In-vitro- und *In-situ-*Analyse des Tumorsuppressorgens hp19^{ARF} in malignen Melanomen

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Rafael Dobrowolski
aus
Radom (Polen)

Berichter: Frau Professorin
Dr. rer. nat. Anja-Katrin Boßerhoff

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Christian Mittermayer

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Januar 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

I. Zusammenfassung **1**

II. Abkürzungen **3**

III. Einleitung **5**

1. Grundlagen der Tumorentstehung **5**

2. Das maligne Melanom **7**

2.1. Allgemeines **7**
2.2. Proliferation, Wachstumsfaktoren **12**
2.3. Adhäsionsmoleküle und Invasion **13**
2.4. Transkriptionsfaktoren **14**
2.5. Onkogene und Tumorsuppressorgene **14**
2.5.1. p53, $p16^{INK4a}$ im malignen Melanom **15**

3. Die Rolle von $p16^{INK4a}$ und $p19^{ARF}$ als Tumorsuppressorgene **16**

4. Fragestellung **22**

IV. Material und Methoden **23**

1. Lösungen, Puffer, Medien **23**

2. Materialien **27**

2.1. Chemikalien **27**
2.2. Molekulargewichtsstandards **29**
2.3. Geräte **30**
2.4. RNA, cDNA, Proteinlysate **30**
2.5. Primer **31**

2.6. Antikörper **31**
2.7. Zelllinien **31**
2.8. Gewebeschnitte **32**

3. Molekularbiologische Methoden **32**

3.1. Gelelektrophorese **33**
3.1.1. Agarose–Gele **33**
3.1.2. Polyacrylamid-Gele **33**

3.2. RNA–Isolierung aus eukaryonten Zellen **34**
3.2.1. RNA–Isolierung **34**
3.2.2. RNA–Gelelekrophorese **35**

3.3. Reverse Transkription (cDNA-Synthese) **36**
3.3.1. RNA–Umschreibung mit reverser Transkriptase **36**

3.4. PCR (Polymerase Chain Reaction) **36**
3.4.1. PCR mit $p19^{ARF}$-Primern **37**
3.4.2. PCR mit β–Aktin-Primern und GAPDH-Primern **38**

3.5. Reinigung von DNA-Fragmenten **38**
3.5.1. PEG-Fällung **39**
3.5.2. DNA-Extraktion aus dem Gel **39**

3.6. Sequenzierung der DNA-Fragmente **39**

4. Proteinchemische Methoden **41**

4.1. Isolierung von Zellproteinen **41**

4.2. Bestimmung des Proteingehaltes **41**

4.3. Western–Blot **42**

4.3.1. Immunchemischer Protein-Nachweis **42**

5. Immunhistochemische Methoden **43**

5.1. Gewebeschnitte–Vorbereitung **43**

5.2. Immunhistochemische Färbungen **44**

5.2.1 Immunhistochemische Färbung mit spezifischem Antikörper **45**

5.2.2 DAB–Färbung **46**

5.2.3 AEC–Färbung **46**

6. Zellkultur **47**

6.1. Kultivierung eukaryontischer Zellen **47**

V. Ergebnisse **48**

1. hp19^{ARF}-Gen-Expression in Melanom-Zelllinien **48**

1.1. Erzeugung und Kontrolle des Melanom-cDNA-Pools **48**

1.1.1. Kontrolle der RNA-Integrität **48**

1.1.2. cDNA-Kontrolle in β–Aktin und GAPDH-PCRs **49**

1.2. Nachweis der hp19^{ARF}-Genexpression in malignen Melanomen durch PCR **51**

1.2.1. Auswahl geeigneter Primersequnezen für hp19^{ARF} **51**

1.2.2. Etablierung und Optimierung der hp19^{ARF}-PCR-Nachweise **53**

1.2.3. p19^{ARF}-mRNA-Expression in malignen Melanom-Zelllinien **57**

1.2.4. Sequenzierung und Analyse der hp19^{ARF}-PCR-Produkte **61**

1.2.4.1. Sequenzierung der hp19^{ARF}-PCR-Produkte **61**

1.2.4.2. Analyse hp19^{ARF}-Sequenzen **62**

2. hp19^{ARF}-Protein-Expression in malignen Melanom-Zelllinien **64**

2.1. Etablierung des Western-Blot-Nachweises von hp19^{ARF} **64**

2.2. Analyse der hp19^{ARF}-Protein-Expression **69**

3. Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von hp19^{ARF}
in Melanomgeweben *in vivo* **72**

3.1. Ergebnisse **72**

VI. Diskussion **77**

1. Zusammenhänge zwischen den Zellzyklusregulatoren und
ihre Rolle bei der Pathogenese von Tumorerkrankungen **80**

2. p16^{INK4a} als einer der grundlegenden Bausteine in der humanen Karzinogenese **84**

3. hp19^{ARF} in seiner Beziehung zur Entstehung maligner Tumoren **89**

3.1. Karzinogene Wechselwirkungen des hp19^{ARF}-Signalweges **94**
3.1.1. hp19^{ARF}-p53-Funktionsachse **94**
3.1.2. Einfluss von Onkogenen auf hp19^{ARF} **97**

4. Ausblick **99**

VII. Literatur **101**

I. Zusammenfassung

Seit der Entdeckung Mitte der 90-er Jahre wird das hp19ARF-Gen in Bezug auf seine Funktion bei der Pathogenese maligner Tumore von vielen Arbeitsgruppen intensiver Erforschung unterzogen. Dafür spricht nicht nur seine relativ ungewöhnliche molekulargenetische Beziehung zu p16INK4a, welches von manchen Autoren als „das Melanom-Gen“ propagiert wird, sondern auch die Tatsache, dass hp19ARF selbst im Zellzyklus als ein recht potenter Tumorsuppressor fungiert.
Das humane $hp19^{ARF}$-Gen ist auf Chromosom 9p21 innerhalb des INK4a-Locus lokalisiert, unterteilt in drei Exons 1ß, 2 und 3, und umfasst ca. 20 kb. Es entsteht als das alternative Transkriptionsprodukt zu $p16^{INK4A}$, welches schon seit längerem insbesondere in Bezug auf malignes Melanom intensiv untersucht worden ist.
$Hp19^{ARF}$ wird in vielen verschiedenen Zellen des Körpers exprimiert und dient im Zellzyklus als ein Tumorsuppressorgen oberhalb der Ebene vom Retinoblastoma-Protein und p53. Dadurch kommt die Überlegung zustande, dass es im Prozess der Tumorentstehung durch Mutationen der Gensequenz oder sogar komplettem Verlust des Gens oder Proteins involviert sein könnte.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde der humane Tumorsuppressor $hp19^{ARF}$ sowohl *in vitro*, als auch *in situ* molekularbiologisch auf mögliche Veränderungen oder Verluste des Gens (PCR) und / oder des Proteins (Western-Blot, Immuhistochemie) untersucht.
In Bezug darauf wurden zehn verschiedene Zellen analysiert, unter denen sich zwei Arten primärer Melanozyten (humane und murine) und acht Melanom-Zelllinien befanden. Das aus den kultivierten Zellen gewonnene Material wurde zum einen anhand von konventionellen Polymerasen-Ketten-Reaktionen mit nachfolgender Sequenzenanalyse der amplifizierten cDNA auf mögliche Veränderungen oder Mutationen des Gens überprüft. Zum anderen wurden aus den gleichen Zellen Proteinlysate gewonnen, mit denen Western-Blot-Versuche durchgeführt wurden, um die Expression des $hp19^{ARF}$-Proteins zu überprüfen und sie soweit wie möglich mit den Ergebnissen der mRNA-Expressionen der jeweiligen Zellen zu vergleichen.
Des weiteren wurden an einem randomisierten Patientenkollektiv mit malignen Melanomen, Metastasen maligner Melanome und Nävi immunhistochemische Färbungen zur Darstellung

der hp19^{ARF}-Proteinexpression *in situ* unternommen, die die Verhältnisse *in vivo* darstellen sollten.

Zur Sicherung der Ergebnisse wurden alle Versuche sowohl auf Gen- als auch auf Proteinniveau, zusätzlich mit Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Dabei galten als Positivkontrolle die HeLa-Zelllinie (Zervixkarzinom-Zelllinie) und als Negativkontrolle die HCT116-Zelllinie (Kolonkarzinom-Zelllinie), bei der ein hp19^{ARF}-Verlust bereits beschrieben worden ist [Yang et al. 2000].

Bei den durchgeführten *in vitro*-Experimenten konnten sowohl das hp19^{ARF}-Gen als auch das Protein in allen untersuchten Zellen mittels PCR und Western-Blot nachgewiesen werden. Auch die nachfolgende Sequenzierung mit entsprechender Analyse der Gensequenzen, erbrachte keinerlei Hinweise auf Veränderungen des Gens im Sinne einer Mutation, Insertion oder Deletion. Anhand dieser Daten kann man davon ausgehen, dass Veränderungen von hp19^{ARF} unter den *in-vitro*-Bedingungen bei der Progression des malignen Melanoms keine entscheidende Rolle spielen.

Andere Verhältnisse bezüglich der Proteinexpression konnten bei den immunhistochemischen *in-situ*-Experimenten aufgezeigt werden. Hierzu wurden 14 Nävi, 12 maligne Melanome und 6 Metastasen maligner Melanome untersucht. Das erhaltene Expressionsmuster deutet auf einen Verlust des hp19^{ARF}-Proteins mit fortschreitender Progression des Tumors vom Nävus über das eigentliche Melanom hin bis zu den Metastasen, welche die meisten Proteinverluste aufwiesen. Die hp19^{ARF}-Expression konnte wie folgt dargestellt werden: 50% der untersuchten Nävi (7 von 14) waren hp19^{ARF}-positiv, 25% der malignen Melanome (3 von 12) und 0% der Melanom-Metastasen (0 von 6) waren eindeutig hp19^{ARF}-positiv.

Da keine Untersuchungen des hp19^{ARF}-Gens durchgeführt wurden, ist es nicht möglich, eindeutige Aussagen über die Ebene, auf der es zum Verlust der hp19^{ARF}-Funktion kommt, zu machen. Hypothetisch kämen vielerlei Möglichkeiten in Frage, wie z.B. ein Verlust des Gens oder Mutationen, die eine regelrechte Transkription unmöglich machen, auch Methylierung der Promotorregion wäre denkbar. Um diese Fragen zu klären, sind molekulargenetische Untersuchungen des Gens erforderlich.

Die Diskrepanz zwischen den *in-vitro*- und *in-situ*-Verhältnissen lässt jedoch erneut die Überlegung über eine mögliche pathogenetische Funktion von hp19^{ARF} bei der Entstehung des malignen Melanoms aufkommen, die sicherlich eine weitere Abklärung erforderlich macht.

