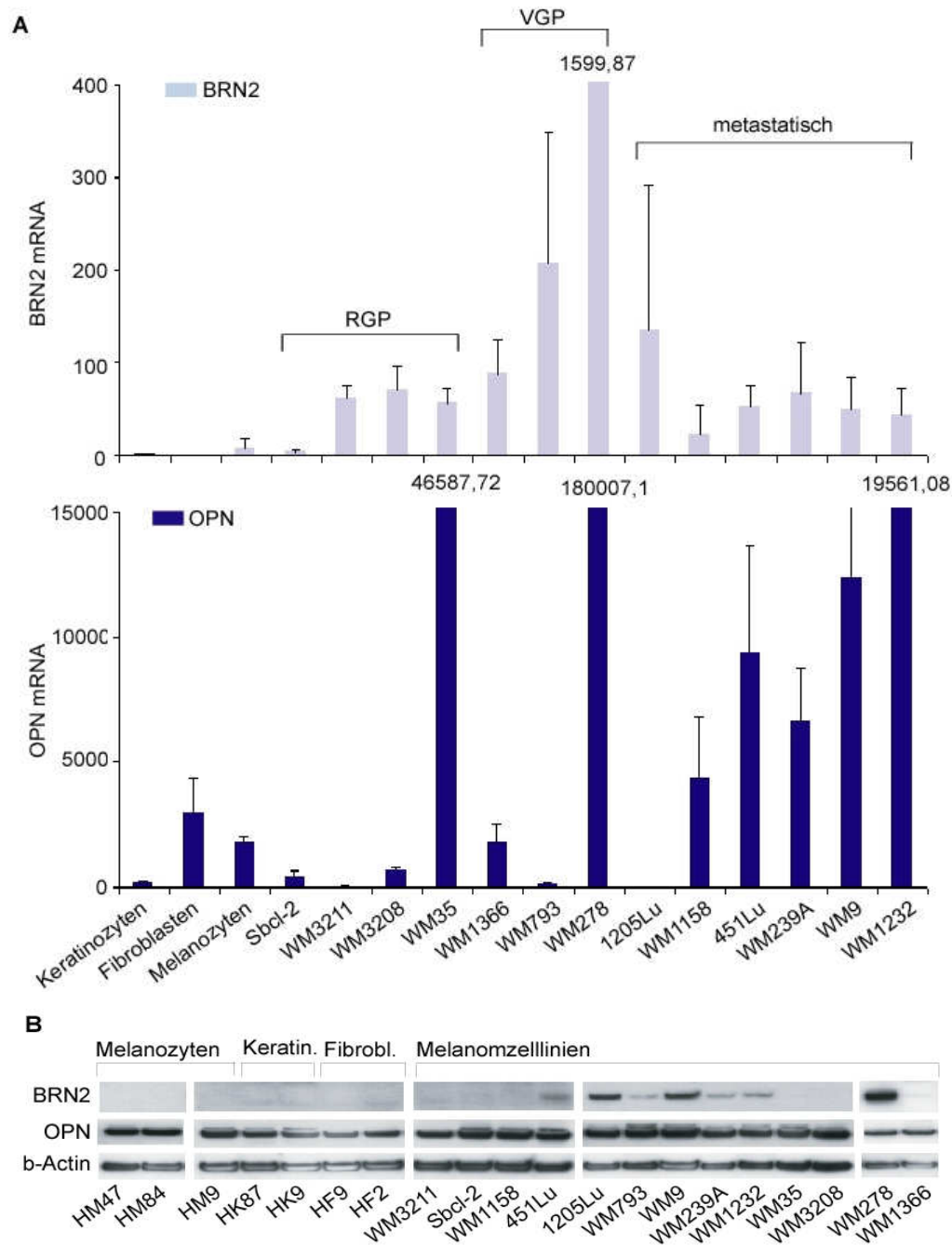


Abbildung 3.6: Vergleich der Expression von BRN2 und OPN auf mRNA (A)- und Proteinebene (B). Die mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung normalisiert zur mRNA-Expression von HPRT. Die Standardabweichung der Zelllinie WM278 betrug bei BRN2 444,95. Die Standardabweichung der Zelllinien WM35, WM278 und WM1232 betrug bei OPN 27836,68, 135529,71 und 6801,20. Die mRNA-Expression von OPN betrug bei Zelllinie 1205Lu 18,48 mit einer Standardabweichung von 4,45. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot ermittelt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten. Die Detektion von β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.3.2 Inhibition der Expression von BRN2 in Melanomzelllinien

BRN2 wurde mit einer BRN2-spezifischen siRNA in den Zelllinien 1205Lu, WM9 und WM278 gehemmt. Im Western Blot Verfahren wurde dann die Proteinexpression von BRN2 ermittelt (Abbildung 3.7).

Die Hemmung von BRN2 war in der Zelllinie 1205Lu am 2., 3. und 6. Tag nach siRNA-Transfektion effektiv, wobei die stärkste Hemmung am 3. und am 6. Tag zu beobachten war (Abbildung 3.7 A und B).

In der Zelllinie WM9 konnte ebenfalls eine effektive Hemmung der BRN2-Proteinexpression erreicht werden (Abbildung 3.7 C): Im Vergleich zu den Kontrollen war BRN2 am 2. Tag um 60% reduziert und am 3. Tag um 70%.

In der Zelllinie WM278 war die Hemmung von BRN2 geringer ausgeprägt als in den Zelllinien 1205Lu und WM9 (Abbildung 3.7 D), wobei sie auch hier am 3. Tag nach der Transfektion höher war als am 2. Tag.

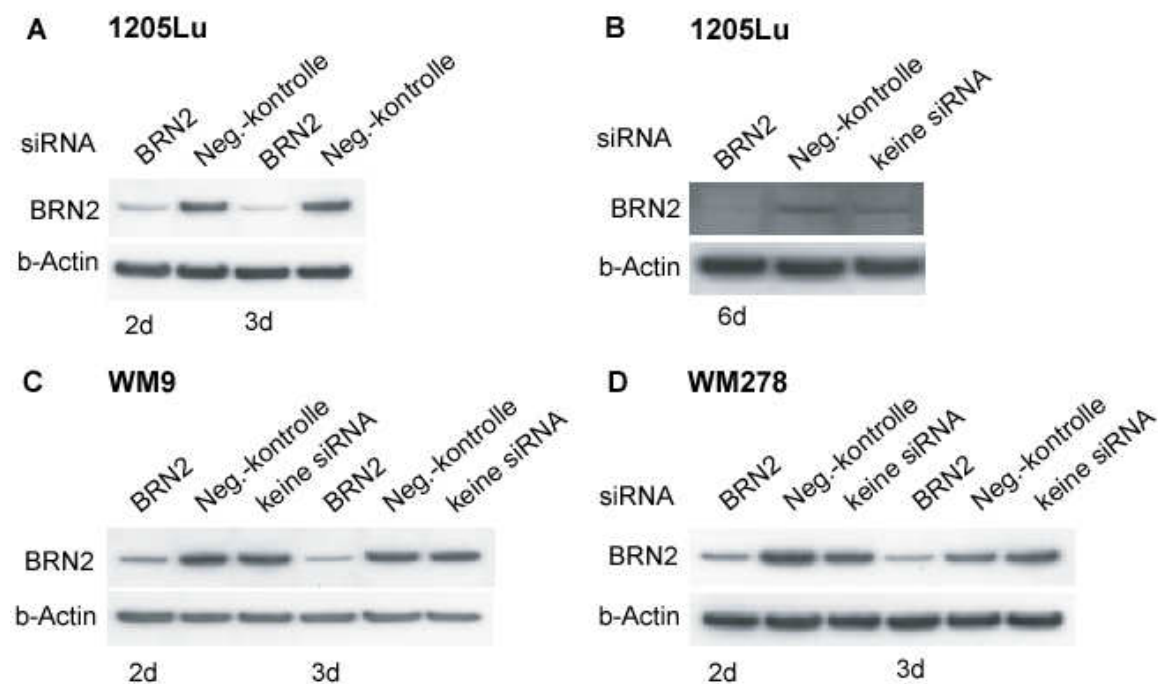


Abbildung 3.7: Inhibition der Expression von BRN2 mit siRNA in den Zelllinien 1205Lu (A, B), WM9 (C) und WM278 (D). Die Proteinexpression von BRN2 wurde am 2. Tag (2d), 3. Tag (3d) oder 6. Tag (6d) nach Transfektion mittels Western Blot ermittelt. Die Zellen wurden entweder mit BRN2-spezifischer siRNA (BRN2), Kontroll-siRNA (Neg.-kontrolle) oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA (keine siRNA) behandelt. Die Detektion von β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.3.3 Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Expression von OPN

Der Effekt der siRNA-vermittelten Hemmung von BRN2 auf die mRNA-Expression von OPN wurde in den Zelllinien WM9 und WM278 ermittelt (Abbildung 3.8 A und B). Beide Zelllinien hatten in den Vorversuchen eine relativ hohe mRNA-Expression von BRN2 und OPN gezeigt (Abbildung 3.6 A). Der Einfluss der Hemmung von BRN2 auf die mRNA-Expression von OPN wurde in der Zelllinie WM9 am 2. und am 6. Tag und in der Zelllinie WM278 am 3. und am 6. Tag nach Transfektion der Zellen mittels RT-PCR untersucht (Abbildung 3.8 A und B), da die Western Blot Ergebnisse gezeigt hatten, dass das BRN2-Protein in diesen Zelllinien bereits ab dem 2. Tag nach Transfektion der Zellen effektiv gehemmt war (Abbildung 3.7 C und D). Die OPN-mRNA-Expression der Zellen, die mit BRN2-spezifischer siRNA transfiziert worden waren, wurde mit Zellen verglichen, die entweder mit Kontroll-siRNA oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA behandelt worden waren. Bei den WM9- und WM278-Zellen unterschied sich in zwei unabhängigen Experimenten die OPN-mRNA-Expression der Zellen, die mit BRN2-spezifischer siRNA transfiziert worden waren, nicht signifikant von den Kontrollen.

Der Einfluss der Hemmung von BRN2 auf die Proteinexpression von OPN wurde in der Zelllinie 1205Lu untersucht (Abbildung 3.8 C). Diese Zelllinie hatte im Western Blot eine hohe Expression von BRN2 und OPN gezeigt (Abbildung 3.6 B). Die Proteinexpression von BRN2 und OPN wurde am 6. Tag nach Transfektion der Zellen mit einer Retransfektion am 3. Tag nach der ersten Transfektion ermittelt. Die Expression von BRN2 wurde durch die BRN2-spezifische siRNA gegenüber den Kontrollen effektiv gehemmt. Wie auch auf mRNA-Ebene hatte die Hemmung von BRN2 jedoch keinen Effekt auf die Proteinexpression von OPN. Die OPN-Proteinexpression der Zellen, die mit BRN2-spezifischer siRNA transfiziert worden waren, unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollen.

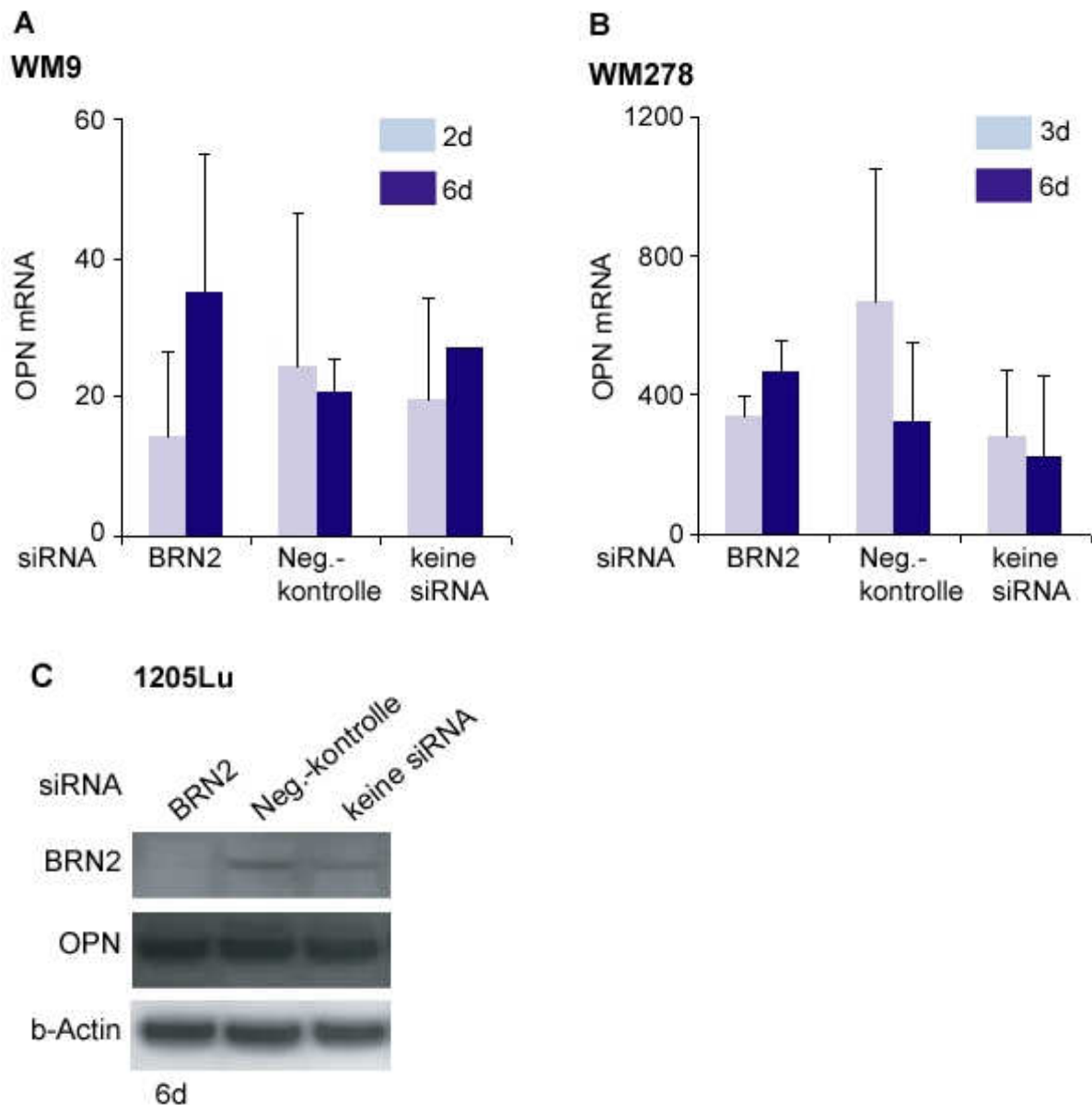


Abbildung 3.8: Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Expression von OPN auf mRNA