II. Abkürzungen

A	ARF	Alternatives Leseraster (**a**lternativ **r**eading **f**rame)
	AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
	AS	Aminosäuren
	APS	Ammoniumpersulfat
	ABC	Avidin-Biotin-Complex
B	bp	Basenpaare
	Bidest H_2O	zweifach destilliertes Wasser
	BCA	Bicinchoninsäure
	BSA	Rinderserumalbumin (**b**ovine **s**erum **a**lbumine)
C	cDNA	komplementäre DNA (**c**omplementary **d**esoxyribo**n**ucleic **a**cid)
	CA	Karzinom
	CDK	zyklinabhängige Kinase (**c**yclin-**d**ependent **k**inase)
D	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
	DAB	3,3'-Diaminobenzidine
	DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
	DTT	Dithiothreitol
	dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
E	EtBr	Ethidiumbromid
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	FKS	fötales Kälberserum
H	HPLC	Hochleistungsflüssigkeit-Chromatographie (**h**igh **p**erformance **l**iquid **c**hromatography)
I	INK	Inhibitor von CDKs

K	kb	Kilo-Basen
	kd	Kilo-Dalton
L	Lj.	Lebensjahr
	LOH	Heterozygotie-Verlust (**L**oss **O**f **H**eterozygosity)
M	mRNA	Messenger-RNA
	MW	Molekulargewicht (**m**olecular **we**ight)
	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure,
P	PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (**p**hosphate **b**uffered **s**aline)
	PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (**p**olymerase **c**hain **r**eaction)
	pRB	phosphoryliertes Retinoblastomprotein
	PDVF	Polyvinylidendifluorid
R	RNA	Ribonukleinsäure
	RT	Raumtemperatur
	Rb	Retinoblastoma-Protein
	RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion
	rpm	Umdrehungen pro Minute (**r**ounds **p**er **m**inute)
S	SDS	Natrium-Dodecylsulfat (**s**odium **d**odecyl **s**ulfate)
T	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	TSR	Template Suppression Reagent
	Taq	Thermophilus aquaticus
U	UV	Ultraviolett
V	VE	Volumeneinheit
	$^{v}/_{v}$	Volumen/Volumen

III. Einleitung

1. Grundlagen der Tumorentstehung

Im Laufe der letzten 100 Jahre sind die Tumorerkrankungen in der Todesursachen-Statistik vom siebten auf den zweiten Platz vorgerückt.

In diesem Zeitraum konnte auch die Vorstellung über die genetische Basis der Tumorentstehung durch epidemiologische, zytogenetische und familiäre Untersuchungen bestärkt werden [Wilkowski 1990]. Der schlüssige Nachweis dieser Theorien gilt als einer der bedeutendsten Forschungserfolge in den 90-er Jahren. Dieser ließ zwei essentielle Unterscheidungskriterien für die Krebserkrankungen (als eine genetische Krankheit) von den anderen genetisch bedingten Leiden entstehen:

- in der Regel sind somatische Mutationen an der Tumorgenese beteiligt, wogegen andere genetische Erkrankungen durch Keimbahnveränderung entstehen,
- der Ausgang des Krebses erfolgt von einer Zelle und basiert auf der Anhäufung von vielen, voneinander unabhängigen Mutationen [Vogelstein und Kinzler 1993]. Dieser Akkumulationsvorgang erfolgt schrittweise, wobei jede einzelne Transformation der Zelle einen selektiven Vorteil verschafft und sie expandieren lässt [Bodmer 1994].

Nach diesem Konzept durchlaufen die Zellen eine Reihe von Veränderungen sowohl in ihrem Progressions- als auch Differenzierungsvermögen, die auf dem zunehmenden Ungleichgewicht zwischen proliferationshemmenden und –stimulierenden Signalen beruhen. Dies und die sich daraus ergebende Tatsache, dass Tumorzellen im Stande sind autonom Wachstumsfaktoren sezenieren zu können, führt zu einem unabhängigen, unkontrollierten Wachstum des Tumors mit den resultierenden Folgen (Metastasen, Therapieresistenzen, etc.).

Die Zusammenfügung dieser Theorien mit den neuen methodisch-technischen Entwicklungen führte zur Lokalisation und Isolierung von sogenannten Krebsgenen, die in mutierter Form bei der Initiation und Progression von menschlichen Tumoren involviert sind.

Zu diesen Elementen werden momentan drei große Gen-Kategorien gerechnet:

1) die Onkogene, stimulieren bei Fehlfunktion das Zellwachstum,
2) die Tumorsuppressorgene (z.B. $hp19^{ARF}$, $p16^{INK}$, p53, etc.), unterdrücken bei regelrechter Funktion das maligne Zellwachstum,
3) die Reparatur-Mutator-Gene [Levine 1997].

Es sind heute weitaus über 100 Onkogene bekannt, von denen jedoch nur ein Teil an der humanen Karzinogenese beteiligt zu sein scheint oft mit hoher Gewebe- und Zellspezifität [Smith et al., 1993]. Verschiedene genetische Veränderungen kommen dabei vor: Amplifikationen, Translokationen, Punktmutationen; wobei die mit einem Funktionsgewinn (Protoonkogen ⇨ Onkogen) in der Regel als dominant wirksam gelten.

Als typisch für Tumorsuppressorgene werden demgegenüber Mutationen mit Funktionsverlust angesehen; hier ist ein Verlust beider parentaler Allele für die Tumorentstehung erforderlich. Aufgrund dieser Tatsache werden Tumorsuppressorgene in der Literatur auch als rezessive Onkogene bezeichnet [Bookstein und Allerd, 1993; Weinberg 1991]. Sie bilden die Grundlage für die erbliche Disposition (autosomal-dominanter Erbgang mit hoher Penetranz) diverser Tumore beim Menschen.

Nach Vogelstein und Kinzler scheinen Mutationen von Onkogenen häufig eine initiierende Rolle für viele hämatogene Tumoren zu spielen, wogegen veränderte Tumorsuppressorgene in den meisten epithelialen Tumoren als Initiatoren gelten [Vogelstein und Kinzler 1993].

Die Schnyder-Regel [Schnyder, 1966] besagt, dass solide, multiple, disseminierte Hauttumore genetisch determiniert sind und über einen autosomal-dominanten Gang vererbt werden. Die weiterreichenden Betrachtungen haben ergeben, dass die Schnyder-Regel auch auf viele Tumore innerer Organe zutrifft. Wobei als die bestimmende, pathogenetische Ursache nicht wie angenommen die aktivierten Onkogene, sondern vielmehr deaktivierte Tumorsuppressorgene gelten.

Aus diesen Erkenntnissen wurde in der letzten Zeit das 2-Hit-Modell für Tumorsuppressorgene entwickelt, nach dem durch zwei unabhängige Ereignisse beide Allele eines zellspezifischen Tumorsuppressorgens inaktiviert werden. So wird auch verständlich, dass die familiären Malignome in jüngerem Lebensalter manifest werden. Bei diesen Erkrankungen wird nämlich das eine Allel schon defekt vererbt, so dass es nur noch eines einzigen somatischen Ereignisses bedarf, um das zweite Allel zu stören und damit die Zellentartung zu induzieren [Mikkelsen et al., 1990].

Es scheint, dass die Deaktivierung von den heute gut erforschten und im Zellzyklus wichtigen Tumorsuppressorgenen ($p16^{INK}$, p53, Retinoblastomgen) zu einer enormen genetischen Instabilität und damit zur Entstehung von Mutationen in anderen Tumor(progressions)genen führt.

Sowohl bei der malignen Transformation als auch bei der späteren Progression sind Tumorsuppressorgene von großer Bedeutung. Hier kommt es jedoch auf deren Zusammenwirkung mit aktivierten Onkogenen an [Weinberg, 1989]. Mittlerweile hat man für

viele Tumorarten typische chromosomale Regionen beschrieben, in denen die initialen Tumorgene lokalisiert sind. So sind auch für familiäre Melanome entsprechende Chromosombereiche bekannt.

2. Das maligne Melanom

2.1. Allgemeines

Das maligne Melanom ist ein hoch invasiver, bösartiger Tumor, der von den Melanozyten ausgeht und primär entsprechend deren Verteilung an verschiedenen Stellen lokalisiert sein kann, wie z.B. den Schleimhäuten, Leptomeningen, Uvea, Retina und inneren Organen. Zu über 90% entstehen maligne Melanome primär in der Haut, wo sich die Melanozyten in der basalen Schicht der Epidermis befinden.
Die Ethiologie des Tumors ist nur teilweise geklärt. Dies und die stark zunehmende Inzidenz, führen dazu, dass das Melanom in den letzten Jahren mit zu den am meisten experimentell untersuchten neoplastischen Erkrankungen gehört (neben Mamma-CA, Colon-CA).
Die Inzidenz von malignen Melanomen hat sich in den vergangenen fünf bis sieben Jahren weltweit verdoppelt. Sie liegt in Mitteleuropa heute bei ca. 10 – 15 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Bei weißer Bevölkerung mit erhöhter Risikoexposition (vor allem starke Sonneneinstrahlung), wie Australiern, Südstaatlern in den USA, beträgt sie sogar 30 – 60 Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr [Fritsch et al., 1998].

Trotz des hohen Forschungsaufwandes sind die Ursachen der malignen Transformation der Melanozyten zu Melanomzellen nur teilweise geklärt. In verschiedenen epidemiologischen Studien wurde eine Reihe von Risikofaktoren für die Melanomentstehung ermittelt. So lassen schmerzhafte Sonnenbrände in der Kindheit oder Adoleszenz die Gefahr des Tumors um das zwei- bis dreifache ansteigen, wobei nicht nur deren Stärke, sondern auch die Häufigkeit entscheidend sind. Das UV-Licht zählt wohl zu den bedeutendsten, exogenen Faktoren. Dafür spricht vor allem die Tatsache, dass das Melanom-Vorkommen bei weißer Bevölkerung zehn bis hundert mal höher ist als bei Schwarzen oder Asiaten. Man kann damit sowohl die genetische Disposition der Kaukasier als auch deren geringeren Pigmentschutz gegenüber den UV-Strahlen in Verbindung setzen.

Jedoch scheint das UV-Licht nicht der alleinige Grund für die Melanomentstehung zu sein, denn anders als bei weiteren Hautkrebsarten wie Basaliomen oder spinozellulären Karzinomen fehlt die direkte Beziehung zwischen Sonnenlicht und Melanom [Garbe et al., 1989; Weiss et al., 1990]. So konnten in Tierversuchen durch isolierte UV-Bestrahlung keine Melanome induziert werden. Wurden geeignete Tiere jedoch mit karzinogenen Initiatorsubstanzen behandelt (Dimethylbenzanthrazen), so führte sowohl Bestrahlung mit UV-A, als auch mit UV-B zur Entstehung von Melanomen [Pathak 1991]. Dieser Befund liefert zweierlei Hinweise. Zum einen auf die Wirkung von unbekannten Noxen, zum anderen auf die Promotorfunktion von UV-Strahlung bei prädisponierten Individuen.
Es sind jedoch auch weitere Risikofaktoren bekannt, wie vererbbare Krankheiten (z.B. Xeroderma Pigmentosa), welche die Melanomentstehung induzieren können [Clark and Greene, 1978]. Es wird geschätzt, dass ca. 5–10% aller Melanome in den Kreis der familiären, malignen Erkrankungen gehören.

Im Vergleich zu anderen Tumoren, gehört das Melanom zu den hochmalignen und äußerst aggressiven, neoplastischen Erkrankungen. Es setzt bereits bei sehr kleinem Tumorvolumen Fernmetastasen. Die davon hauptsächlich betroffenen Organe sind: Lymphknoten, Haut, Lunge, Leber und Gehirn. Hinzu kommt seine Resistenz gegenüber den heutigen Chemo- und Strahlentherapien, die es fast unmöglich macht, metastasierte Melanome kurativ zu therapieren.

Melanozyten, die zu Melanomzellen entarten können, gehören zu den neuroektodermalen Zellen und verlassen die Neuralleiste 2-3 Wochen nach der Befruchtung. Ihre Pigmentsynthese beginnt mit dem Zeitpunkt der Geburt und setzt sich das Leben lang fort. Auch nach der malignen Umwandlung wird das Synthesemuster meist beibehalten, und so sind die Melanome auf der Haut häufig durch ihre schwarze, unregelmäßige Oberfläche zu erkennen.
Es gibt vier Haupttypen von Melanomen, deren Unterteilungskriterien von Clark und Mitarbeitern Ende der 60-er Jahre entwickelt wurden und sich auf die biologischen, klinischen und histologischen Eigenschaften beziehen [Clark et al., 1969]. Die einzelnen Typen unterscheiden sich durch diverse Merkmale, wie z.B. Alter des Patienten, bevorzugte Lokalisation sowie ihrem, in Bezug auf die Prognose entscheidenden, Wachstumsverhalten:

- *SSM - superfiziell spreitendes Melanom* (47%); entsteht oft jenseits des 50. Lj.,

ist charakteristischerweise an der verschiedenfarbigen Oberfläche zu erkennen.

- *NMM - noduläres malignes Melanom* (39%) , tritt ab dem 55 Lj. gehäuft auf, wächst in vertikaler Richtung, kann häufig wegen fehlender Melaninsynthese fehldiagnostiziert werden.

- *LMM - lentigo maligna melanoma* (6%), ein Tumor des höheren Alters (>65 Lj.), mit einer sehr langsam verlaufenden Entwicklung, meistens an sonnenexponierten Stellen anzutreffen (Kopf, Nacken, Unterarme, Unterschenkel) [Cox et al., 1996].

- *ALM - akrolentiginöses Melanom* (6%), meistens ab dem 60 Lj., entwickelt sich an den Handflächen und Fußsohlen. Es gehört in Deutschland zwar zu eher seltenen Tumoren (4% aller Melanome), stellt aber in Afrika und Asien den Hauptanteil an Melanomdiagnosen dar [Hudson et al., 1993; Mishima et al, 1985].

- die übrigen 2% werden den verschiedenen *Sonderformen* zugerechnet (z.B. blauer Nävus, Ballonzellmelanom, desmoplastisches Melanom).

Zur besseren klinischen Diagnose wurde in den 80-er Jahren die ABCD-Regel entwickelt, die es auch erlaubt, Frühformen des malignen Melanoms zu erkennen [Friedman et al., 1985]. ABCD steht für **A**symmetrie, unregelmäßige **B**egrenzung, innerhalb der Läsion variierender **C**olorit, **D**urchmesser >5mm. Sind mehrere dieser Kriterien erfüllt, besteht dringender Verdacht auf ein malignes Melanom.

Viele maligne Melanome entstehen im Zusammenhang mit den schon erwähnten Risikofaktoren (z.B. UV-Licht), auf dem Boden von zuerst gutartigen Vorläuferläsionen. Zu den gefährdeten Vorläufern gehören: Melanoma *in situ*, Lentigo maligna, dysplastische melanozytäre Nävi [Mihm, Clark et al., 1971; Clark et al., 1984; Sober et al., 1995]. Dabei sollen die genetischen Defekte nicht erst bei der malignen Transformation entstehen, sondern schon in den atypischen Nävi vorhanden sein [Bergmann et al., 1994].

Für die Entwicklung des Melanoms ist von Clark et al. [1984, 1991] ein anschauliches Modell mit 5 Stadien der Tumorprogression entwickelt worden, das kurz vorgestellt werden soll.

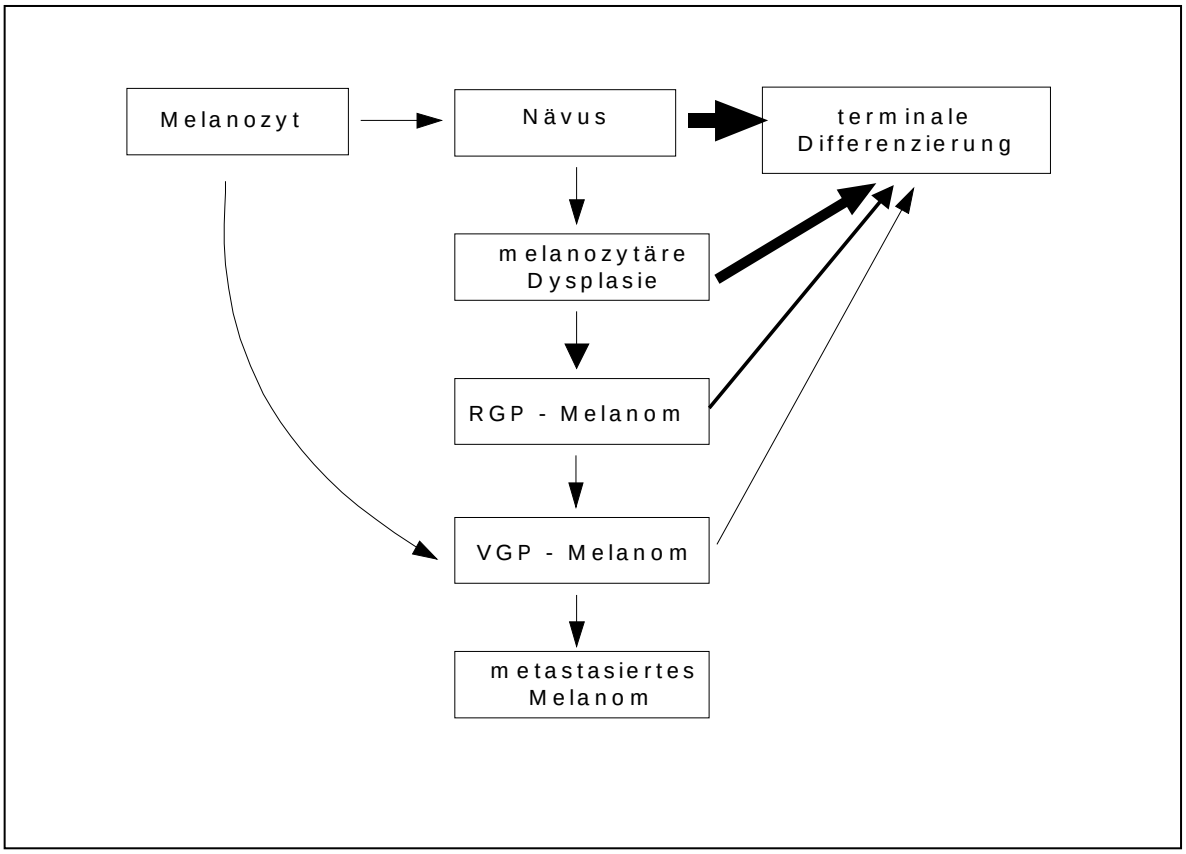


Abb. 1. Melanom-Progressionsmodell nach Clark et al.
(RGP = radial growth phase; VGP = vertical growth phase)

Die in der basalen Epidermis liegenden Melanozyten beginnen ihre neoplastische Transformation mit der anormalen Proliferation eines einzelnen Melanozyten. Teilweise handelt es sich dabei um eine vorerst benigne Umwandlung. Das Wachstumsmuster erfolgt zuerst radial (RGP) und ist durch zunehmenden Verlust der zwischenzellulären Bindungen gekennzeichnet. Des weiteren kommt es zum Überschreiten der Basalmembran und lnvasion in die darunter liegenden Schichten der Dermis (VGP). Dadurch erreicht der Tumor die Lymph- sowie Blutgefäße und erfüllt die Kriterien der Malignität, denn nun ist er im Stande Fernmetastasen zu bilden. Das Stadium der terminalen Ausdifferenzierung und damit der Tumorregression wird eher selten erreicht.

Es werden auch spontane VGP-Melanomentstehungen beschrieben, die ohne die Zwischenstufe des Nävus verlaufen.

In den meisten Fällen wird jedoch die spätere Entwicklung eines Melanoms in engen Zusammenhang mit dem Vorhandensein der zunächst benignen Läsionen (z.B. Nävi) gebracht (Schlüssel der Melanominzidenz [Rampen, van der Meeren et al., 1986]). Dies führte zu dem Schluss, dass die Präventionsmaßnahmen zur Entstehung von atypischen Nävi gleichzeitig als

Melanomprävention betrachtet werden können. Diese Maßnahmen sollten sich vor allem auf die Kindheit und das Jugendalter konzentrieren und hauptsächlich die Verminderung der UV-Exposition (Sonne) durch „ln-den-Schatten-Gehen“, langärmlige/langbeinige Kleidung und ähnliches beinhalten. Ob Sonnenschutzmittel diesen Zweck gleichermaßen erfüllen, konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. In den bis heute durchgeführten Fall-Kontroll-Studien hat sich die Melanominzidenz bei Anwendung dieser Mittel nicht vermindert, ganz im Gegenteil, sie war in manchen Studien sogar höher als ohne Anwendung dieser Substanzen [Westerdahl, Olsson, lngvar et al., 1995; Garland et al., 1992].

Die Prognose für den Patienten richtet sich nach der Tumordicke bei der Exzision, dabei kann man diese als eindimensionales Maß für die Tumorgröße ansehen. Ist der Tumor nicht dicker als 0,75 mm, so kann man von einer 10-Jahres-Überlebensrate von 97% ausgehen. Die 10-Jahres-Überlebensrate sinkt entsprechend der zunehmenden Tumordicke. So beträgt sie bei einem mehr als 4 mm dicken Melanom nur noch 50%. Eine kurative Therapie durch operative Entfernung des Tumors gelingt nur in sehr frühen Stadien, da wie schon gesagt, das Melanom schon bei sehr kleinem Tumorvolumen fernmetastasiert. Können solche Fernmetastasen nachgewiesen werden, so sinkt die 10-Jahres-Übelebensrate auf unter 5%.