(A, B)- und Proteinebene (C). Die mRNA-Expression von OPN wurde in den Zelllinien WM9 (A) und WM278 (B) mittels RT-PCR am 2. Tag (2d), 3. Tag (3d) oder 6. Tag (6d) nach Transfektion ermittelt. Die Zellen wurden entweder mit BRN2-spezifischer siRNA (BRN2), Kontroll-siRNA (Neg.-kontrolle) oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA (keine siRNA) behandelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung normalisiert zur mRNA-Expression von HPRT. Die Proteinexpression von BRN2 und OPN wurde am 6. Tag (6d) nach Transfektion mit einer Retransfektion am 3. Tag nach der ersten Transfektion mittels Western Blot in der Zelllinie 1205Lu (C) ermittelt. Die Zellen wurden entweder mit BRN2-spezifischer siRNA (BRN2), Kontroll-siRNA (Neg.-kontrolle) oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA (keine siRNA) behandelt. Die Detektion von β -Actin diene als Ladekontrolle.

3.4 Expression von Nestin in Melanomzelllinien

3.4.1 mRNA-Expression von Nestin

Die mRNA-Expression von Nestin wurde in 13 verschiedenen Melanomzelllinien, Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten mittels Real Time RT-PCR untersucht (Abbildung 3.9). Mit Ausnahme der metastatischen Zelllinien WM1158 und 451Lu fand sich Nestin-mRNA in allen Melanomzelllinien. Die Höhe der Nestin-Expression variierte zwischen den verschiedenen Zelllinien und korrelierte nicht mit dem Progressionsgrad. Nestin-mRNA wurde auch in Melanozyten und Fibroblasten aber nicht in Keratinozyten exprimiert.

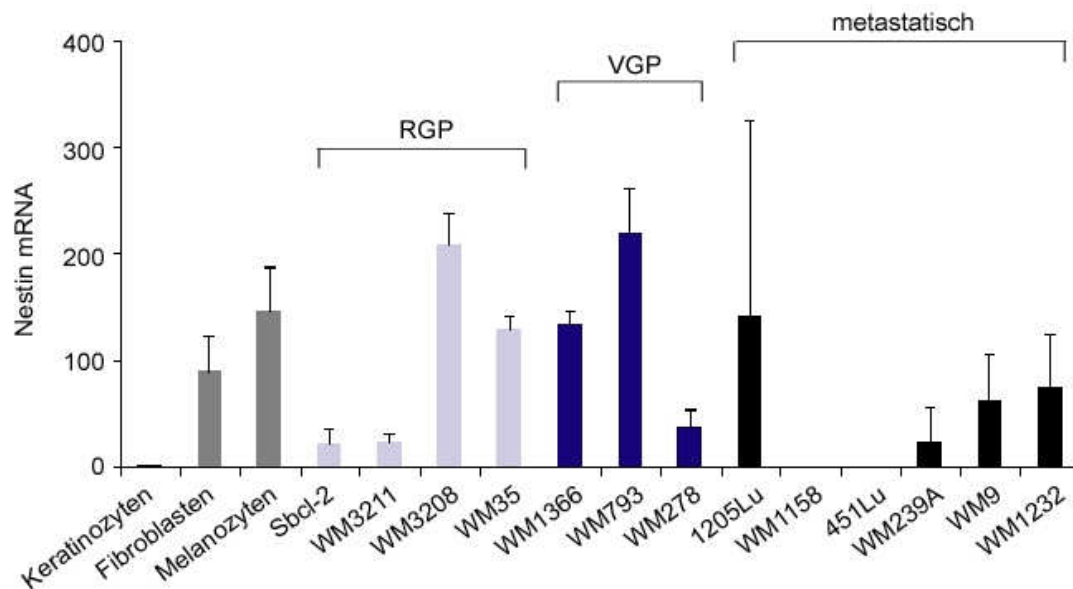


Abbildung 3.9: mRNA-Expression von Nestin in Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstufen: Radiäre Wachstumsphase (RGP), vertikale Wachstumsphase (VGP) und metastatische Wachstumsphase (metastatisch). Die mRNA-Expression von Nestin wurde mittels RT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung normalisiert zur mRNA-Expression von HPRT.

3.4.2 Proteinexpression von Nestin

Das Protein Nestin konnte mittels Western Blot Analyse in 12 von 13 Melanomzelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 3.10). Mit wenigen Ausnahmen korrelierte die Proteinexpression mit der mRNA-Expression. Abweichungen ergaben sich bei den metastatischen Zelllinien WM1158 und 451Lu, die keine Nestin-mRNA-Expression aber eine geringe Nestin-Proteinexpression aufwiesen. In der Zelllinie WM278 wurde gar kein Nestin-Protein gefunden.

In drei untersuchten Melanozytenkulturen wurde Nestin-Protein in sehr unterschiedlicher Menge gefunden (Abbildung 3.10).

Ebenfalls wurde Nestin in einer von zwei Fibroblastenkulturen gefunden, während Keratinozyten weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene Nestin exprimierten.

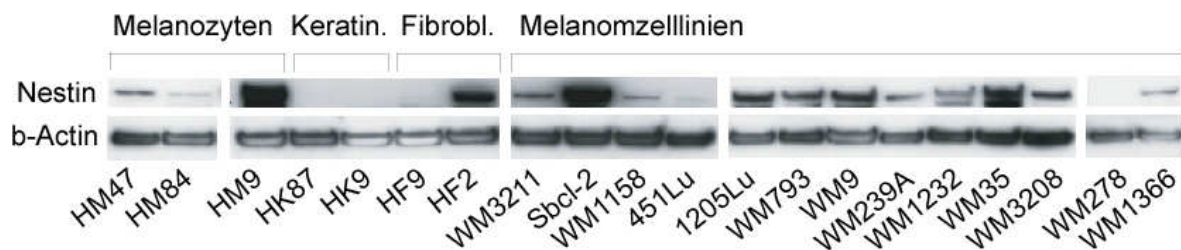


Abbildung 3.10: Proteinexpression von Nestin in Melanozyten, Keratinozyten (Keratin.), Fibroblasten (Fibrobl.) und verschiedenen Melanomzelllinien. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot ermittelt. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten. Die Detektion von β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.4.3 Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Nestin

Um die intrazelluläre Lokalisation von Nestin zu untersuchen, wurde Nestin mittels Immunfluoreszenz in der metastatischen Melanomzelllinie 1205Lu dargestellt (Abbildung 3.11). Diese Zellen erwiesen sich als besonders geeignet, weil sie zum einen recht schnell in Kultur wuchsen und zum anderen im Western Blot eine hohe Nestin-Expression gezeigt hatten. In der Immunfluoreszenz zeigte sich, dass das Intermediärfilament Nestin im gesamten Zytoplasma der Zellen und dort besonders perinukleär lokalisiert war. Der Zellkern färbte sich nicht an.

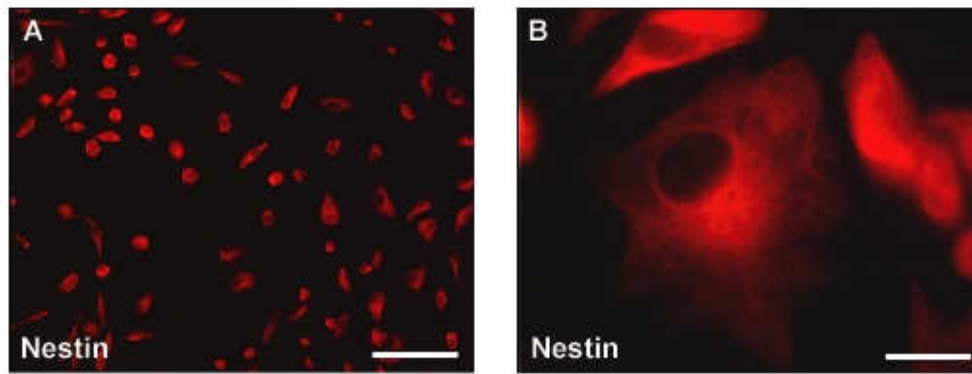


Abbildung 3.11: Immunfluoreszenzdarstellung von Nestin (rote Färbung) in der Melanomzelllinie 1205Lu (A, B). Die Zellen wurden bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Mikroskop beobachtet und bei den Vergrößerungen x100 (A) und x630 (B) fotografiert. Messbalken = 100 µm (A) und Messbalken = 10 µm (B).

3.5 Die Rolle von BRN2 für die Expression von Nestin

3.5.1 Korrelation der Expression von BRN2 und Nestin

Die mRNA-Expression von BRN2 korrelierte in einigen Zelllinien gut mit der Nestin-Expression (Abbildung 3.12 A). Die mRNA-Expression von BRN2 und Nestin war in den Zelllinien Sbcl-2, WM3211, WM239A, WM9 und WM1232 vergleichbar gering und in den Zelllinien WM1366, WM793 und 1205Lu vergleichbar hoch. Größere Abweichungen zwischen BRN2- und Nestin-mRNA waren in den Zelllinien WM3208, WM35 und WM278 zu beobachten.

Auf Proteinebene wurde eine starke Expression von BRN2 und Nestin in den Zelllinien 1205Lu und WM9 gefunden (Abbildung 3.12 B). Eine eher schwache Proteinexpression von BRN2 und Nestin zeigte sich in den Zelllinien WM793, WM239A und WM1232. Abweichungen in der Proteinexpression von BRN2 und Nestin ergaben sich vor allem in den Zelllinien Sbcl-2, WM35 und WM3208, die eine hohe Nestin-Expression aufwiesen, aber kein BRN2 exprimierten, und in der Zelllinie WM278 mit hoher BRN2-Expression ohne nachweisbarer Nestin-Expression.