Wegen der steigenden Bedeutung des Melanoms unter den Krebserkrankungen sind in der jüngsten Zeit verschiedene Tumormarker entwickelt worden. Mit Hilfe dieser Marker verspricht man sich bessere Diagnose- und Therapieerfolge sowie aussagekräftigere Verlaufskontrollen.
Tumormarker sind Substanzen, deren Vorhandensein und Konzentrationsschwankungen im menschlichen Blut idealerweise streng tumorspezifisch sind und sich mit dessen Wachstumsverhalten proportional verändern.
Für das maligne Melanom sind folgende Tumormarker beschrieben worden:

- Melaninmetabolite: 5-S-CD, α-MSH, 6-H-5-MI-2-C, Tyrosinase [Horikoshi et al., 1994; Hara et al., 1993; Sonesson et al., 1995; Schwartze et al., 1994].
- tumorassozierte Antigene: neuronenspezifische Enolase (NSE), S-100 [Hornef et al.,1992; Guo et al., 1995]; MIA (melanoma inhibitory activity) [Bosserhoff, 1996].
- Adhäsionsmoleküle: sICAM-1 [Harning et al., 1991].
- Zytokine : IL-8, IL-10, [Scheibenbogen et al., 1995; Dummer et al., 1995].

Im Rahmen intensiver Forschung wurden einige Genloci identifiziert, die mit dem erhöhten Melanom-Risiko in Zusammenhang gebracht werden, zu denen zählen beispielsweise 1p36, 6q, 9p21 [Goldstein, Dracopoli, et al., 1996].
Als interessanteste Region erwies sich der Locus 9p21, welcher das Zellzyklus-inhibierende Protein $p16^{INK4a}$ kodiert. Dieses Protein wurde in einigen familiären Melanomen als mutiert identifiziert, jedoch gibt es bis heute keinen entscheidenden Hinweis auf ein Gen, dessen Verlust bzw. Mutation bei einer Mehrzahl der Melanom-Patienten vorkommen würde.

2.2. Proliferation, Wachstumsfaktoren

Bei der Tumorprogression spielen Wachstumsfaktoren sowie ihre zellulären Rezeptoren eine sehr wichtige Rolle. Normale Zellen synthetisieren Wachstumsfaktoren als Antwort auf bestimmte Signale ihrer Umgebung, sie sind also parakrin kontrolliert. Tumorzellen sind von diesem Mechanismus völlig unabhängig und in der Lage ihre Wachstumsfaktoren selbständig, autochton zu sezernieren.
Als zentraler Wachstumsregulator gilt bei den Melanozyten das bFGF (basic fibroblast growth factor). Die Melanomzellen hingegen sind fähig diesen Faktor selbst zu sezernieren und sind daher von exogenem bFGF unabhängig. Hemmt man das vom Melanom exprimierte bFGF durch Antikörper oder Antisense-Oligonukleotide, kommt es zur Inhibition des Tumorzellwachstums [Becker et al, 1989]. Die Rolle von bFGF scheint sich jedoch nicht nur auf die Stimulation des Zellwachstums zu beschränken, es begünstigt auch die Progression des Melanoms, indem es als Angiogenesefaktor wirkt sowie diverse Proteasen (z.B uPA = Plasminogenaktivator) und Kollagenase Typ IV aktiviert.
Einen wichtigen Stellenwert haben auch die Proteine der TGF- β -Familie, insbesondere das TGF-β2 wird von den Melanomzellen sehr stark exprimiert. TGF-β Proteine sind in Wachstumsregulation, Wundheilung und Angiogenese involviert, sowohl als Stimulatoren als auch als Inhibitoren. In Melanom-Zelllinien wurde starke TGF-β2-Expression nachgewiesen, nicht jedoch in den Melanozyten, diese Zellen sezenieren nur TGF-β1 und TGF-β3.
TGF-β2 reguliert die Proliferation und Differenzierung der Zellen, es kann aber auch durch Hemmung der T-Zell-Funktion immunsupprimierend wirken, und damit das „immune escape“-Phänomen weiter begünstigen.

In ihren *in-situ*-Hybridisierungsversuchen hat die Arbeitsgruppe um Reed gezeigt, dass die TGF-β2 Expression durch Melanomzellen mit deren Invasierung und Metastasierung korreliert [Reed et al., 1994].

2.3. Adhäsionsmoleküle und Invasion

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Melanom fernmetastasiert, steigt ab einer Dicke von über 0,75 mm (Clark-I) deutlich. Zuerst werden regionäre Lymphknoten befallen, dann werden auf dem Blutweg Tochtergeschwüre in Lunge, Leber, Hirn und Haut gesetzt. Dazu bedarf die Zelle bestimmter Fähigkeiten, die einer normalen Zellen nicht zur Verfügung stehen.
Tumorzellen sind in der Lage, die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran proteolytisch abzubauen. Sie besitzen spezifische Adhäsionsmoleküle, die ein Attachment an Matrixproteine und an andere Zellen ermöglichen.
In dem Sinne werden von Melanomen während der Progression einige Integrine, Zelloberflächenrezeptoren, die Zell-Zell-Kontakte vermitteln und Anhaftung an Matrixproteine ermöglichen, vermehrt exprimiert. Zu diesen gehören αvβ3, α2β1, α4β1.
Dabei ist die Expression von αvβ3 stark mit der Invasivität des Tumors assoziiert. Dieses Integrin ermöglicht die Bindung der Zellen an eine große Zahl von Matrixproteinen. Es wird weder in dysplastischen Nävi noch in RGP-Primärtumoren (radial growth phase) gefunden, jedoch bei 66% der VGP-Melanome und 100% der metastasierten Melanome.
Ganz anders verhält es sich bei der Synthese von E-Cadherin, einem Protein, das die melanozytäre Adhäsion an Keratinozyten vermittelt und somit Regulatorfunktion bei der epidermalen Organisation und Morphologie übernimmt. Dieses interzelluläre Adhäsionsmolekül wird zwar von normalen Melanozyten exprimiert, jedoch nicht von den Melanomzellen. Dadurch verlieren die Melanomzellen die interzellulären Kontakte zu den Keratinozyten und können aus dem epidermalen Zellverband ausbrechen [Silye et al., 1998]. Es hat sich gezeigt, dass die E-Cadherin-Expression von Melanomen sich umgekehrt zum Krankheitsstadium verhält (metastasiertes Melanom < VGP-Melanom < RGP-Melanom, etc.) [Seline et al., 1996].

2.4. Transkriptionsfaktoren

Bei der Transkription wird die in der DNA kodierte Information in mRNA umgeschrieben. Der reibungslose Ablauf dieses Vorgangs hängt von der Wechselwirkung zwischen Promotorregionen und bestimmten Transkriptionsfaktoren ab, die durch ihre Bindung entweder hemmend oder stimulierend wirken. Logischerweise müsste sich die Funktion spezifischer Transkriptionsfaktoren auch bei der malignen Transformation von Melanozyten ändern, jedoch ist bis heute nur wenig davon bekannt.
Als melanomspezifisch wurden zwei Octamer-bindende (ATGCAAAT) Faktoren, Oct-M1 und Oct-M2 [Sturm et al., 1991], sowie ein POU-Domäne-Faktor Brn-2/N-Oct3 [Eisen et al., 1995] beschrieben.
Im weiteren konnte in 50% der Melanome eine Überexpression von c-myc gezeigt werden, ein Onkogen, das den Übergang aus der G0- in die G1-Phase des Zellzyklus positiv stimuliert und damit die Proliferation steigert. C-myc ist das Zielgen des APC-Signalweges, welcher schon im Kolonkarzinom gut charakterisiert werden konnte, und auch im Melanom eine Rolle zu spielen scheint [He et al., 1998]. Die Überexpression von c-myc korreliert bei Melanomen mit der verminderten Sekretion der HLA-1-Proteine. Dadurch ist die Identifizierung der Melanomzellen durch das Immunsystem nicht regelrecht gewährleistet [Peltenburg et al., 1994; Versteeg et al., 1988].

Es wurden auch Melanozyten-spezifische und -sensitive Transkriptionsfaktoren beschrieben, wie das MITF (Microphthalmia Transcription Factor), ein Protein, das spezifisch an das cis-regulatorische Element TDE (Tyrosinase Distal Elemant) im Tyrosinase-Promotor bindet und für das Überleben der Melanozyten essentiell ist [Aberdam et al.,1998; Fang et al., 1999].
Bis heute konnten jedoch keine Transkriptionsfaktoren isoliert werden, die in malignen Zellen im Gegensatz zu benignen Zellen über- oder neuexprimiert werden.

2.5. Onkogene und Tumorsuppressorgene

In den letzten Jahren wurden immer mehr Evidenzen erbracht, dass diverse Tumorsuppressorgene und Onkogene für die Entstehung von Malignomen verantwortlich sind. Auch für das maligne Melanom sind einige dieser Proteine untersucht worden.

Zu den häufigsten in Tumoren gefundenen Onkogenen gehören die Ras-Proteine, deren Familie aus H-Ras, K-Ras, und N-Ras besteht. Ras-Proteine spielen bei der intrazellulären Signaltransduktion eine wichtige Rolle, durch die Prozesse der Proliferation und Zelldifferenzierung gesteuert werden. Eine Mutation im Ras-Gen führt zu einem konstitutiv aktiven Ras-Protein und damit zur gesteigerten Zellproliferation. Solche Mutationen wurden auch für das Melanom beschrieben, sie kommen nur vereinzelt in melanozytären Nävi vor und nehmen mit dem Grad der Melanomprogression zu [Herlyn et al., 1996]. Die Analysen der Mutationen in den Ras-Genen haben gezeigt, dass sie alle durch UV-Licht induziert worden sind [Rünger et al., 1997].
Aktivierte Onkogene können allerdings nicht allein eine Tumorentstehung induzieren, wohl aber wenn zusätzlich Veränderungen in einem oder mehreren Tumorsuppressorgenen, wie p53 oder $p16^{INK4A}$, vorhanden sind [Boukamp et al., 1995; Chin et al., 1997].