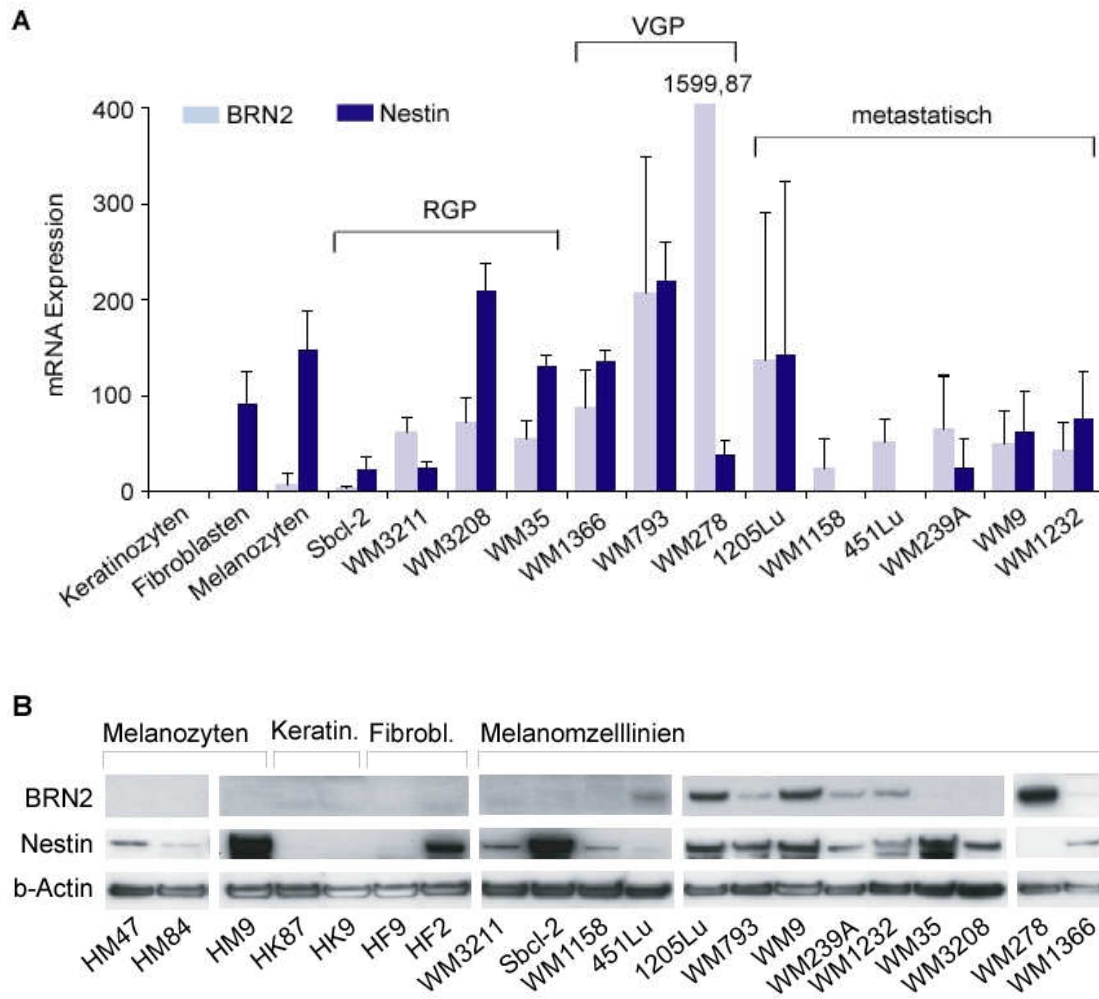


Abbildung 3.12: Vergleich der Expression von BRN2 und Nestin auf mRNA (A)- und Proteinebene (B). Die mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung normalisiert zur mRNA-Expression von HPRT. Die Standardabweichung der Zelllinie WM278 betrug 444,95. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot ermittelt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten. Die Detektion von β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.5.2 Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Expression von Nestin

Der Effekt der siRNA-vermittelten Hemmung von BRN2 auf die mRNA-Expression von Nestin wurde in den Zelllinien 1205Lu und WM9 ermittelt (Abbildung 3.13 A und B), die sich in den RT-PCR- und Western Blot Experimenten durch hohe BRN2- und Nestin-Expression ausgezeichnet hatten (Abbildung 3.12). Die Untersuchung erfolgte 3 Tage nach Transfektion der Zellen, nachdem vorher gezeigt werden konnte, dass BRN2-Protein in den Zelllinien 1205Lu und WM9 am 2. und 3. Tag nach Transfektion effektiv gehemmt war (Abbildung 3.7 A und C). Die mRNA-Expression von Nestin wurde im Vergleich zu Zellen, die entweder mit Kontroll-siRNA oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA behandelt worden waren, gemessen. Bei den 1205Lu- und WM9-Zellen wurde in zwei unabhängigen Experimenten kein Einfluss der Hemmung von BRN2 auf die mRNA-Expression von Nestin festgestellt. Die Nestin-mRNA-Expression der Zellen, die mit BRN2-spezifischer siRNA transfiziert worden waren, unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollen.

Der Einfluss von BRN2 auf die Expression von Nestin wurde auch auf Proteinebene evaluiert. Für dieses Experiment wurde die metastatische Zelllinie 1205Lu ausgewählt, die eine hohe Proteinexpression von BRN2 und Nestin gezeigt hatte (Abbildung 3.12 B). Die Proteinexpression von BRN2 und Nestin wurde mittels Western Blot am 6. Tag nach Transfektion der Zellen mit einer Retransfektion am 3. Tag ermittelt (Abbildung 3.13 C). Die BRN2-Proteinexpression wurde durch die BRN2-spezifische siRNA effektiv gehemmt. Wie auch auf mRNA-Ebene hatte die Hemmung von BRN2 jedoch keinen Effekt auf die Proteinexpression von Nestin.

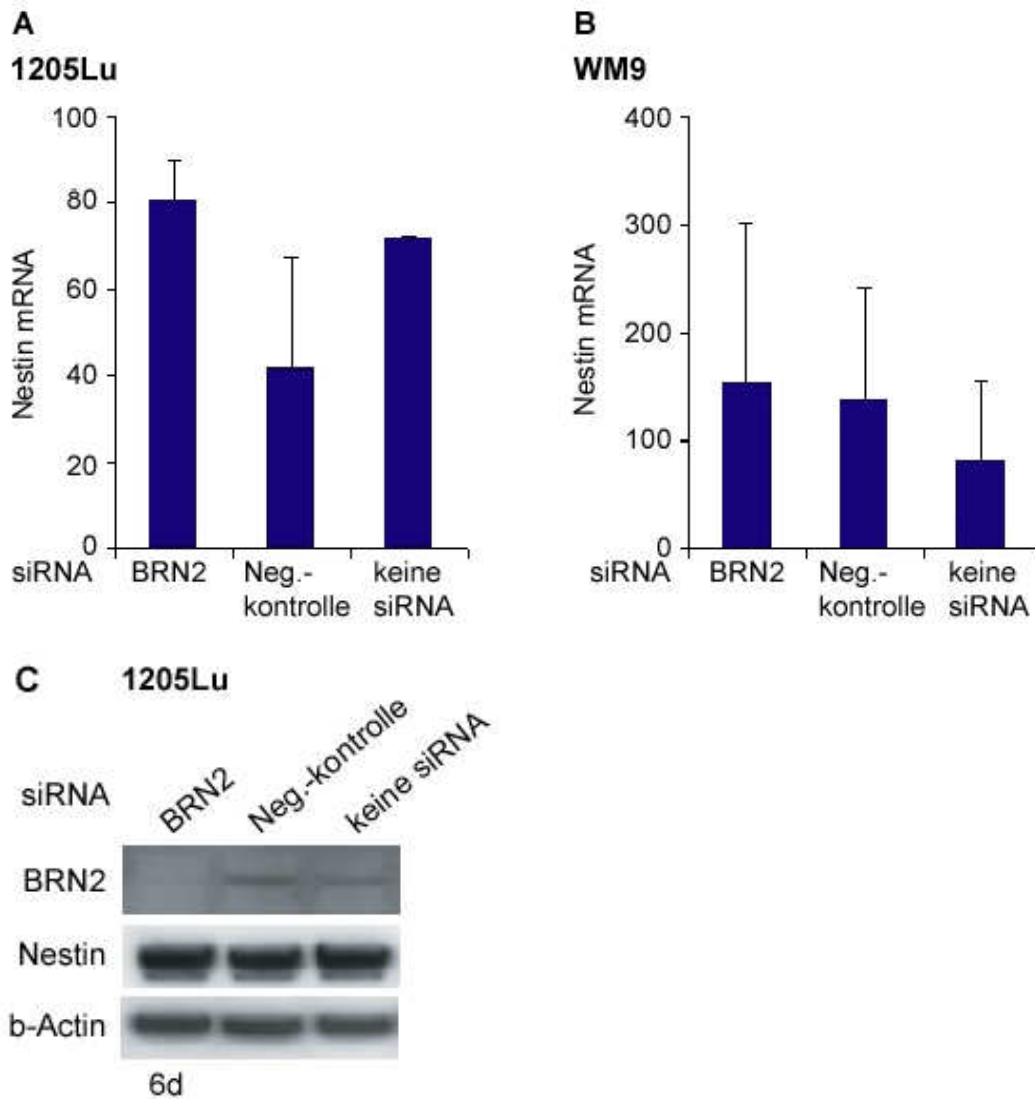


Abbildung 3.13: Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Expression von Nestin auf mRNA (A, B)- und Proteinebene (C). Die mRNA-Expression von Nestin wurde in den Zelllinien 1205Lu (A) und WM9 (B) mittels RT-PCR am 3. Tag nach Transfektion der Zellen ermittelt. Die Zellen wurden entweder mit BRN2-spezifischer siRNA (BRN2), Kontroll-siRNA (Neg.-kontrolle) oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA (keine siRNA) behandelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung normalisiert zur mRNA-Expression von HPRT. Die Proteinexpression von BRN2 und Nestin wurde am 6. Tag (6d) nach Transfektion mit einer Retransfektion am 3. Tag nach der ersten Transfektion mittels Western Blot in der Zelllinie 1205Lu (C) ermittelt. Die Zellen wurden entweder mit BRN2-spezifischer siRNA (BRN2), Kontroll-siRNA (Neg.-kontrolle) oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA (keine siRNA) behandelt. Die Detektion von β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.6 Effekt der Inhibition von BRN2 auf die Zellproliferation

Lichtmikroskopische Beobachtungen der Zellen nach Transfektion mit der BRN2-spezifischen siRNA deuteten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor BRN2 eine pro-proliferative Rolle in Melanomzellen haben könnte. Am 6. Tag nach Transfektion der Zelllinien WM9 und 1205Lu mit einer Retransfektion der Zellen am 3. Tag fiel auf, dass die Anzahl der mit BRN2-spezifischer siRNA transfizierten Zellen geringer war (Abbildung 3.14 A). Außerdem waren sowohl bei den mit BRN2-spezifischer siRNA transfizierten Zellen als auch bei den Kontrollen am 6. Tag nach Transfektion viele tote Zellen zu beobachten.

Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt und die Anzahl an lebenden Zellen am 5. Tag nach Transfektion mit einer Retransfektion am 2. Tag beurteilt. Der Anteil an lebenden Zellen war bei den BRN2-gehemmten Zellen um ungefähr 60% geringer als bei der Negativkontrolle (Abbildung 3.14 B).

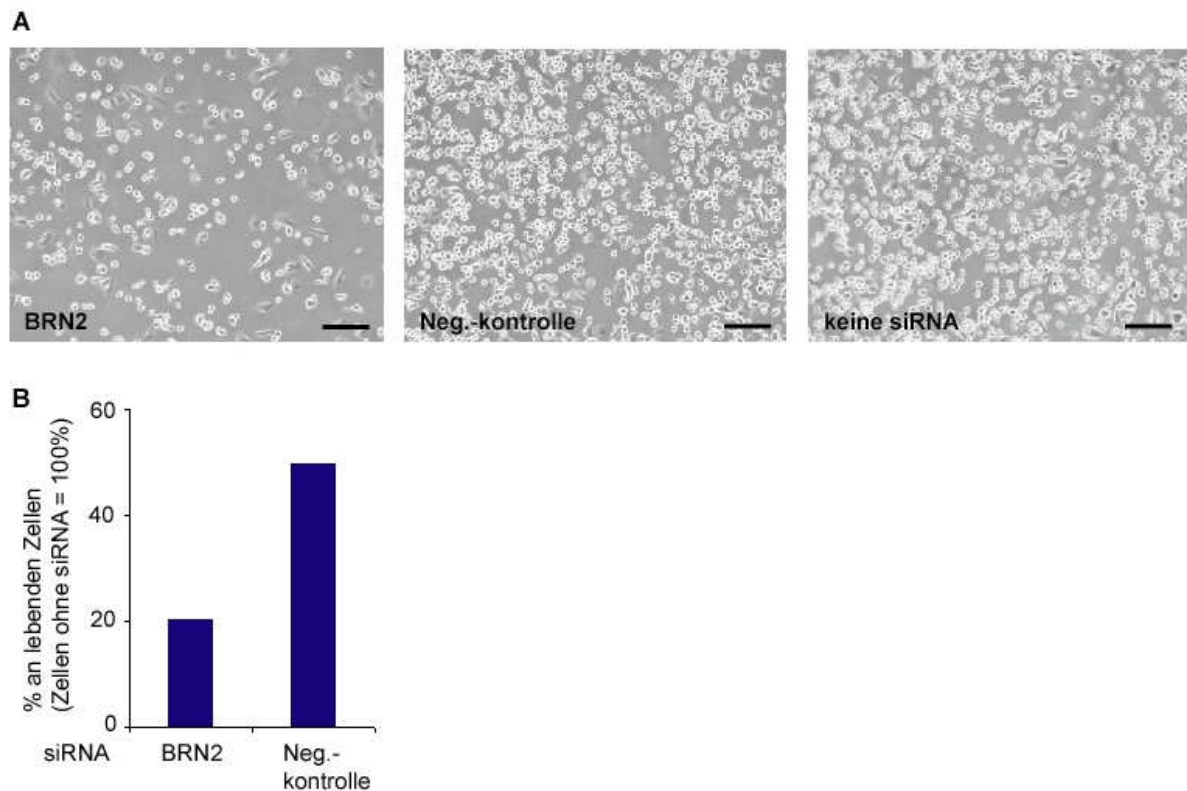


Abbildung 3.14: BRN2 erhöht die Proliferation in der metastatischen Melanomzelllinie WM9. Fotografische Darstellung der Zelllinie WM9 (A) bei einer Vergrößerung von x50 am 6. Tag nach Transfektion der Zellen mit BRN2-spezifischer siRNA (BRN2), Kontroll-siRNA (Neg.-kontrolle) oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA (keine siRNA) und Retransfektion am 3. Tag. Messbalken = 100 µm.

Quantifizierung des Anteils an lebenden Zellen am 5. Tag nach Transfektion mit BRN2-spezifischer siRNA (BRN2), Kontroll-siRNA (Neg.-kontrolle) oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA und Retransfektion am 2. Tag durch einen Proliferationsassay (B). Die Fluoreszenz der mit Lipofectamine-RNAiMax ohne siRNA behandelten Zellen wurde gleich 100% gesetzt.

3.7 Koexpression von SOX9 und SOX10 mit Nestin im malignen Melanom

Die Expression von SOX9 und SOX10 wurde mittels Immunhistochemie in Melanomgewebeschnitten zweier verschiedener Primärtumoren bestimmt (Abbildung 3.15). Beide Tumoren zeigten eine starke SOX9-Expression. Die Färbungen von SOX10 waren im Vergleich zu den Färbungen von SOX9 in der Intensität schwächer. Es wurde eine Koexpression von SOX9 und SOX10 mit Nestin beobachtet.

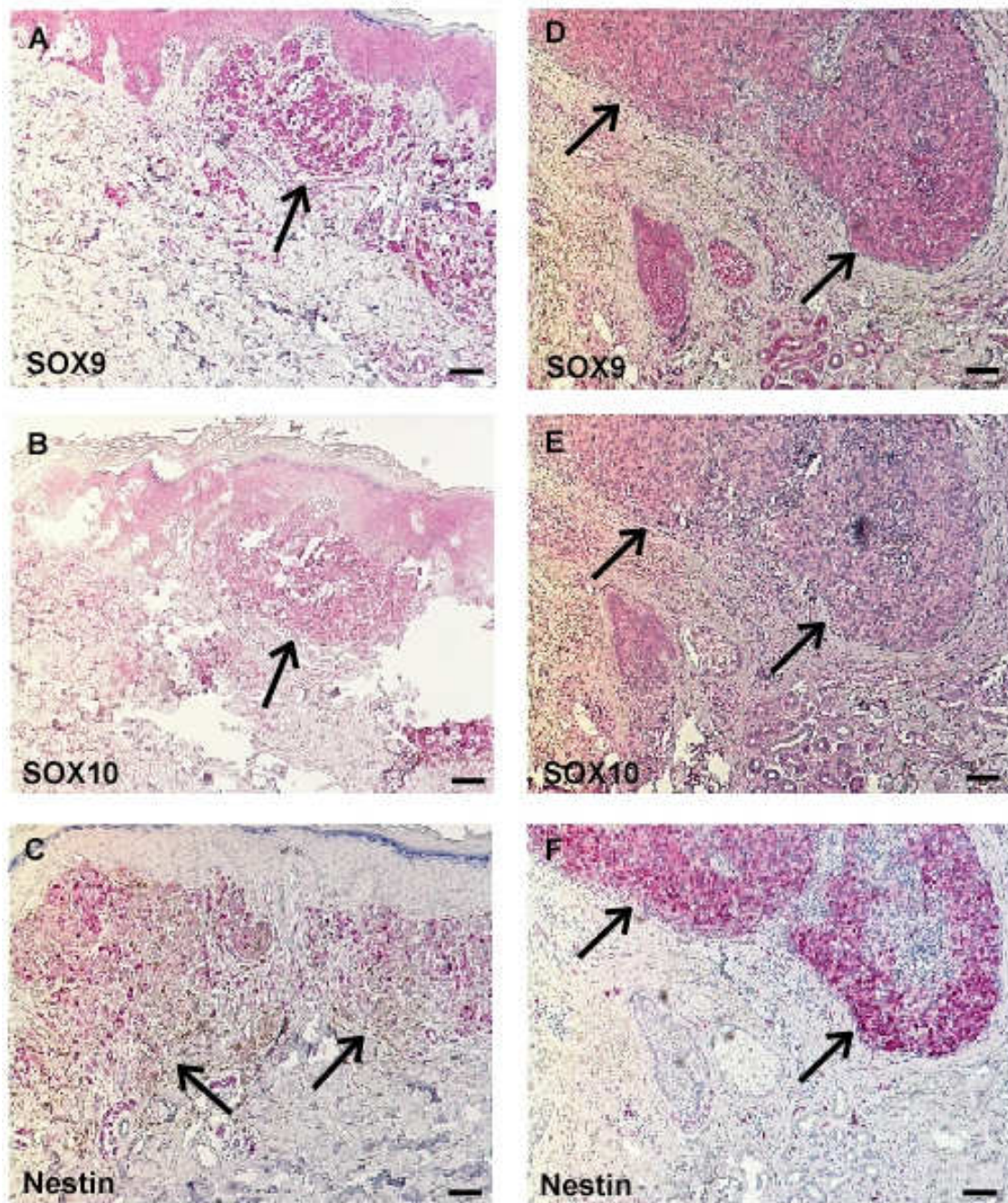


Abbildung 3.15: Immunhistochemische Darstellung (rote Färbung) der Expression von SOX9 (A, D), SOX10 (B, E) und Nestin (C, F) in Melanomgewebeschnitten zweier unterschiedlicher Primärtumoren (Pfeile deuten auf den Tumor) der Haut (A bis C und D bis F). Messbalken = 100 μ m.

3.8 Die Rolle von SOX9 und SOX10 für die Expression von Nestin

3.8.1 Inhibition der Expression von SOX9 und SOX10 in Melanomzelllinien

Die Hemmung der Transkriptionsfaktoren SOX9 und SOX10 wurde sowohl als Einzeltransfektion als auch als Kotransfektion in den Zelllinien 1205Lu, WM793 und WM239A durchgeführt (Abbildung 3.16).

Der Einfluss der Hemmung von SOX9 auf die SOX9-Proteinexpression wurde in der Zelllinie 1205Lu am 2. Tag und am 3. Tag nach Transfektion mit SOX9-spezifischer siRNA untersucht (Abbildung 3.16 A und B). Sowohl am 2. als auch am 3. Tag nach Transfektion der Zellen ließ sich eine Hemmung der SOX9-Proteinexpression gegenüber den Kontrollen beobachten. Die Hemmung war dabei am 2. Tag nach Transfektion effektiver.

SOX10 wurde in den Zelllinien 1205Lu, WM793 und WM239A mittels SOX10-spezifischer siRNA gehemmt und die SOX10-Proteinexpression mittels Western Blot am 2. und am 3. Tag nach Transfektion untersucht (Abbildung 3.16 A bis D). Die Hemmung von SOX10 war in der Zelllinie 1205Lu am 2. und am 3. Tag nach Transfektion effektiv, wobei die Hemmung am 2. Tag ausgeprägter war als am 3. Tag (Abbildung 3.16 A und B).

In den Zelllinien WM793 und WM239A wurde die SOX10-Proteinexpression am 2. Tag nach Transfektion der Zellen untersucht (Abbildung 3.16 C und D). Die Hemmung von SOX10 war in der Zelllinie WM793 gegenüber der Zelllinie WM239A effektiver.

Nach Kotransfektion der Zelllinie 1205Lu mit SOX9- und SOX10-spezifischer siRNA zeigte sich am 2. Tag und am 3. Tag nach Transfektion eine Verringerung der SOX9- und SOX10-Proteinexpression (Abbildung 3.16 A und B). In den Zelllinien WM793 und WM239A führte die Kotransfektion mit SOX9- und SOX10-spezifischer siRNA zu einer Reduktion der SOX10-Proteinexpression gegenüber den Kontrollen (Abbildung 3.16 C und D). Die Hemmung von SOX9 hatte keinen Einfluss auf die SOX10-Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 3.16 C und D).

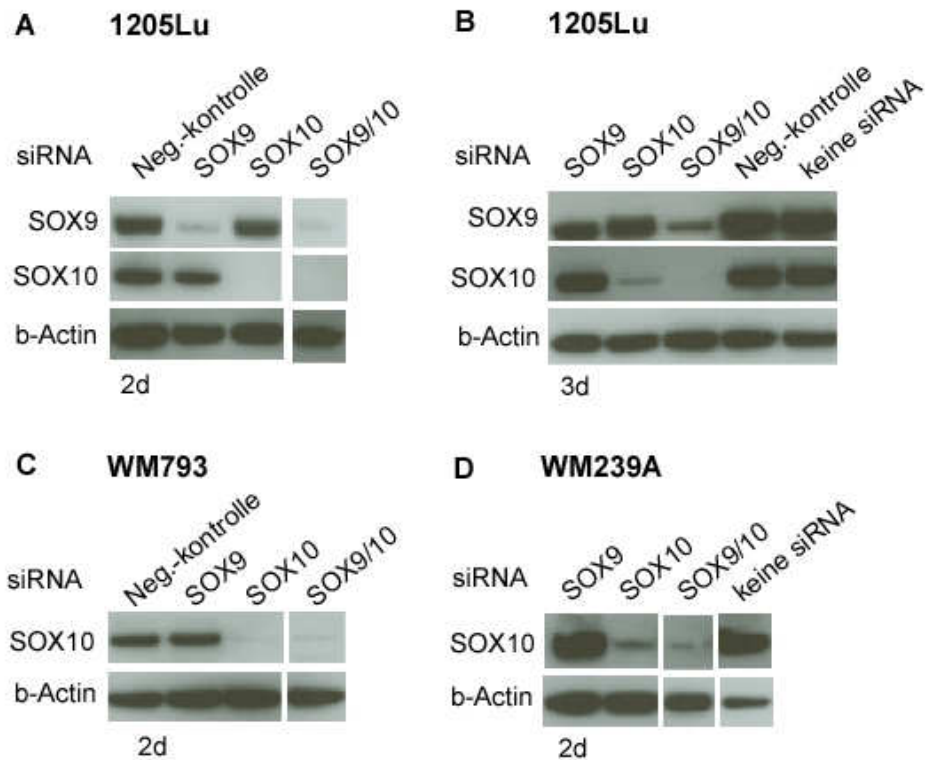


Abbildung 3.16: Inhibition der Expression von SOX9 und SOX10 mit siRNA in den Zelllinien 1205Lu (A, B), WM793 (C) und WM239A (D). Die Proteinexpression der SOX-Faktoren wurde am 2. Tag (2d) bzw. am 3. Tag (3d) nach Transfektion mittels Western Blot ermittelt. Die Zellen wurden mit SOX9- oder SOX10-spezifischer siRNA (SOX9 bzw. SOX10), Kontroll-siRNA (Neg.-kontrolle) oder Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA (keine siRNA) behandelt oder mit SOX9- und SOX10-spezifischer siRNA kotransfiziert (SOX9/10). Die Detektion von β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.8.2 Effekt der Inhibition von SOX9 und SOX10 auf die Expression von Nestin

Um die Rolle von SOX9 und SOX10 für die Nestin-Expression zu untersuchen, wurde die Expression dieser Proteine mittels siRNA in den Zelllinien 1205Lu, WM793 und WM239A gehemmt und dann die Nestin-Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht (Abbildung 3.17).

Die mRNA- und Proteinexpression von SOX9 und SOX10 war in der Zelllinie 1205Lu am 2. Tag nach Transfektion der Zellen gegenüber den Kontrollen effektiv gehemmt (Abbildung 3.17 A und B). Sowohl die Hemmung von SOX9 als auch von SOX10 führte zu einer verminderten mRNA-Expression von Nestin, wobei die Hemmung von SOX9 auf mRNA-Ebene zu einer ausgeprägteren Inhibition von Nestin führte als die Hemmung von SOX10. Auf Proteinebene führte die Hemmung von SOX9 und SOX10 ebenfalls zu einer Hemmung der Nestin-Expression gegenüber den Kontrollen. Kotransfektion der 1205Lu Zellen mit SOX9- und SOX10-spezifischer siRNA hatte eine synergistische Reduktion der Nestin-Expression auf mRNA- und Proteinebene zur Folge.

Auch in der Zelllinie WM793 führte die Hemmung von SOX9 und SOX10 zu einer Reduktion der Nestin-Expression auf mRNA- und Proteinebene (Abbildung 3.17 C und D). Die Hemmung von SOX9 und SOX10 war am 2. Tag nach Transfektion der Zellen effektiv und führte auf mRNA-Ebene zu einer Reduktion der Nestin-Expression gegenüber den Kontrollen. Die Nestin-Proteinexpression war auch leicht gegenüber der Kontrolle vermindert. Wie schon bei der Zelllinie 1205Lu beobachtet, führte die Kotransfektion mit SOX9- und SOX10-spezifischer siRNA zu einer synergistischen Inhibition der Nestin-mRNA- und Proteinexpression.

In der Zelllinie WM239A wurde der Einfluss der siRNA-vermittelten Hemmung der SOX9- und SOX10-Expression auf die Nestin-Proteinexpression untersucht (Abbildung 3.17 E). Am 2. Tag nach Transfektion der Zellen war die Nestin-Expression im Vergleich mit der Kontrolle vermindert. Die Kotransfektion mit SOX9- und SOX10-spezifischer siRNA führte zu einer synergistischen Reduktion der Nestin-Proteinexpression.