2.5.1. p53, $p16^{INK4a}$ im malignen Melanom

Das p53 zählt heutzutage zu den wohl am meisten und besten untersuchten Tumorsuppressorgenen. Es ist bei der Entstehung von mehr als 50% aller humanen Krebserkrankungen involviert [Harris et al., 1996]. Die Funktion von p53 besteht in der Drosselung des Zellwachstums. Wird das Erbgut der Zelle beschädigt, so wird der Zellzyklus gestoppt bis der Schaden behoben, oder bei zu großen/irreparablen Schäden die Apoptose der Zelle eingeleitet wird [Wynford et al., 1996]. Im Gegensatz zu zahlreichen anderen malignen Tumoren lassen sich in Melanomen aber keine p53 Mutationen nachweisen [Weiss et al., 1995].
Ganz anders verhält es sich bei $p16^{INK4a}$, einem weiteren Tumorsuppressorgen. Mutationen im $p16^{INK4a}$-Gen wurden in einer Vielzahl von malignen Melanomen gefunden, z.B. fand die Arbeitsgruppe von Kamb in 91 von 128 untersuchten Melanomzelllinien genetische $p16^{INK4a}$-Veränderungen [Nabori et al., 1994, Kamb et al., 1995]. $p16^{INK4a}$ gehört zu den Inhibitoren der Zyklin-D-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK, cyclin dependent kinase). Damit wirkt es als direkter Zellzyklushemmer, indem es den durch CDKs bewirkten Übergang der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus hemmt.
In verschiedenen Melanombiopsien ergab sich jedoch, dass nur 20% der Tumore homo- bzw. heterozygote Mutationen des $p16^{INK4a}$-Gens aufweisen, ferner konnten in 75% der

untersuchten dysplastischen Nävi $p16^{INK4a}$-Genveränderungen gefunden werden [Cairns et al., 1994; Lee et al.,1997].

Immunhistochemische Untersuchungen in melanozytären Tumoren ergaben weitere Hinweise auf die Bedeutung von $p16^{INK4a}$ in der Tumorprogression, bei der die $p16^{INK4a}$-Expression fortlaufend abnahm [Wang et al., 1996]. Auch das CDK4-Protein scheint dabei eine Rolle zu spielen, da es in 58% der untersuchten Melanozyten, jedoch in keinem einzigen der überprüften Nävi nachweisbar war [Wang et al., 1996].

Es ist bis heute noch nicht geklärt, welche molekularen Mechanismen zu der verminderten Expression des $p16^{INK4a}$-Proteins führen. Als eine der möglichen Ursachen wird eine reduzierte $p16^{INK4a}$-Transkription durch veränderte Promotormethylierung des Gens vermutet, da nur eine kleine Anzahl der Melanome $p16^{INK4a}$-Genmutationen aufwies, wohingegen die Melanomzelllinien eine $p16^{INK4a}$-Inaktivierung durch Deletionen und Mutationen im $p16^{INK4a}$-Gen zeigten [Ohta et al., 1994].

Die bisherigen Befunde deuten auf eine relativ frühe Beteiligung von $p16^{INK4a}$ in der Karzinogenese, die aber keine Progression des Nävus zum malignen Melanom bewirkt. Deshalb sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Rolle von $p16^{INK4a}$ in sporadischen und familiären Melanomen aufzuklären.

3. Die Rolle von $p16^{INK4a}$ und $p19^{ARF}$ als Tumorsuppressorgene

Teilungsfähige somatische Zellen sind in der Lage, aus ihrem normalen Aktivitätszustand in den Prozess des Zellzyklus einzutreten, dessen Konsequenz eine Zellzahlvermehrung ist. Der regelrechte Zyklusablauf wird von verschiedenen, meist an den Übergangspunkten einzelner Phasen, eingeschalteten externen Faktoren beeinflusst. Von dieser ungestörten Regulation hängt nicht nur der folgende, angemessene Zellzuwachs, sondern auch die Effizienz des DNA-Reparatursystems ab. Zu den wesentlichen Effektoren dieser Regulationsvorgänge gehören beim Menschen Komplexe aus einer Reihe von Kinasen (z.B. CDK2, CDK4, CDK6, etc.) und den dazu gehörigen nichtenzymatischen Zyklinen (z.B. A, B1, D1, D2, E, etc.).

Die Funktion dieser zyklin-abhängigen Kinasen wird wiederum von einer Reihe verschiedener Tumorsuppressorgene reguliert. Hier ergibt sich die Frage, in welcher Weise die Veränderungen dieser Tumorsuppressorgene sich auf den Ablauf des Zellzyklus auswirken und ob sie dadurch Tumorwachstum induzieren können.

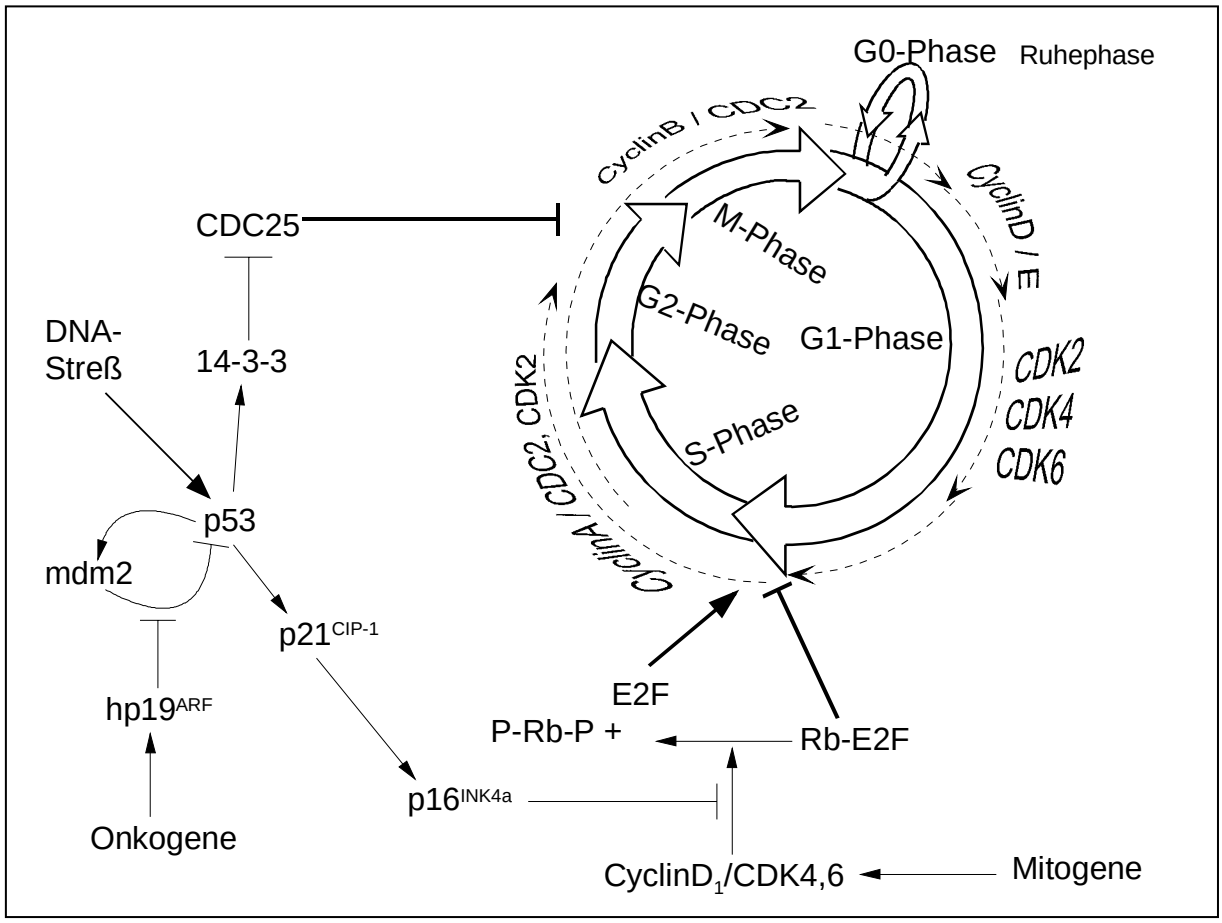


Abb. 2. Schema des Zellzyklus (spitze Pfeile=aktivierende Wirkung, stumpfe Pfeile=hemmende Wirkung).

In diesem Zusammenhang konnte Ende der 80-er Jahre durch vier verschiedene, voneinander unabhängige Arbeitsgruppen ein Tumorsuppressorgen beschrieben werden, dessen Mutationen relevant für die Entwicklung maligner Melanome ist [Cowan et al., 1988; Dracopoli et al., 1987; Kecker et al., 1990; Pedersen und Wang, 1989]. Es wurde CMM2 benannt und ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9p2l lokalisiert. In diesem Locus konnten zytogenetisch in Melanomzelllinien homozygote Verluste nachgewiesen werden [Fountain et al., 1992]. Durch weitergehende Analysen wurde schließlich das Melanomsuppressorgen CDKN2A, auch als $p16^{INK4a}$ bezeichnet, isoliert [Kamb et al., 1994]. Mutationen in diesem Genbereich sind zwar in einigen anderen soliden Tumoren nachweisbar (z.B. Pankreaskarzinome, Gliome), jedoch wird die Mehrzahl bei den Melanomen beobachtet. In der Studie von Kamb et al. waren es 91 von 128 Fällen [Gruis, Weaver-Feldhaus, et al., 1995]. Auch das Mutationsmuster, C:T- bzw. CC:TT-Transitionen, ist charakteristisch für eine UV-induzierte Mutation und entspricht der Tatsache, dass das UV-Licht zu den

Hauptrisikofaktoren für Melanomentstehung gilt.

Die Ergebnisse intensiver Forschung mit Linkage-Untersuchungen in Melanomfamilien bestärkten die Vermutung, dass sich auf Chromosom 9p2l, in der Region um das p16-Gen ein initiales Melanomgen befindet [Cannon-Albright et al., 1992; Gruis et al., 1995].

Das $p16^{INK4}$-Gen kodiert für ein p16-Protein, das zu den Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinase 4 und 6 (CDK4, CDK6) gehört. Es spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus, denn durch die Hemmung von CDK4/CDK6 wird die von diesen normalerweise bewirkte inaktivierende Phosphorylierung vom Retinoblastom-Protein verhindert und dadurch der Eintritt der Zellen in die prämiotische S-Phase blockiert [Weinberg, 1995; Sherr and Roberts, 1995; Sherr, 1996].

Ist das pl6-Protein durch Mutationen funktionslos oder gar verloren gegangen, kommt es zu einem abnormen Zellwachstum. Ähnliche Effekte lassen sich auch in Zellen beobachten, die eine Störung des Retinoblastom-Proteins aufweisen, da sie dadurch resistent gegen die Wirkung von $p16^{INK4a}$ sind [Guan et al., 1994].

Weitere Untersuchungen belegten die Bedeutung von $p16^{INK4a}$ für die malignen Melanome. So fand die Gruppe von Wang vergleichsweise in Nävi 61% pl6-Expression, dagegen in Melanomen nur 6% pl6-Expression, die bei fortgeschrittenen Tumoren immer mehr abnahm, was für einen zunehmenden Verlust von pl6 mit steigender Malignität des Tumors spricht.

Mitte der 90-er Jahre wurde von Puig die Hypothese aufgestellt, dass sich auf dem Chromosom 9p21 noch weitere Melanom-relevante Gene befinden, gestützt auf den Befund, dass in einigen Tumoren mit Verlusten in diesem Genbereich die Beteiligung von CDKN2A ausgeschlossen werden konnte [Puig et al., 1995].