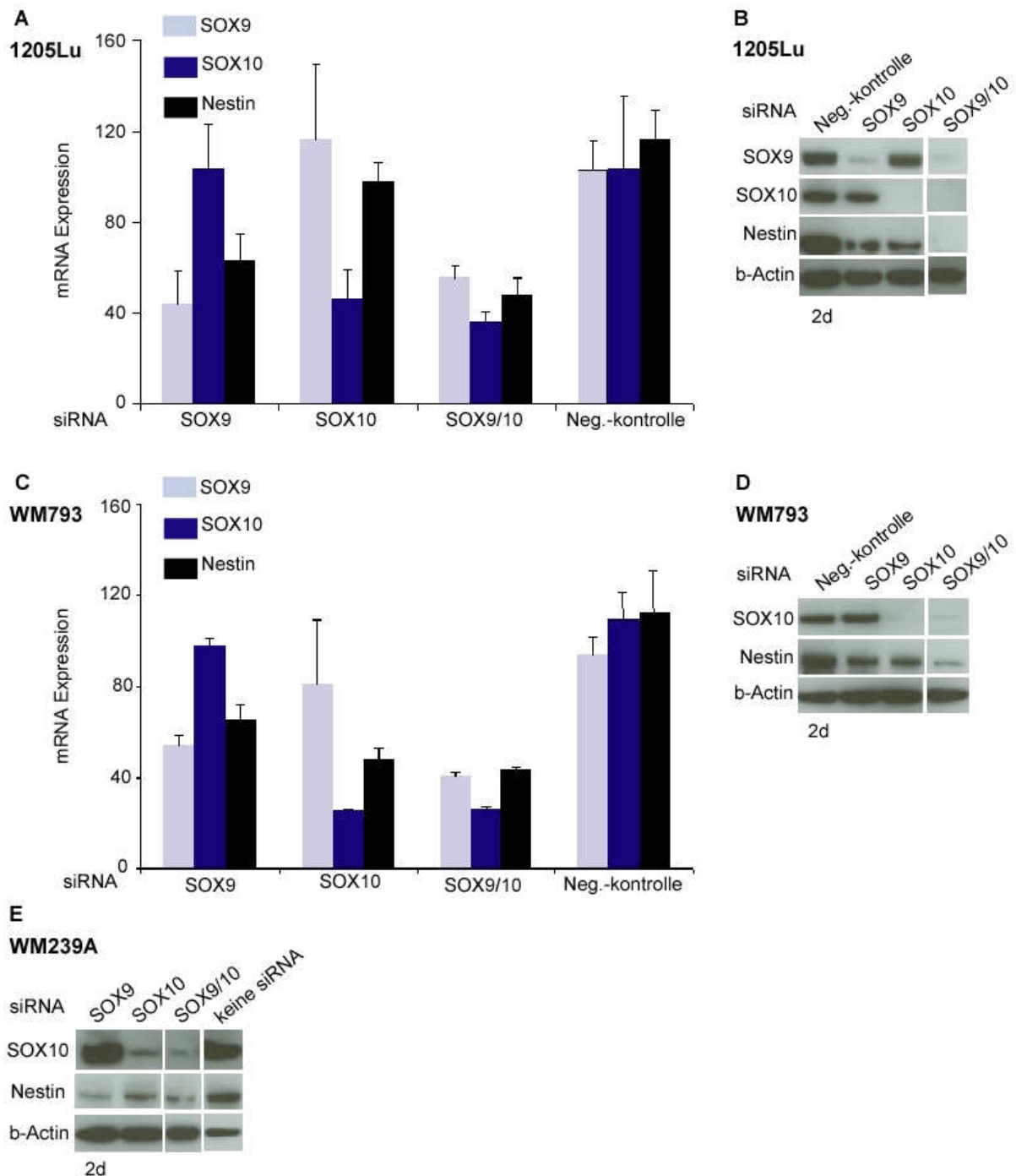


Abbildung 3.17: Effekt der Inhibition von SOX9 und SOX10 auf die Expression von Nestin auf mRNA- und Proteinebene in den Melanomzelllinien 1205Lu (A, B), WM793 (C, D) und WM239A (E). Am 2. Tag nach Transfektion der Zellen mit SOX9- oder SOX10-spezifischer siRNA (SOX9 bzw. SOX10), Kontroll-siRNA (Neg.-kontrolle), Lipofectamine-RNAiMax-Reagenz ohne siRNA (keine siRNA) oder Kotretransfektion mit SOX9- und SOX10-spezifischer siRNA (SOX9/10) wurde die mRNA- und Proteinexpression von Nestin mittels RT-PCR und Western Blot ermittelt. Bei den RT-PCR Versuchen sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung normalisiert zur mRNA-Expression von HPRT dargestellt (A, C). Bei den Western Blot Versuchen diente β -Actin als Ladekontrolle (B, D, E).

4. Diskussion

4.1 Die Rolle von BRN2 im malignen Melanom

Dass der POU-Transkriptionsfaktor BRN2 eine wichtige Rolle bei der Melanomprogression spielt, wurde vermutet, weil in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass die BRN2-Expression in Melanomzelllinien gegenüber Melanozyten erhöht war (Cox et al., 1988; Thomson et al., 1993; Eisen et al., 1995). Eisen et al. wiesen in Melanomzelllinien eine ca. 10-fach höhere mRNA-Expression von BRN2 als in Melanozyten nach (Eisen et al., 1995). In immunhistochemischen Färbungen von Melanomgewebe und gutartigen melanozytären Nävi konnte in unserer Arbeitsgruppe BRN2 in 34 von 48 (71%) Primärtumoren und 15 von 23 (65%) Nävi nachgewiesen werden (Maier et al., 2006).

Um die Rolle von BRN2 im malignen Melanom näher zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit die mRNA- und Proteinexpression von BRN2 in 13 verschiedenen humanen Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstufen untersucht und mit der Expression in Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten verglichen. BRN2-mRNA war in allen untersuchten Melanomzelllinien nachweisbar. Im Vergleich zur mRNA-Expression von BRN2 in Melanozyten war sie in den Melanomzelllinien bis zu 10^3 -fach erhöht. Die höchste BRN2-mRNA-Expression war in den invasiv wachsenden Zelllinien (VGP) und hier besonders in den Zelllinien WM278 und WM793 zu beobachten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den immunhistochemischen Studien von Maier et al., in denen VGP-Melanome eine höhere BRN2-Proteinexpression aufwiesen als RGP-Melanome (Maier et al., 2006). Die hohe Expression von BRN2 in WM278 und WM793 könnte mit dem Vorhandensein von BRAF-V600E-Mutationen in diesen Zelllinien verbunden sein (Smalley et al., 2006). Bei BRAF handelt es sich um eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die im malignen Melanom in 50-70% der Fälle mutiert ist (Wellbrock et al., 2008). Die V600E-Mutation, bei der an der Position 600 eine Glutaminsäure gegen Valin ausgetauscht ist, ist mit über 90% die häufigste Mutation (Davies et al., 2002). Sie führt zu einer fast 500-fachen Aktivierung von BRAF (Wan et al., 2004) und damit über die Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges zu einer Förderung der Proliferation und des Überlebens von Melanomzellen (Wellbrock et al., 2008). BRN2 wurde in Melanomzellen als nachgeschaltetes Gen von onkogenem BRAF

beschrieben und führt in dieser Zellart zu einer erhöhten Proliferation und Invasion (Goodall et al., 2004a; Goodall et al., 2008).

Auf Proteinebene konnte in drei untersuchten Melanozytenlinien in dieser Arbeit kein BRN2 nachgewiesen werden. Es ist gezeigt worden, dass BRN2 in Melanozyten in vitro in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen exprimiert wird. Cook et al. fanden BRN2 nur in Melanozyten, die unter Zusatz der Wachstumsfaktoren ET-3, SCF und FGF-2 kultiviert wurden und dadurch eher Melanoblasten glichen aufgrund einer reduzierten Pigmentbildungsfähigkeit, veränderten Morphologie und erhöhten Proliferationsrate im Vergleich zu differenzierten Melanozyten (Cook et al., 2003). Da ET-3, SCF und FGF-2 allerdings auch in dieser Arbeit verwendet wurden, werden spenderabhängige Unterschiede oder noch andere Kultivierungsunterschiede vermutet, die einen Einfluss auf die BRN2-Expression haben.

Um Hinweise auf die Funktion von BRN2 in Melanomzellen zu erhalten, wurde die Methode der RNA-Interferenz angewendet. Darunter versteht man einen Mechanismus, bei dem doppelsträngige RNA (dsRNA) zu einer sequenzspezifischen Hemmung von Genen führt (Wall et al., 2003). Der Begriff der RNAi wurde eingeführt, nachdem die Beobachtung gemacht wurde, dass dsRNA-Moleküle im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* mit der Expression von den Genen interferierten, welche die komplementäre Sequenz zu der exogen zugeführten RNA trugen (Fire et al., 1998). Dieser Mechanismus bot die Möglichkeit, im Labor die Funktion von Genen zu untersuchen. Der molekularbiologische Einsatz der RNAi wurde allerdings zunächst dadurch eingeschränkt, dass dsRNA-Moleküle, die länger als 30 Nukleotide waren, über die Typ-I-Interferon-Antwort zu dramatischen Veränderungen im Zellmetabolismus führten (Gil et al., 2000). Es konnten jedoch Wege gefunden werden, diese unspezifischen Effekte zu umgehen. Elbashir et al. machten die Entdeckung, dass die Transfektion von synthetisch hergestellter, aus 21 Nukleotiden bestehender small interfering RNA (siRNA) zu einer hoch selektiven und sequenzspezifischen Hemmung von endogenen Genen führte (Elbashir et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde die BRN2-Expression mit siRNA in drei verschiedenen Melanomzelllinien gehemmt. Am 2. und 3. Tag nach Transfektion der Zellen konnte eine effektive Reduktion der BRN2-Proteinexpression erzielt werden. Lichtmikroskopische Beobachtungen der Melanomzelllinien WM9 und 1205Lu deuteten darauf hin, dass die Anzahl der BRN2-gehemmten Zellen gegenüber den Kontrollen vermindert war. Zur Quantifizierung wurde ein Proliferationsassay

durchgeführt. Im Vergleich zu den Kontrollen war die Zellvitalität der BRN2-gehemmten WM9-Melanomzellen um etwa 60% reduziert. Dieses Ergebnis wies auf proliferationsfördernde Eigenschaften von BRN2 in Melanomzellen hin. Ähnliche Beobachtungen wurden von Goodall et al. gemacht, die BRN2 in Melan-A-Melanozyten überexprimierten und eine erhöhte Zellproliferation feststellten (Goodall et al., 2004a). Die siRNA vermittelte Inhibition von BRN2 in der Melanomzelllinie WM266.4 führte zu einer verminderten Zellproliferation (Goodall et al., 2004a), was sich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit deckt.

Da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass POU-Transkriptionsfaktoren an der Regulation des Promotors von Osteopontin (OPN) beteiligt sind (Botquin et al., 1998; Wang et al. 2000), sollte in dieser Arbeit die Rolle von BRN2 für die OPN-Expression in Melanomzellen näher untersucht werden.

OPN ist ein multifunktionales Protein der extrazellulären Matrix, das in verschiedenen Tumortypen über Apoptoseinhibition, Migration und Invasion den metastatischen Phänotyp bestimmt (Wai et al., 2008).

In Melanomgeweben wurde die Expression von OPN in verschiedenen Studien mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht (Zhou et al., 2005; Maier et al., 2006; Smith et al., 2005; Jaeger et al., 2007). In zwei dieser Studien war die Proteinexpression von OPN in Primärtumoren und Melanommetastasen gegenüber melanozytären Nävi erhöht und es wurde postuliert, dass OPN mit einem invasiven Phänotyp assoziiert ist (Zhou et al., 2005; Maier et al., 2006). Diese Vermutung wurde von Smith et al. bestätigt, die in VGP-Melanomen, metastasierenden Melanomen und Lymphknotenmetastasen eine erhöhte OPN-Proteinexpression gegenüber melanozytären Nävi und In-situ-Melanomen zeigen konnten (Smith et al., 2005). In einer weiteren Studie wurde eine erhöhte Expression von OPN in Melanommetastasen gegenüber Primärtumoren beobachtet (Jaeger et al., 2007).

Die Expression von OPN in Melanomzelllinien ist weniger gut erforscht. Zhou et al. fanden eine um 7-fach erhöhte mRNA-Expression von OPN in Melanomzelllinien im Vergleich zu Melanozyten (Zhou et al., 2005). Auf Proteinebene konnte in dieser Studie keine OPN-Expression in Melanozyten nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollte die Rolle von OPN in Bezug auf die Melanomprogression näher charakterisiert werden. Dazu wurde die OPN-Expression mittels RT-PCR und Western Blot in 13 humanen Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstufen untersucht und mit der Expression in Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten

verglichen. OPN-mRNA wurde in allen Melanomzelllinien exprimiert, allerdings schwankte die Expression zwischen den einzelnen Zelllinien relativ stark. Die höchste mRNA-Expression von OPN war in den metastatischen Melanomzelllinien zu beobachten. Diese Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass OPN auch in vitro mit einem besonders invasiven Verhalten der Melanomzellen assoziiert ist.

OPN-mRNA wurde in geringerem Maße auch in Melanozyten exprimiert, wobei OPN-Protein in vergleichbarer Menge gefunden wurde wie in Melanomzellen.

Immunfluoreszenzanalysen von Melanomzellen zeigten, dass OPN-Protein sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert war.

Um herauszufinden, ob BRN2 einen Einfluss auf die Genexpression von OPN hat, wurde BRN2 mit einer BRN2-spezifischen-siRNA in den Zelllinien WM9, WM278 und 1205Lu gehemmt und die mRNA- und Proteinexpression von OPN zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion der Zellen untersucht. Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene konnte kein Einfluss der BRN2-Hemmung auf die Expression von OPN beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass OPN in Melanomzellen auf mRNA-Ebene zwar überexprimiert wird, aber unabhängig vom Transkriptionsfaktor BRN2 reguliert wird.

Während der Entwicklung des ZNS wird der Nestin-Enhancer durch den POU-Transkriptionsfaktor BRN2 aktiviert (Josephson et al., 1998; Tanaka et al. 2005; Jin et al., 2009). Da BRN2 und Nestin in einem großen Teil der untersuchten Melanomzelllinien überexprimiert wurden und die mRNA-Expression dieser beiden Gene in 8 von 13 Melanomzelllinien korrelierte, stellte sich die Frage, ob Nestin in Melanomzellen ein Zielgen von BRN2 darstellen könnte.

Die Nestin-Expression wurde in malignen Melanomen in verschiedenen Studien mittels Immunhistochemie untersucht (Florenes et al., 1994; Ehrmann et al., 2005; Maier et al., 2006; Brychtova et al., 2007; Klein et al., 2007). Brychtova et al. assoziierten die Nestin-Expression mit zellulärer De-differenzierung, da Nestin in Melanomen im Vergleich zu Nävi erhöht war (Brychtova et al., 2007). In einer anderen Studie konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden. Florenes et al. wiesen Nestin-Protein in 3 von 4 (75%) Nävi nach und nur in 10 von 15 Primärtumoren (67%) (Florenes et al., 1994). Eine besonders hohe Nestin-Expression wurde in dieser Studie in den peripheren, infiltrierenden Anteilen der Tumoren gefunden, was auf eine Rolle von Nestin bei der Tumordinvasion hindeuten könnte. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei immunhistochemischen

Färbungen von Pankreaskarzinomgewebe gemacht (Kawamoto et al., 2009). Die Nestin-Expression war in den Nervenfasern in unmittelbarer Umgebung der Tumorzellen und in den Nervenfasern, die bereits von Tumorzellen befallen waren, erhöht (Kawamoto et al., 2009). Ferner konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Nestin-Expression in Pankreaskarzinomzellen und der Invasion von Nerven ($p=0,010$) sowie dem Befall der Tumorsektionsränder ($p=0,003$) hergestellt werden. Immunhistochemischen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten eine höhere Nestin-Expression in den invasiver wachsenden VGP-Melanomen als in RGP-Melanomen (Maier et al., 2006). Klein et al. berichteten, dass die Nestin-Expression in metastatischen Melanomen (86%) gegenüber Primärtumoren (70%) erhöht war (Klein et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde die mRNA- und Proteinexpression von Nestin in 13 verschiedenen Melanomzelllinien untersucht und keine Korrelation mit dem Tumorprogressionsstadium festgestellt. Die relative mRNA-Expression von Nestin unterschied sich nicht signifikant zwischen den RGP-, VGP- und metastatischen Melanomzelllinien. Mit Ausnahme zweier metastatischer Zelllinien wurde Nestin-mRNA in allen Melanomzelllinien exprimiert. Nestin-mRNA wurde auch in Melanozyten und Fibroblasten, nicht aber in Keratinozyten exprimiert. Diese Beobachtung legt nahe, dass Nestin nicht nur auf Zellen ektodermalen Ursprungs beschränkt ist, sondern auch in Zellen mesodermalen Ursprungs zu finden ist. Ähnliche Ergebnisse wurden von Steinert et al. publiziert, die Nestin in Fibroblasten, nicht aber in Keratinozytenzelllinien nachweisen konnten (Steinert et al., 1999).

Mittels Immunfluoreszenzanalysen der metastatischen Melanomzelllinie 1205Lu war Nestin im Zytoplasma und dort besonders perinukleär, nicht aber im Zellkern lokalisiert, was die Rolle von Nestin als eine Komponente des Zytoskeletts bestätigte. Abweichend von diesen Ergebnissen beobachteten Kawamoto et al. in Pankreaskarzinomzellen, dass Nestin besonders in der Peripherie des Zytoplasmas lokalisiert war (Kawamoto et al., 2009).

Um den morphologischen Veränderungen von sich schnell teilenden und migrierenden Zellen gerecht zu werden, muss die Organisation und Reorganisation von Strukturproteinen wie Nestin streng reguliert sein (Michalczyk et al., 2005). Die Mechanismen, die diese intrazellulären Vorgänge kontrollieren, sind noch nicht vollständig verstanden, aber es wird angenommen, dass Phosphorylierung der Strukturproteine eine wichtige Rolle spielt (Eriksson et al., 1992). Während der

Mitose führte eine erhöhte Phosphorylierung von Nestin beispielsweise zu einer Reorganisation der Filamentstruktur (Sahlgren et al., 2001). Es ist möglich, dass ein ähnlicher Mechanismus die intrazelluläre Anordnung von Nestin in sich schnell teilenden Tumorzellen reguliert.

Um nähere Informationen über die Rolle von BRN2 für die Nestin-Expression zu erhalten, wurde die BRN2-Expression mit einer BRN2-spezifischen-siRNA gehemmt und die Nestin-Expression auf mRNA- und Proteinebene evaluiert. Für diese Versuche wurden die Zelllinien 1205Lu und WM9 ausgewählt, die BRN2 und Nestin auf mRNA- und Proteinebene hoch exprimierten. In zwei unabhängigen Experimenten zeigte sich kein Einfluss der BRN2-Hemmung auf die mRNA-Expression von Nestin und auch auf Proteinebene unterschied sich die Nestin-Expression der BRN2-gehemmten Zellen nicht signifikant von den Kontrollen. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass Nestin in Melanomzellen unabhängig von BRN2 reguliert wird.

Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass in dieser Arbeit nur eine transiente Transfektion zum Einsatz kam. Möglicherweise hätte eine permanente Transfektion der Zellen zu einem anderen Ergebnis geführt. Sunabori et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Regulation des Nestin-Gens durch BRN2 in neuronalen Progenitorzellen abhängig vom Zellzyklus ist (Sunabori et al., 2008). Die zellzyklusabhängige Phosphorylierung von BRN2 führte über eine herabgesetzte Bindung an den Nestin-Enhancer zu einer verminderten Nestin-Expression in der G2-M-Phase.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass neben BRN2 andere Transkriptionsfaktoren an der Regulation von Nestin beteiligt sind. POU-Faktoren wie BRN2 kooperieren häufig mit SOX-Transkriptionsfaktoren (Dailey et al., 2001). Es wurde die Existenz eines POU-SOX-Codes vorgeschlagen, demzufolge ein spezifisches POU-Protein mit einem spezifischen SOX-Protein interagiert (Kuhlbrodt et al., 1998a, b). In Schwannzellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Krox20-Enhancer, der eine wichtige Rolle für die Myelinisierung spielt, durch SOX10 zusammen mit OCT6 oder BRN2 synergistisch aktiviert wird (Ghislain et al., 2006). In melanozytären Zellen konnte bis jetzt noch kein Promotor unter der gemeinsamen Kontrolle von POU- und SOX-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Cook et al., 2008). Aber es gibt Hinweise darauf, dass derartige Interaktionen auch in dieser Zellart eine Rolle spielen könnten (Cook et al., 2005b; Smit et al., 2000). Melanomzellen, in denen die

BRN2-Expression durch Antisense RNA unterdrückt worden war (Angus et al., 1995), exprimierten auch kein SOX10 und eine niedrige BRN2- und SOX10-Expression war von einer erhöhten SOX9-Expression begleitet (Cook et al., 2005b).

4.2 Die Rolle von SOX9 und SOX10 im malignen Melanom

Cook et al. untersuchten die Expression des Transkriptionsfaktors SOX10 in verschiedenen melanozytären Zellen in Hinblick auf die Zelldifferenzierung und die Koexpression mit BRN2 in vitro und beobachteten eine Abnahme der BRN2- und SOX10-Proteinexpression bei der Differenzierung von Melanoblasten zu Melanozyten (Cook et al., 2005b).

Während der Embryonalentwicklung wird SOX10 in den Zellen der Neuralleiste exprimiert (Southard-Smith et al., 1998; Gershon et al., 2005). Als Gershon et al. die Expression von SOX10 in Gewebeschnitten von metastasierten Melanomen nachwiesen, stellten sie die Hypothese auf, dass in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs genetische Programme, die für die Entwicklung der Neuralleiste wichtig sind, aktiviert werden (Gershon et al., 2005).

Aufgrund des ähnlichen Expressionsmusters von SOX10 und BRN2 während der Differenzierung von Melanoblasten zu Melanozyten (Cook et al., 2005b) und der Beobachtung, dass die Aktivierung des Nestin-Enhancers während der Embryonalentwicklung des ZNS abhängig von POU- und SOX-Transkriptionsfaktoren ist (Tanaka et al., 2005), wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss des Transkriptionsfaktors SOX10 auf die Expression von Nestin untersucht.

SOX10 wurde in den Melanomzelllinien 1205Lu, WM793 und WM239A mittels SOX10-spezifischer siRNA gehemmt und die mRNA- und Proteinexpression von Nestin evaluiert. Die Hemmung war in allen drei Zelllinien am 2. Tag nach Transfektion der Zellen im Vergleich zu den Kontrollen effektiv. In der metastatischen Melanomzelllinie 1205Lu hatte die Hemmung von SOX10 eine Reduktion von Nestin auf mRNA- und Proteinebene zur Folge. Dieses Ergebnis konnte in den Zelllinien WM793 und WM239A bestätigt werden.

Da bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor SOX9 in melanozytären Zellen mit SOX10 koexprimiert wird (Cook et al., 2005b), wurde in dieser Arbeit auch die Rolle von SOX9 für die Nestin-Expression in Melanomzellen untersucht. SOX9 wurde mit

einer SOX9-spezifischen-siRNA in drei verschiedenen Melanomzelllinien gehemmt und der Einfluss auf die Expression von Nestin getestet. In den Zelllinien 1205Lu und WM793 wurde die mRNA- und Proteinexpression von Nestin durch die Hemmung von SOX9 verringert. Die Hemmung von SOX9 in der Zelllinie WM239A führte zu einer verminderten Nestin-Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen.

Kotransfektion der Melanomzelllinien 1205Lu, WM793 und WM239A mit SOX9- und SOX10-spezifischer siRNA hatte eine synergistische Reduktion der Nestin-Expression auf mRNA- beziehungsweise Proteinebene zur Folge.

Um das Expressionsmuster von SOX9 und SOX10 in vivo zu untersuchen, wurden außerdem immunhistochemische Färbungen von SOX9 und SOX10 in humanen Melanomgeweben durchgeführt. Beide SOX-Proteine konnten in den Tumoren nachgewiesen werden, wobei die Intensität der SOX9-Färbungen stärker war als die SOX10-Färbungen. In beiden Tumoren konnte eine Koexpression mit Nestin demonstriert werden (Bakos et al., persönliche Mitteilung).

Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass SOX9 und SOX10 im Gegensatz zu BRN2 in Melanomzellen an der Regulation der Nestin-Expression beteiligt sind. Der additive Effekt von SOX9 und SOX10 deutet darauf hin, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren in Bezug auf die Nestin-Regulation eine redundante Funktion ausüben. Ähnliche Beobachtungen konnten schon in einer Studie von Finzsch et al. gemacht werden (Finzsch et al., 2008). Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Rolle der Transkriptionsfaktoren SOX9 und SOX10 für die Entwicklung der Oligodendrozyten, die im ZNS für die Myelinisierung der Nervenfasern verantwortlich sind, und stellte fest, dass diese Proteine eine sich ergänzende Funktion bei der Differenzierung dieser Zellart ausüben (Finzsch et al., 2008). Bei Verlust von SOX9 konnte die Funktion durch SOX10 ersetzt werden und umgekehrt.

Gupta et al. stellten die interessante Theorie auf, dass das hohe Metastasierungspotential von Melanomzellen möglicherweise nicht nur auf onkogene Mutationen und exogene Faktoren wie UV-Exposition, sondern auch auf die Expression Melanozyten-spezifischer Faktoren zurückzuführen ist (Gupta et al., 2005). Nach dieser Theorie würde die Herkunft der Melanozyten aus der migrierenden Zellpopulation der Neuralleiste das hohe Metastasierungspotential von Melanomzellen erklären. In diesem Sinne fördert beispielsweise der Transkriptionsfaktor Slug, der während der Entwicklung der Neuralleiste die

Differenzierung und Migration reguliert, das Metastasierungsverhalten von Mel-STR-Melanomzellen (Gupta et al., 2005). Ob SOX9 und SOX10, beides Transkriptionsfaktoren mit wichtigen Funktionen bei der Entwicklung der Neuralleiste, eine ähnliche Rolle wie Slug im malignen Melanom einnehmen könnten, bedarf weiterer Untersuchungen. Die Expression des SOX21-Gens, dessen DNA-bindende-high-mobility-group-Domäne zu 94,9% und 98,2% mit der von SOX9 und SOX10 identisch ist, korrelierte in einer Studie von Tani et al. mit dem Metastasierungspotential von murinen K-1735 Melanomzellen (Tani et al., 1997).