Bei dem Versuch der Isolation und Charakterisierung der Maus-cDNA für $p16^{INK4a}$ stieß die Gruppe um Quelle zum ersten Mal auf das β-Transkript vom Exon1 des INK4a-Locus. Die weiteren Untersuchungen ergaben ein alternatives Transkript auf dem Chromosom 4 (entspricht dem humanen Chromosom 9p21). Das daraus entstehende Protein umfasst bei der Maus 169 Aminosäuren, und wurde als $p19^{ARF}$ bezeichnet [Quelle et al., 1995a, 1995b].

Durch nachfolgende Experimente konnte beobachtet werden, dass $p19^{ARF}$ zwar nicht direkt als CDK-Inhibitor fungiert, jedoch trotzdem in der Lage ist einen Zellzyklus-Arrest in den Phasen G1 und G2 zu bewirken. Weiterhin stellte sich heraus, dass die $p19^{ARF}$-Expression in Tumorzellen erhöht ist, in denen p53-Mutationen vorhanden sind bzw. das p53 durch MDM2-Überexpression stark supprimiert ist [Quelle et al., 1995b].

Innerhalb kurzer Zeit wurde auch das humane Äquivalent zu $p19^{ARF}$ durch kombinierte PCR und Analyse von genomischer DNA gefunden. Es befindet sich auf dem Chromosom 9p21

[Duro et al., 1995; Mao et al., 1995; Stone et al, 1995].
Das humane $p19^{ARF}$ ist in drei Exons (1ß, 2, 3) unterteilt. Die Exons 2 und 3 sind $hp19^{ARF}$ und $p16^{INK4a}$ gemeinsam, der Unterschied liegt für beide im Exon 1. Dieser Zusammenhang wird in der Bezeichnung wiedergegeben, denn ARF steht für **al**ternativ **r**eading **f**rame. In neuester Zeit gehen die Namensgebungen für dieses Gen in der Fachliteratur stark auseinander, so beschreiben die Begriffe $p14^{ARF}$-, ARF- oder $hp19^{ARF}$-Gen, alle das gleiche Gen [Duro et al., 1995; Jiang et al., 1995; Mao et al., 1995].
Für eine klare Terminologie werden folgende Begriffe verwendet: $p19^{ARF}$-Gen ist das zuerst entdeckt murine Gen; $p14^{ARF}$-Gen ist das humane, homologe Gen und wird neuerdings auch oft als $hp19^{ARF}$-Gen bezeichnet, definiert nach dem murinen Protein. In den weiteren Ausführungen wird $hp19^{ARF}$ als Begriff für das humane Gen oder Protein benutzt.

Die Arbeitsgruppen um Mao und Stone konnten auch das dazu gehörige Protein identifizieren, es besteht aus 132 AS und hat ein Molekulargewicht von ca. 14 kd. Aus diesem Grund wurde es ursprünglich als $p14^{ARF}$ bezeichnet (siehe oben) [Mao et al., 1995; Stone et al., 1995].
Zwar zeigte das humane Protein im Vergleich zum murinen $p19^{ARF}$ nur 50% Übereinstimmung im Bereich von Exon 1β, doch konnte man anhand der Transfektionsversuche zeigen, dass auch das β-Transkript der menschlichen cDNA in der Lage ist, einen Zellzyklus-Arrest zu bewirken [Liggett et al., 1996; Arap et al., 1997].
Anhand der vorliegenden Daten konnte die Theorie über die Möglichkeit der alternativen Transkription des INK4a-Locus auf dem Chromosom 9p21 aufgestellt werden, sowie über die Funktionsweise der darin kodierten, voneinander unabhängigen Proteine ($p16^{INK}$ und $hp19^{ARF}$), die beide zu der Familie der Tumorsuppressorgene gehören.
$Hp19^{ARF}$ wurde in den Zellkernen von asynchron wachsenden Zellen nachgewiesen, sobald es jedoch zu einer ektopen Expression von $hp19^{ARF}$ kommt, wird in den Zellen ein Zellzyklusarrest in G1 und/oder G2 veranlasst. Dabei ist die $hp19^{ARF}$-vermittelte Zellzyklushemmung durch eine Hochregulation von p53 und $p21^{CIP1}$ begleitet. Interessanterweise konnten keine $hp19^{ARF}$-Effekte in Zellen beobachtet werden, die entweder MDM2- bzw. p53-Verluste aufwiesen oder das HPV-E6-Protein (humanes Papillomavirus E6) exprimierten. Daraus schloss man, dass die $hp19^{ARF}$-Funktion sowohl mit p53 als auch MDM2 zusammenhängt, und zwar führen dabei erhöhte MDM2-Spiegeln zu einer $hp19^{ARF}$-vermittelten p53-Aktivierung.
Es konnte noch nicht stichhaltig nachgewiesen werden, dass $hp19^{ARF}$ in der Antwort auf

DNA-Schäden involviert ist. Vielmehr wird von diversen Arbeitsgruppen ein Modell vertreten, in dem hp19^{ARF} als ein separater Weg oberhalb von p53 dargestellt wird.

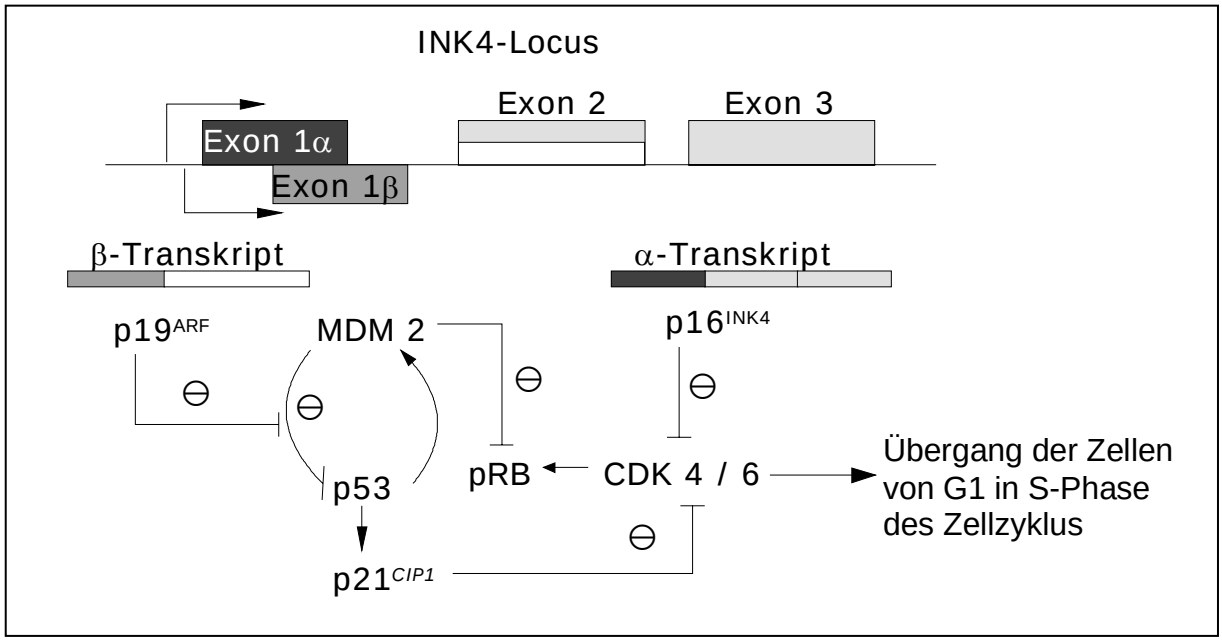


Abb. 3. 1 Gen = 2 unabhängige Proteine; eine hypothetische Darstellung der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Tumorsuppressorgenen (nach Chin, Pomerantz, DePinho, 1998)

Der INK-Locus auf Chromosom 9p21 kann in seinem ersten Exon (1β und 1α) alternativ gelesen werden. Die Exons 2 und 3 werden zwar normal abgelesen, allerdings ergibt sich durch die Alternativen im 1. Exon ein anderes Leseraster mit den daraus folgenden unterschiedlichen Translationsprodukten.

Auf diesem Wege entsteht aus 1α + 2 + 3 das p16^{INK4}, der bekannte CDK4/6-Inhibitor und aus 1β + 2 +3 das hp19^{ARF}, ein Hemmer von MDM2.

Normalerweise besteht die Aufgabe von MDM2 in der p53-Inhibition. Durch die direkte Wirkung von hp19^{ARF} wird diese jedoch aufgehoben, und p53 ist wieder als Tumorsuppressorgen in der Lage einen Zellzyklusarrest zu veranlassen. Dies geschieht unter der Mitbeteiligung von p21^{CIP1}, welches genauso wie das p16^{INK4a}, zu den CDK 4/6-Inhibitoren gehört. Hierbei wird p21^{CIP1} als der Vollstrecker des p53-Weges, der gewöhnlich bei Vorkommen von DNA-Schäden eingeschaltet wird, angesehen. p21^{CIP} ist in der Lage G1-

spezifische CDK-Komplexe zu blockieren, sowie an nukleäre Antigene von proliferierenden Zellen zu binden [Brugarolas et al., 1994; Review in Sherr and Roberts, 1995].
In einer Reihe untersuchter humaner Tumore wurde ein Zusammenhang zwischen p53 und $hp19^{ARF}$ beobachtet, der in der Funktionsweise Parallelen zu dem zwischen $p16^{INK4a}$ und RB aufweist, dabei ergibt sich eine umgekehrte Proportionalität zwischen den p53- und $hp19^{ARF}$-Spiegeln in der Zelle [Li et al., 1994; Hara et al., 1996].
Das $hp19^{ARF}$ gehört aufgrund seiner tumorsuppressiven Wirkung zu den in der letzten Zeit am meisten untersuchten Proteinen dieser Art. Da $hp19^{ARF}$ als alternatives Produkt bei der Transkription des INK-Locus für $p16^{INK4a}$ entsteht, stellt sich die Frage über den Status der beiden Tumorsuppressoren. In ihren Experimenten fanden Carnero et al., dass es nicht ausreicht bei inaktiven $hp19^{ARF}$ allein das $p16^{INK4A}$ wieder zu reaktivieren um einen suffizienten Zellzyklusarrest zu bewirken [Carnero et al., 2000].
Mit dem Problem der Relevanz von $hp19^{ARF}$ beschäftigen sich in jüngster Zeit sehr viele molekularbiologische Arbeitsgruppen. Die Arbeitsgruppe um Kamijo analysierte Mäuse mit $p19^{ARF}$-Mutationen. Tiere, die heterozygote Deletionen aufwiesen, entwickelten diverse Tumore mit langer Latenzzeit, hingegen bildeten sich bei ARF-Null-Mäusen hauptsächlich Tumore des Nervensystems [Kamijo et al., 1999].

Fast täglich werden neue Berichte über eine Relevanz von $p19^{ARF}$ bei verschiedenen menschlichen Tumoren veröffentlicht, von denen einige vorgestellt werden sollen:

- *Saridaki et al., 2000* untersuchten mittels PCR genomische DNA von Basalzell-Karzinomen der Haut bei 67 griechischen Patienten und fanden zwar bei 55% Mutationen auf Chromosom 9p21, die jedoch nicht das $hp19^{ARF}$ betrafen;
- *Faderl et al., 1999,* fanden mit Hilfe von Southern-Blots bei 40% der analysierten Patienten mit Lymphoblastischer Leukämie Deletionen von $p16^{INK4A}$/$hp19^{ARF}$;
- *Ishii et al., 1999,* fanden in 64,7% der geprüften Gliome Mutationen in $p19^{ARF}$;
- *Brenner et al. 1996*, analysierten Mammakarzinome und stellten keine relevante Beziehung zwischen $hp19^{ARF}$ und der Tumorentstehung fest; sie führten RT-PCRs und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisation von Interphase-Chromosomen durch;
- *Gazzeri et al. 1998*, prüften immunhistochemisch grosszellige Bronchialkarzinome und fanden in 78,5% einen Verlust des $hp19^{ARF}$-Proteins. In den nachfolgenden Untersuchungen des β–Transkripts konnte jedoch keine Mutationen festgestellt werden, so dass eine Störung auf der Translationsebene des Proteins angenommen werden kann;

- *Della Valle et al., 1997*, befassten sich mit B-Zell-Lymphomen sowie Leukämien und kamen ähnlich wie die Arbeitsgruppe um Gazzeri zu der Annahme, dass es sich wahrscheinlich um eine Störung des Translationsmechansimus handeln muss, der zum Verlust des $hp19^{ARF}$-Proteins führte.

Es scheint, dass $hp19^{ARF}$ in den verschiedenen Tumortypen uneinheitlich exprimiert wird. Jedoch bleibt die Frage über seine Rolle bei der allgemeinen Karzinogenese noch ungeklärt.

4. Fragestellung

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, Tumorsuppressorgen $hp19^{ARF}$ in Bezug auf die Melanom-Entstehung und Progression zu untersuchen. Da bis zum Beginn der Doktorarbeit noch keine Daten über diesen Zusammenhang vorlagen, sollte das Gen und sein Produktprotein gezielt in einigen MelanomZelllinien überprüft werden. Hierzu war es notwendig, einige Zellkulturen der zu untersuchenden Melanome anzulegen, um hieraus die DNA sowie Zellproteine zu extrahieren.
Um die Frage zu klären, ob nicht nur das Gen, sondern auch der Translationsweg Störungen aufweist, wurden die Zelllinien sowohl mit PCR als auch mit Western-Blots untersucht.
Die Frage nach der Expression des Proteins *in vivo* sollte anhand immunhistochemischer Färbungen an ausgewählten Melanomgeweben beantwortet werden.

IV. Material und Methoden

Alle Versuche wurden mit sterilen Gefässen und Pipettenspitzen durchgeführt. Zur Anfertigung sämtlicher Puffer und Medien wurde ultrafiltriertes Wasser verwendet.

1. Lösungen, Puffer, Medien

Acrylamid-Lösung:

30%	60 g Acrylamid 1,6 g Bisacrylamid mit bidest H_2O auf 200 ml auffüllen
40%	80g Acrylamid 2,14 g Bisacrylamid mit bidest H_2O auf 200ml auffüllen

APS: 25g APS in 1000 ml bidest H_2O lösen

Blotpuffer: 90 mM Tris/HCl pH 8,5
25 mM Glycin
50 ml 10% Methanol
mit bidest H_2O auf 500 ml auffüllen

Blaumarker:

DNA	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol in H_2O 40% Sucrose
RNA	5 ml 50% Glycerin 0,03 g 1mM EDTA 0,25 g 0,25% Bromphenolblau 0,25 g 0,25% Xylencyanol mit DEPC- H_2O auf 10 ml auffüllen

DAB-Färbelösung:
0,3 g Tris
50 ml bidest H_2O $\Rightarrow$ pH 7,6 einstellen
3 DAB-Tabletten lösen, lichtgeschützt aufbewahren
15 µl H_2O_2 $\Rightarrow$ aktiviert den Färbekomplex, kurz vor Gebrauch hinzugeben

Elektrodenpuffer:
3 g Tris/HCl pH 8,5
1 g SDS
14,4 g Glycin
mit bidest H_2O auf 1000 ml auffüllen

EtBr-Lösung
1 Tablette in 10ml bidest H_2O lösen $\Rightarrow$ 1 $^{mg}/_{ml}$ konz. Lösung

PBS 10x:
80 g NaCl
2 g KCl
11,6 g Na_2HPO_4
2 g K_2HPO_4
mit bidest H_2O auf 1000 ml auffüllen, pH 7,4 einstellen

PEG-Mix:
52,4g PEG 8000 (Polyethylen Glycol), pH 5,2
40 ml 3M NaOAc
1,32 ml 1M $MgCl_2$
mit bidest H_2O auf 200 ml auffüllen

RIPA-Puffer:
50 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
1% Nonidet® P40
0,5% Natriumdesoxycholat
01% SDS
Proteasen-Inhibitor

RNA-Isolierung:

DEPC-H_2O
0,1% DEPC in bidest H_2O
⇒ autoklavieren

20x Gel-Puffer
0,8 g MOPS
0,2 M NaOAc
20 mM EDTA
⇒ pH 7,0 einstellen

Auftragspuffer
45 µl Formaldehyd
45 µl Formamid
5 µl 10x MOPS
3,5 µl EtBr-Lösung (10 $^{mg}/_{ml}$)
1,5 µl EDTA (0,1 M) pH 7,5
8 µl Bromphenolblau

RNA-Gele	95% N,N-Dimethylformamid 5 mM EDTA 0,2% Bromphenolblau 0,2% Xylencyanol
RNase-Lösung	10 mM Tris/HCl pH 7,0 10 $^{mg}/_{ml}$ RNase A DNasen werden durch 15 min erhitzen bei 95°C inaktiviert

10% SDS:	100 g SDS in 1000ml bidest H_2O lösen, dabei leicht erwärmen
TAE:	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5M EDTA mit bidest H_2O auf 1000 ml auffüllen, pH 8,0 einstellen
Tris-HCl-Puffer:	60,57 g Tris in 500 ml bidest H_2O lösen mit 1 M HCl pH 7,4 einstellen
Tris-Natriumcitrat-Puffer:	2,941 g Tris in 1000 ml bidest H_2O lösen pH 6,0 einstellen, bei 4°C lagern
TBS:	5,3 g NaCl 1,2 g Tris in 1000 ml bidest H_2O lösen, pH 7,4 einstellen

Trypsin:

0,1%	300 mg Trypsin
	300 mg $CaCl_2$
	300 ml Tris-HCl (0,05 M)
	in bidest H_2O lösen, pH 7,8 einstellen
0,01%	2 ml Trypsin 0,1%
	20 ml Tris-HCl
	18 ml bidest H_2O

Citrat-Puffer:

Stammlösung A	21,01 g Zitronensäure
	mit bidest H_2O auf 1000 ml auffüllen
Stammlösung B	29,41 g Natriumcitrat
	mit bidest H_2O auf 1000 ml auffüllen
Gebrauchslösung	36 ml Lösung A
	164 ml Lösung B
	1800 ml bidest H_2O

2. Materialien

2.1. Chemikalien

Applied Biosystems	Sequenzierungsmastermix
Apotheke - Klinikum RWTH-Aachen	Methanol, Hämalaun

Bio Source Int.	$p19^{ARF}$-Antikörper
Boehringer Mannheim GmbH	RIPA-Buffer-Set (Core-Puffer, NaCl, Detergenzien-Mix, SDS, 25 Complete™), Sekundär-Antikörper (Anti-Rabbit-AP), 10xPCR-Puffer, Taq-Polymerase
Boehringer Ingelheim Bioproducts,	Vectastain-ABC-Kit
Biozym Diagnostic GmbH	2x Safe File Puffer
Bio Rad	Sequi-Blot PVDF-Membran
Falcon	Zellkulturartikel, ELISA-Platten
Genosys	Oligosynthese (für $p19^{ARF}$-Primer)
Life Technologies (Gibco)	Superscript-II reverse Transkriptase, 0,1M DTT, 1stStand Buffer, DNA-Längsstandard (100bp)
MWG Biotech AG	Oligosynthese (für β-Aktin- und GapDH-Primer)
Merck	Magermilch, Tris-Amminomethan, Aquatex-Kleber
Novex Invitrogen Co., San Diego USA	Nu-Page-Elektrophoresis-System, Nu-Page-Runing-Buffer, Nu-Page-Transfer-Buffer, Proteinstandard: Seeblue und Seeblue2
Pierce	BCA-Protein Assay Reagent
PAA Laboratories GmbH	DMEM-Medium, foetales Kälberserum,
Qiagen, Hilden	RNeasy-MiniKit, RNase-freies Wasser, QlAquick-DNA-Kit

Roth GmbH, Karlsruhe	Roti® -Load
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Taq-Polymerase, RNase A
Sigma	Ampicillin, Bovines-Serumalbumin, BCIP/NBT-Färbetabletten, DAB-Färbetabletten, Einzelkomponenten für PAA-Gele, Acrylamid
Vector Laboratories, Burlingame	Normal Horse Serum

2.2. Molekulargewichtsstandards

Verwendet wurde der DNA-Längsstandard IV 100bp von Life Technologies-Gibco:

2072 bp
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100

Für Proteine wurde der Molekulargewichtsstandard Seeblue von Novex Invitrogen Co. (San Diego, USA) eingesetzt.

250kDa
98kDa
64kDa
50kDa
36kDa
30 kDa
16 kDa
6 kDa
4 kDa

2.3. Geräte

Autoklav	- Varioklav, H+P Labortechnik GmbH
Elektrophorese	- Biometra, Göttingen
	- Internat. Biotechnologies Inc., New Haven
	- Serva, Heidelberg
Elisa-Reader	- Molecular Devices, München
Heizblöcke	- Eppendorf, Hamburg
Heizrotor	- Janke + Kunkel, Staufen
Immunhisto-System	- Schenden,
	- Werkstatt, RWTH-Aachen
LaminAir und Brutschränke	- Heraeus, Hanau
Netzgeräte	- Amersham Pharmacia Biotech
	- Serva, Heidelberg
PCR-Maschine	- Biozym, Oldendorf
Pipetten	- Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	- WTW, Weilheim
Sequenzierungsgerät	- Applied Biosystems, Foster City
Taumler	- Heideloph, Kehlheim
UV-Bank	- Herolab GmbH, Wiesloch
UV-Kamera und Computer	- MWG-Biotech GmbH, Ebersberg
Vortex	- Heidolph, Kehlheim
Wasserzubereiter	- Millipore, Molsheim
Zentrifugen	- Kendro, Osterode
	- Eppendorf, Hamburg
	- Savant (SpeedVac),

2.4. RNA, cDNA, Proteinlysate

Die RNA, cDNA und Protein-Ripa-Lysate wurden selbstständig mit den unten aufgeführten molekularbiologischen Methoden aus den folgenden Zelllinien gewonnen: Mel-Im, Melan A, Mel-Wei, Mel-Ei, Sk-Mel, Mel-Ho, HTZ-19d, Mel-Ju, Mel-Juso, Ph-Mel, He-La, PT_3, KM_3, Myozyten, HCT 116.