4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SOX9 und SOX10, aber nicht BRN2 in Melanomzellen an der Regulation des Nestin-Gens beteiligt sind.

Im Gegensatz zu BRN2 sind diese beiden Transkriptionsfaktoren im malignen Melanom noch relativ wenig erforscht. In neuesten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von SOX9 mit einer verminderten Proliferationsrate von Melanomzellen in der Zellkultur sowie mit einer verminderten Tumorbildung in humanen Haut- und Mausmodellen einherging (Passeron et al., 2009). Dieser Effekt wird vermutlich über einen durch MITF und p21 vermittelten Zellzyklus-Arrest bedingt. Die Identifikation von Molekülen, die zu einer erhöhten SOX9-Expression führen, könnte eine neue Therapiemöglichkeit für das maligne Melanom darstellen. Passeron et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass SOX9 über eine verminderte Expression von PRAME (engl. preferentially expressed antigen in melanoma), einem dominanten Repressor des Retinolsäure-Rezeptors, zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Retinolsäure führt (Passeron et al., 2009). Desweiteren konnten sie einen neuen Mechanismus aufzeigen, über den Prostaglandin D2 (PGD2) über eine erhöhte SOX9-Expression und eine verminderte PRAME-Expression in Melanomzellen eine verminderte Proliferationsrate verursacht. Die Kombination von Retinolsäure und PGD2 hatte einen synergistisch hemmenden Effekt auf das Proliferationsverhalten von Melanomzellen. Zukünftige Studien werden zeigen, ob sich diese vielversprechenden Ergebnisse in der Klinik umsetzen lassen.

5. Zusammenfassung

Der POU-Transkriptionsfaktor BRN2 wurde erstmals 1989 bei der Entwicklung des Nervensystems beschrieben. Weitere Studien zeigten, dass BRN2 auch in Melanoblasten, die wie die Nervenzellen aus dem Neuroektoderm hervorgehen, exprimiert wird und eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des malignen Melanoms spielt. Um den Einfluss von BRN2 auf die Melanomprogression näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit 13 humane Melanomzelllinien unterschiedlicher histopathologischer Wachstumsphasen mittels Real Time RT-PCR und Western Blot hinsichtlich der Expression von BRN2 untersucht. BRN2-mRNA wurde in allen untersuchten Melanomzelllinien exprimiert und war im Vergleich zu Melanozyten bis zu 10^3 -fach erhöht. Die höchste mRNA-Expression von BRN2 war in Melanomzelllinien der vertikalen Wachstumsphase zu beobachten. Die BRN2-Proteinexpression entsprach mit einigen Ausnahmen der mRNA-Expression von BRN2.

Das extrazelluläre Matrixprotein OPN, das im malignen Melanom mit einem besonders invasiven Phänotyp assoziiert wurde, stellt ein mögliches Zielgen von BRN2 dar, da in Gel Shift Assays gezeigt werden konnte, dass BRN2 an die humane OPN-Sequenz binden kann. Um diese Interaktion näher zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit die mRNA- und Proteinexpression von OPN in verschiedenen Melanomzelllinien untersucht. OPN wurde vermehrt in Melanomzelllinien und hier besonders in den metastatischen im Vergleich zu Melanozyten gefunden. BRN2 wurde mit einer BRN2-spezifischen siRNA in drei verschiedenen Melanomzelllinien gehemmt und der Einfluss der Hemmung auf die OPN-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion der Zellen auf mRNA- und Proteinebene evaluiert. Trotz effektiver Hemmung der BRN2-Expression konnte kein Einfluss auf die OPN-Expression festgestellt werden. In Immunfluoreszenzanalysen konnte OPN im Zellkern und im Zytoplasma der Melanomzellen nachgewiesen werden.

Nestin, ein Intermediärfilament, das in neuroektodermalen Stammzellen und im malignen Melanom exprimiert wird, stellt ein weiteres mögliches Zielgen von BRN2 dar, da BRN2 im ZNS an den Nestin-Enhancer bindet und ihn aktiviert. Die mRNA-Expression von Nestin korrelierte in 8 von 13 untersuchten Melanomzelllinien mit der Expression von BRN2. Der Einfluss der siRNA-vermittelten Hemmung von BRN2 auf die Nestin-Expression wurde in zwei verschiedenen Melanomzelllinien auf mRNA-

und Proteinebene untersucht. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion der Zellen mit BRN2-spezifischer siRNA zeigte sich kein Einfluss auf die Nestin-Expression. Daraus wird gefolgert, dass Nestin in Melanomzellen überexprimiert wird, aber seine Regulation offensichtlich unabhängig von BRN2 erfolgt. In Immunfluoreszenzanalysen war Nestin im Zytoplasma der Melanomzellen und dort besonders perinukleär lokalisiert, was für die Rolle von Nestin als eine Komponente des Zytoskeletts spricht.

Mit Hilfe eines Proliferationsassays wurde eine verminderte Vitalität von BRN2-gehemmten Melanomzellen festgestellt, was die bereits beschriebene Rolle von BRN2 für das Melanomwachstum bestätigt.

POU-Transkriptionsfaktoren wie BRN2 regulieren Gene häufig in Kooperation mit SOX-Transkriptionsfaktoren und eine derartige Interaktion könnte auch in melanozytären Zellen eine Rolle spielen. Die Transkriptionsfaktoren SOX9 und SOX10, die eine wichtige Funktion bei der Entwicklung der Neuralleiste haben, scheinen auch für die Differenzierung von Melanozyten von Bedeutung zu sein. Da der Nestin-Enhancer neben BRN2 auch durch die Bindung von SOX-Transkriptionsfaktoren aktiviert wird, wurde in dieser Arbeit die Rolle von SOX9 und SOX10 für die Nestin-Expression untersucht. Die Expression von SOX9 und SOX10 wurde mit siRNA in drei verschiedenen Melanomzelllinien gehemmt und der Einfluss auf die Nestin-Expression auf mRNA- und Proteinebene analysiert. Sowohl die Hemmung von SOX9 als auch von SOX10 führte zu einer verminderten Nestin-Expression im Vergleich zu den Kontrollen, wobei die gleichzeitige Hemmung von SOX9 und SOX10 synergistisch wirkte. In immunhistochemischen Färbungen konnte eine Koexpression von SOX9 und SOX10 mit Nestin in humanen Melanomgeweben demonstriert werden. Somit scheint die Nestin-Expression in Melanomzellen von den Transkriptionsfaktoren SOX9 und SOX10, aber nicht von BRN2 abhängig zu sein.

6. Literaturverzeichnis

Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Palacios J, Pollan M, Linares J, Serrano S, Seaz-Castillo AI, Sanchez L, Pajares R, Sanchez-Aguilera, Artiga MJ, Piris MA, Rodriguez-Peralto JL (2007) A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* **67**: 3450-3460.

Andersen B, Rosenfeld MG (2001) POU domain factors in the neuroendocrine system: Lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr Rev* **22**:2-35.

Angus J, Thomson F, Murphy K, Baker E, Sutherland GR, Parsons PG, Sturm RA (1995) The brn-2 gene regulates the melanocytic phenotype and tumorigenic potential of human melanoma cells. *Oncogene* **11**:691-700.

Atanasoski S, Solinas Toldo S, Malipiero U, Schreiber E, Fries R, Fontana A (1995) Isolation of the human genomic Brain-2/N-Oct 3 gene (POUF3) and assignment to chromosome 6q16. *Genomics* **26**:272-280.

Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, Lemort N, Sock E, Le Caignec C, Wegner M, Goossens M (2000) Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet* **9**:1907-1917.

Botquin V, Hess H, Fuhrmann G, Anastassiadis C, Gross MK, Vriend G, Schöler HR (1998) New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev* **12**:2073-2090.

Bowles J, Schepers G, Koopman P (2000) Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* **227**:239-255.

Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M (2001) The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* **15**:66-78.

Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilkova A, Brychta T, Hirnak J (2007) Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* **34**:370-375.

Cheung M, Briscoe J (2003) Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development* **130**:5681-5693.

Chou YH, Khuon S, Herrmann H, Goldman R (2003) Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol Cell* **14**:1468-1478.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE (2005) Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* **115**:813-824.

Cook AL, Donatien PD, Smith AG, Murphy M, Jones MK, Herlyn M, Bennett DC, Leonard JH, Sturm RA (2003) Human melanoblasts in culture: Expression of BRN2 and synergistic regulation by fibroblast growth factor-2, stem cell factor, and endothelin-3. *J Invest Dermatol* **121**:1150-1159.

Cook AL, Boyle GM, Leonard JH, Parsons PG, Sturm RA (2005a) BRN2 in melanocytic cell development, differentiation, and transformation. In: "From melanocytes to melanoma: The progression to malignancy", Hearing VJ, Leong SPL (Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa, NY:149-167.

Cook AL, Smith AG, Smit DJ, Leonard JH, Sturm RA (2005b) Co-expression of SOX9 and SOX10 during melanocytic differentiation in vitro. *Exp Cell Res* **308**:222-235.

Cook AL, Sturm RA (2008) POU domain transcription factors: BRN2 as a regulator of melanocytic growth and tumorigenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**:611-626.

Cox PM, Temperley SM, Kumar H, Goding CR (1988) A distinct octamer-binding protein present in malignant melanoma cells. *Nucleic Acids Res* **16**:11047-11056.

Dahlstrand J, Zimmermann LB, McKay RDG, Lendahl U (1992a) Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci* **103**:589-597.

Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U (1992b) Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res* **52**:5334-5341.

Dailey L, Basilico C (2001) Coevolution of HMG domains and homeodomains and the generation of transcriptional regulation by SOX/POU complexes. *J Cell Physiol* **186**:315-328.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**:949-954.

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* **107**:1055-1061.

Dugast C, Weber MJ (2001) NF-Y binding is required for transactivation of neuronal aromatic L-amino acid decarboxylase gene promoter by the POU-domain protein Brn-2. *Brain Res Mol Brain Res* **89**:58-70.

Ehrmann J, Kolar Z, Mokry J (2005) Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J Clin Pathol* **58**:222-223.

Eisen T, Easty DJ, Bennett DC, Goding CR (1995) The POU domain transcription factor Brn-2: elevated expression in malignant melanoma and regulation of melanocyte-specific gene expression. *Oncogene* **11**:2157-2164.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498.

Eriksson J, Brautigam D, Vallee R, Olmstedt S, Fujiki H, Goldman R (1992) Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:11093-11097.

Finzsch M, Stolt CC, Lommes P, Wegner M (2008) Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression. *Development* **135**:637-646.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811.

Florenes VA, Holm R, Myklebost O, Lendahl U, Fodstad O (1994) Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res* **54**:354-356.

Friedrich RP, Schlierf B, Tamm ER, Bösl MR, Wegner M (2005) The class III POU domain protein Brn-1 can fully replace the related Oct-6 during schwann cell development and myelination. *Mol Cell Biol* **25**:1821-1829.

Gaggioli C, Sahai E (2007) Melanoma invasion – current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res* **20**:161-172.

Garbe C (2007) Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie. Deutsche Kurzleitlinie: Malignes Melanom (<http://www.ado-homepage.de/index.php?ID=71>) Stand: 12.07.2007.

Garbe C, Leiter U (2009) Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* **27**:3-9.

Gershon TR, Oppenheimer O, Chin SS, Gerald WL (2005) Temporally regulated neural crest transcription factors distinguish neuroectodermal tumors of varying malignancy and differentiation. *Neoplasia* **7**:575-584.

Ghislain J, Charnay P (2006) Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep* **7**:52-58.

Gil J, Esteban M (2000) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* **5**:107-114.

Gilyarov AV (2008) Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* **38**:165-169.

Goodall J, Wellbrock C, Dexter TJ, Roberts K, Marais R, Goding CR (2004a) The Brn-2 transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. *Mol Cell Biol* **24**:2932-2931.

Goodall J, Martinuzzi S, Dexter TJ, Champeval D, Carreira S, Larue L, Goding CR (2004b) Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by β -catenin. *Mol Cell Biol* **24**:2915-2922.

Goodall J, Carreira S, Denat L, Kobi D, Davidson I, Nuciforo P, Sturm RA, Larue L, Goding CR (2008) Brn-2 represses Microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of Microphthalmia –associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Res* **68**:7788-7794.

Guo X, Zhang YP, Mitchell DA, Denhardt DT, Chambers AF (1995) Identification of a ras-activated enhancer in the mouse osteopontin promoter and its interaction with a putative ETS-related transcription factor whose activity correlates with the metastatic potential of the cell. *Mol Cell Biol* **15**:476-487.

Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW, Naber SP, Weinberg RA (2005) The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* **37**:1047-1054.