2.5. Primer

$p19^{ARF}$-Primer

for2: 5’-ATG GTG CGC AGG TTC TTG G-3’
for3: 5’-GAG GAG CCA GCG TCT AGG-3’
rev2: 5’-TCA GCC AGG TCC ACG GGC-3’
rev3: 5’-CCC ATC ATC ATG ACC TGG-3’

β-Aktin-Primer

for: 5’-CTA CGT CGC CCT GGA CTT CGA GC-3’
rev: 5’-GAT GCA GCC GCC GAT CCA CAC GG-3’

GAPDH-Primer

for: 5’-GGC TCT CCA GAA CAT CAT CCC TGC-3’
rev: 5’-GGG TGT CGC TGT TGA AGT CAG AGG-3’

Sequenzierungsprimer

Zur Sequenzierung der $p19^{ARF}$-DNA-Fragmente wurden die oben aufgelisteten $p19^{ARF}$-Primer verwendet.

2.6. Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen, sowie Western-Blots fand folgender Antikörper der Firma BioSource Int. Anwendung:
Anti-$p19^{ARF}$: Rabbit-Pab-Anti-ARF, Größe $0{,}5\,^{mg}/_{ml}$

2.7. Zelllinien

Murine Zelllinien: Melan A (melanozytäre Maus-Zelllinie, Ian Hart London)

Humane Zelllinien:

Mel-Im (J. Johnson, München)
Mel-Ei (J. Johnson, München)
Mel-Wei (DSM ACC 109)
Sk-Mel 28 (DSM ACC 61)
Mel-Ho (J. Johnson, München)
HTZ-19d (Uni-Würzburg, aus human. Melanom-Hirnmetastase)
Mel-Ju (J. Johnson, München)
Mel-Juso (J. Johnson, München)
Ph-Mel=primäre humane Melanozyten (Institut für Pathologie, RWTH-Aachen)
He La (ATCC CRL-7923, aus humanen Cervixkarzinom)
PT_3 (humane Fibroblasten, Inst. für Pathologie, RWTH-Aachen)
KM_3 (humane Fibroblasten, Inst. f. Pathologie, RWTH-Aachen)
Myozyten (Institut für Pathologie, RWTH-Aachen)
HCT 116 (ATCC CCL-247, aus Colonkarzinom)

2.8. Gewebeschnitte

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an Patienten-Gewebematerial vorgenommen, das uns von der dermatologischen und pathologischen Abteilung der Universität München zur Verfügung gestellt wurde.

3. Molekularbiologische Methoden

Zur Zellkultivierung sowie zum molekularbiologischen Arbeiten wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Die Durchführung aller Experimente erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

3.1 Gelelektrophorese

3.1.1. Agarose Gele

Die Agarose-Gel-Elektrophorese zählt zu den einfachsten und effektivsten Methoden die DNA-Fragmente (wie z.B. PCR-Produkte) nach ihrer Größe, d.h. der Anzahl der Basenpaare in einem Bereich von 150 bis 2500 bp aufzutrennen. Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente handelt es sich um 0,8 bis 2%-ige Agarose-Gele, die aus der entsprechenden Menge Agarose gelöst in 1x TAE-Puffer bestanden.
Den Proben wurde zuckerhaltiger Färbepuffer beigemengt. Dadurch konnten gleichzeitig das Einsinken der Proben in die Geltaschen ermöglicht, sowie deren Laufverhalten optisch verfolgt werden.
Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 110 Volt. Der Nachweis der DNA-Fragmente wurde auf zweierlei Weise durchgeführt, entweder man versetzte die Agarose und den Ladepuffer vor der Elektrophorese mit EtBr oder inkubierte das Gel nach der Elektrophorese in EtBr-Lösung (EtBr interkaliert mit DNA). DNA-EtBr-Komplexe emittieren bei UV-Bestrahlung (302 nm) Licht einer Wellenlänge von 590 nm, welches dem orange-roten Bereich des sichtbaren Lichtes entspricht. So konnte man anschließend von dem Gel unter UV-Licht ein Photo anfertigen.
Diese Methode erlaubt DNA-Nachweise bis ca. 50ng.

3.1.2. Polyacrylamid–Gele

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte auf komerziell erworbenen Nu-Page-SDS-Gelen der Firma NOVEX INVITROGEN CO. oder auf selbstgegossenen SDS-PAGE-Gelen. Es wurden hauptsächlich 15%-ige SDS-PAGE-Gele hergestellt, da sie am besten für die Auftrennung von Proteinen mit einem MW zwischen 10 und 60 kd geeignet sind (MG von $pl9^{ARF}$ ca. 14 kd) [Lämmli et al., 1970].
Die Gele setzten sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen:

Trenngel (10 ml)	3,75 ml 40% Polyacrylamid
	3,75 ml 1M Tris pH 6,8
	2,35 ml H_2O
	100 µl 10% SDS
	50 µl 10% APS
	10 µl TEMED

Sammelgel (3ml)	750 µl 40% Polyacrylamid
	900 µl 1M Tris pH 6,8
	5,7 ml H_2O
	75 µl 10% SDS
	50 µl 10% APS
	7 µl TEMED

Zur Denaturierung und Reduktion wurden die Proteinlysate mit Roti ®-Load-Puffer versetzt und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch zusätzliche Auftragung eines Proteinmarkers (Seeblue). Die Elektrophorese verlief bei 150 mA mit 1x Elektrodenpuffer über ca. 2,5 Stunden.

3.2 RNA-Isolierung aus eukaryonten Zellen

Zur RNA-Isolation wurden angezüchtete Zellen lysiert, die RNasen inaktiviert und aus dem Lysat die Gesamt-RNA isoliert. Für weitere Versuche (wie z.B. RT-PCR) ist jedoch die mRNA am interessantesten, die an der Gesamt-RNA einen Anteil von etwa 2% ausmacht. Dies reicht jedoch für die nachfolgenden Experimente (siehe 3.3.) vollkommen aus.

3.2.1. RNA-Isolierung

Die Isolation von kleineren Mengen RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kits der Firma QIAGEN (Hilden), welcher es erlaubt, RNA-Fragmente ab 200 Basen nachzuweisen. Hierzu wurden die Zellen aus den T175-Zellschalen mit 1ml PBS abgekratzt und in Eppendorf-Cups 5 Minuten lang bei 3000 rpm pelletiert. Je nach Anzahl der Zellen wurde das Pellet in 350

(unter 5x 10^6 Zellen) oder 600 µl (zwischen 5x 10^6 und 1x 10^7 Zellen) des im Kit enthaltenen Puffers RLT mit β-Mercaptomethanol aufgenommen. Nach der Homogenisierung wurde die Suspension mit 1VE 70% Ethanol vermischt und auf die RNeasy-"spin columns" pipettiert. Nach einem Waschschritt mit dem RW1- und zwei Waschschritten mit dem RPE-Puffer aus dem Kit, bei denen jeweils 2 min. bei 13000 rpm zentrifugiert wurde, wurde die RNA in 30 - 50 µl DEFC-H_20 eluiert. Sollte die erwartete RNA-Ausbeute mehr als 30 µg betragen, wurde der Elutionsschritt wiederholt.
Die gewonnene RNA wurde auf ihre Reinheit auf einem RNA-Gel überprüft (siehe 3.2.2).

3.2.2. RNA-Gelelektrophorese

Die Kontrolle der RNA-Präparation erfolgte mit einem Gel-Elektrophoreseverfahren. Hierzu wurden ca. 4 µl RNA (ca. 10 µg) mit einem RNA-Auftragspuffer, in einem Verhältnis von 10-15 µl RNA-Auftragspuffer auf 1 µg RNA, 10–15 Minuten bei 70°C erhitzt und anschließend 1 Minute auf Eis abgekühlt. Danach wurde damit ein denaturierendes RNA-Gel beladen.
Der RNA-Auftragspuffer wurde als Mastermix (siehe 1. Puffer, Lösungen, Medien) angesetzt, von dem die entsprechende Menge im Verhältnis zur RNA-Menge verwendet wurde.
Zur Herstellung des 1%-ige Gels wurde 1 g Agarose mit 87,5 ml DEPC-H_2O 2 Minuten in der Mikrowelle gelöst und anschließend langsam abgekühlt. Zur der handwarmen Agarose wurden dann 5 ml 10x MOPS-Puffer und 7,5 ml 12,3 M Formaldehyd gegeben und das Gel sofort gegossen. Aufgrund ätzender Formaldehyddämpfe wurde die Gelzubereitung bis zu seiner Festigung unter dem Abzug durchgeführt. Der Gellauf erfolgte bei 4-5 $^{V}/_{cm}$ über ca. 2 Stunden, bis die Front mindestens 3-4 cm gewandert ist, und wurde dann im UV-Licht fotografiert (siehe Abb. 4).

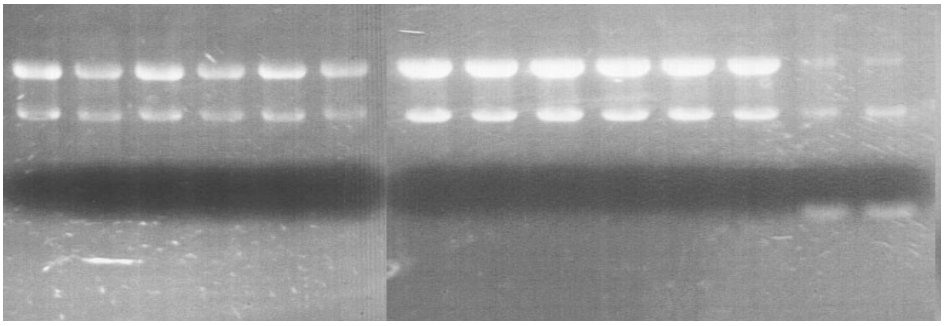


Abb. 4 Elektrophorese eines RNA-Gels

3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Retroviren sind in der Lage mit Hilfe ihrer reversen Transkriptase aus RNA DNA zu synthetisieren. Bei den molekularbiologischen Arbeiten wird dieses