Hayashi C, Rittling S, Hayata T, Amagasa T, Denhardt D, Ezura Y, Nakashima K, Noda M (2007) Serum osteopontin, an enhancer of tumor metastasis to bone, promotes B16 melanoma cell migration. *J Cell Biochem* **101**:979-986.

He X, Treacy MN, Simmons DM, Ingraham HA, Swanson LW, Rosenfeld MG (1989) Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature* **340**:35-41.

Herlyn M, Thurin J, Balaban G, Bannicelli JL, Herlyn D, Elder DE, Bondi E, Guerry DP, Nowell P, Clark WH, Koprowski H (1985) Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res* **45**:5670-5676.

Herrmann H, Aebi U (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* **12**:79-90.

Hong CS, Saint-Jeannet JP (2005) Sox proteins and neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* **16**:694-703.

Jaeger J, Koczan D, Thiesen HJ, Ibrahim SM, Gross G, Spang R, Kunz M (2007) Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. *Clin Cancer Res* **13**:806-815.

Jin Z, Liu L, Bian W, Chen Y, Xu G, Cheng L, Jing N (2009) Different transcription factors regulate nestin gene expression during P19 cell neural differentiation and central nervous system development. *J Biol Chem* [Epub ahead of print].

Josephson R, Müller T, Pickel J, Okabe S, Reynolds K, Turner PA, Zimmer A, McKay RDG (1998) POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. *Development* **125**:3087-3100.

Kawamoto M, Ishiwata T, Cho K, Uchida E, Korc M, Naito Z, Tajiri T (2009) Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer. *Hum Pathol* **40**:189-198.

Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME, Herawi M, Chuang AY, Epstein JI, Berman DM (2007) Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis. *Cancer Res* **67**:9199-9206.

Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJP, Tahan SR (2007) Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol* **20**:102-107.

Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M (1998a) Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *J Biol Chem* **273**: 16050-16057.

Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M (1998b) Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* **18**:237-250.

Lefort K, Rouault JP, Tondereau L, Magaud JP, Dore JF (2001) The specific activation of gadd45 following UVB radiation requires the POU family gene product N-oct3 in human melanoma cells. *Oncogene* **20**:7375-7385.

Li H, Cherukuri P, Li N, Cowling V, Spinella M, Cole M, Godwin AK, Wells W, DiRenzo J (2007) Nestin is expressed in the basal/myoepithelial layer of the mammary gland and is a selective marker of basal epithelial breast tumors. *Cancer Res* **67**:501-510.

Maier T, Mestel D, Besch R, Nägele U, Sturm R, Berking C (2006) Expression of BRN2, osteopontin and nestin in melanoma and nevi. New markers of tumor progression? *Exp Dermatol* **15**:241.

Mertin S, Mc Dowall SG, Harley VR (1999) The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* **27**:1359-1364.

Michalczyk K, Ziman M (2005) Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* **20**: 665-671.

Miller AJ, Mihm MC (2006) Melanoma. *N Engl J Med* **355**:51-65.

Mollaaghababa R, Pavan WJ (2003) The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* **22**:3024-3034.

Moon C, Ahn M, Kim S, Jin JK, Sim KB, Kim HM, Lee MY, Shin T (2004) Temporal patterns of the embryonic intermediate filament nestin and vimentin expression in the cerebral cortex of adult rats after cryoinjury. *Brain Res* **1028**:238-242.

Moore KL, Persaud TVN (2007a) Dritte Woche: Keimblätter und erste Organanlagen. In: „Embryologie“, Moore KL, Persaud TVN (Hrsg.), Elsevier, München:69-85.

Moore KL, Persaud TVN (2007b) Haut und Hautanhangsgebilde, Brustdrüse und Zähne. In: „Embryologie“, Moore KL, Persaud TVN (Hrsg.), Elsevier, München:533-544.

Murakami T, Toda S, Fujimoto M, Ohtsuki M, Byers HR, Etoh T, Nakagawa H (2001) Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* **288**:8-15.

Murisier F, Guichard S, Beermann F (2007) The tyrosinase enhancer is activated by Sox10 and Mitf in mouse melanocytes. *Pigment Cell Res* **20**:173-184.

Ohyama Y, Nemoto H, Rittling S, Tsuji K, Amagasa T, Denhardt DT, Nifuji A, Noda M (2004) Osteopontin-deficiency suppresses growth of B16 melanoma cells implanted in bone and osteoclastogenesis in co-cultures. *J Bone Miner Res* **19**:1706-1711.

Packer L, Pavey S, Parker A, Stark M, Johansson P, Clarke B, Pollock P, Ringner M, Hayward N (2006) Osteopontin is a downstream effector of the PI3-kinase pathway in melanomas that is inversely correlated with functional PTEN. *Carcinogenesis* **27**:1778-1786.

Passeron T, Valencia JC, Bertolotto C, Hoashi T, Le Pape E, Takahashi K, Ballotti R, Hearing VJ (2007) SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *PNAS* **104**:13984-13989.

Passeron T, Valencia JC, Namiki T, Vieira WD, Passeron H, Miyamura Y, Hearing VJ (2009) Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *J Clin Invest* **119**: 954-963.

Philip S, Bulbule A, Kundu GC (2001) Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor- κ B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem* **276**:44926-44935.

Philip S, Kundu GC (2003) Osteopontin induces nuclear factor κ B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I κ B α /IKK signaling pathways, and curcumin (diferulolylmethane) down-regulates these pathways. *J Biol Chem* **278**:14487-14497.

Phillips K, Luisi B (2000) The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J Mol Biol* **302**:1023-1039.

Rangel J, Nosrati M, Torabian S, Shaikh L, Leong SPL, Haqq C, Miller JR 3rd, Sagebiel RW, Kashani-Sabet M (2008) Osteopontin as a molecular prognostic marker for melanoma. *Cancer* **112**:144-150.

Richmond-Sinclair NM, Lee E, Cummings MC, Williamson R, Muller K, Green AC, Hayward NK, Whiteman DC (2008) Histologic and epidemiologic correlates of P-MAPK, Brn-2, pRb, p53, and p16 immunostaining in cutaneous melanomas. *Melanoma Res* **18**:336-345.

Sadler TW (2008) Embryonalperiode (vierte bis achte Woche). In: „Medizinische Embryologie“, Sadler TW (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart:91-113.

Sahlgren C, Mikhailov A, Hellman J, Chou YH, Lendahl U, Goldman R, Eriksson J (2001) Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J Biol Chem* **276**:16456-16463.

Schaumburg-Lever G (1987) The alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase technique in dermatopathology. *J Cutan Pathol* **14**:6-9.

Senger DR, Wirth DF, Hynes RO (1979) Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* **16**:885-893.

Sjöberg G, Jiang WQ, Ringertz NR, Lendahl U, Sejersen T (1994) Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Exp Cell Res* **214**:447-458.

Smalley KSM (2003) A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* **104**:527-532.

Smalley KSM, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M (2006) Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastasis. *Mol Cancer Ther* **5**:1136-1144.

Smit DJ, Smith AG, Parsons PG, Muscat GEO, Sturm RA (2000) Domains of Brn-2 that mediate homodimerization and interaction with general and melanocytic transcription factors. *Eur J Biochem* **267**:6413-6422.

Smith AP, Hoek K, Becker D (2005) Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas. *Cancer Biol Ther* **4**:1018-1029.

Sock E, Pagon RA, Keymolen K, Lissens W, Wegner M, Scherer G (2003) Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia. *Hum Mol Gen* **12**:1439-1447.

Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ (1998) Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet* **18**:60-64.

Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DAD, Marekov LN, Wu KC, Jang SI, Goldman RD (1999) A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. *J Biol Chem* **274**:9881-9890.

Sturm RA (2005) Osteopontin in melanocytic lesions-A first step towards invasion? *J Invest Dermatol* **124**:xiv-xv.

Sugitani Y, Nakai S, Minowa O, Nishi M, Jishage K, Kawano H, Mori K, Ogawa M, Noda T (2002) Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev* **16**:1760-1765.

Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, Sawamoto K, Okabe M, Miyawaki A, Matsuzaki Y, Miyata T, Okano H (2008) Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J Cell Sci* **121**:1204-1212.

Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, Kondoh H (2004) Interplay of SOX and POU factors in the regulation of the nestin gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol* **24**:8834-8846.

Tani M, Shindo-Okada N, Hashimoto Y, Shiroishi T, Takenoshita S, Nagamachi Y, Yokota J (1997) Isolation of a novel Sry-related gene that is expressed in high-metastatic K-1735 murine melanoma cells. *Genomics* **39**:30-37.

Thomson JAF, Parsons PG, Sturm RA (1993) In vivo and in vitro expression of octamer binding proteins in human melanoma metastasis, brain tissue, and fibroblasts. *Pigment Cell Res* **6**:13-22.

Vance KW, Goding CR (2004) The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res* **17**:318-325.

Volkenandt M (2005) Maligne Melanome. In: „Dermatologie und Venerologie“, Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (Hrsg.), Springer Medizinverlag, Heidelberg:1313-1323.

Wai PY, Kuo PC (2008) Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **27**:103-118.

Wall NR, Shi Y (2003) Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *Lancet* **362**:1401-1403.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R, Cancer Genome Project (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**:855-867.

Wang D, Yamamoto S, Hijiya N, Benveniste EN, Gladson CL (2000) Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter: functional analysis and DNA-protein interactions. *Oncogene* **19**:5801-5809.

Wegner M (2005) Secrets to a healthy Sox life: lessons for melanocytes. *Pigment Cell Res* **18**:74-85.

Wellbrock C, Rana S, Paterson H, Pickersgill H, Brummelkamp T, Marais R (2008) Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS ONE* **3**:e2734.

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM (2004) Nestin expression-a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* **61**:2510-2522.

Yokoyama S, Takeda K, Shibahara S (2006) SOX10, in combination with Sp1, regulates the endothelin receptor type B gene in human melanocyte lineage cells. *FEBS J* **273**:1805-1820.

Zhou Y, Dai DL, Martinka M, Su M, Zhang Y, Campos EI, Dorocicz I, Tang L, Huntsman D, Nelson C, Ho V, Li G (2005) Osteopontin expression correlates with melanoma invasion. *J Invest Dermatol* **124**:1044-1052.

Zhu BK, Pruitt SC (2005) Determination of transcription factors and their possible roles in the regulation of Pax3 gene expression in the mouse B16 F1 melanoma cell line. *Melanoma Res* **15**:363-373.

7. Danksagung

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

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Carola Berking bedanken, die mich in vorbildlicher Weise bei dieser Arbeit betreut hat und in deren Arbeitsgruppe ich mich stets sehr gut aufgehoben gefühlt habe. Durch sie habe ich nicht nur gelernt, was es heißt, wissenschaftlich zu arbeiten, sondern auch wie die Ergebnisse in Wort und Schrift angemessen zu präsentieren sind.

Mein besonderer Dank gebührt auch PD Dr. rer. hum. biol. Robert Besch, dessen wertvolle Ratschläge zum Versuchsaufbau und zur Methodik ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und der stets geduldig meine vielen Fragen beantwortet hat.

Claudia Kammerbauer und Ursula Nägele möchte ich dafür danken, dass sie mich in die molekularbiologischen Labormethoden eingeführt haben. Häufig standen sie mir bei der Lösung aufgetretener Probleme tatkräftig zur Seite.

Bei Dr. med. Tanja Maier möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich in die Thematik der Dissertation und die Technik der RT-PCR eingeführt hat.

Mein weiterer Dank gilt allen denjenigen, die durch ihr Engagement das Graduiertenkolleg 1202 der Deutschen Forschungsgemeinschaft ins Leben berufen haben und so eine beispielhafte Förderung wissenschaftlicher Arbeit ermöglichen.

Ich möchte mich auch bei den Doktoranden Irene Hübert und Tobias Hohenauer aus dem Labor für Zelladhäsion bedanken, die mir Proteinlysate und cDNA aus Melanomzelllinien für meine experimentellen Arbeiten zur Verfügung gestellt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Ruzicka bedanken, der mir die Möglichkeit geboten hat, in den Laboren der Klinik und Poliklinik für

Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München arbeiten zu dürfen.

8. Curriculum vitae

Name	Anna Flammiger
Geburtsdatum/-ort	20.01.1982 in Bad Oldesloe
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schulbildung:	
08/1988-06/2001	Freie Waldorfschule Lübeck
06/2001	Allgemeine Hochschulreife
Studium:	
10/2002-03/2003	Medizinstudium an der Universität Hamburg
04/2003-09/2004	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
09/2004	Ärztliche Vorprüfung
10/2004-12/2008	Medizinstudium an der Technischen Universität München
07/2006-12/2006	Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs 1202
08/2007-07/2008	Praktisches Jahr
	08/2007-11/2007 Chirurgie, Klinikum Schwabing München
	12/2007-03/2008 Innere Medizin, New York Presbyterian Hospital, Weill Medical College der Cornell University, New York
	04/2008-07/2008 Gynäkologie und Geburtshilfe, Rotkreuzklinikum München
11/2008	Ärztliche Prüfung
12/2008	Approbation als Ärztin
Beruflicher Werdegang:	
Seit 03/2009	Assistenzärztin, II Medizinische Klinik und Poliklinik, Onkologie-Hämatologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf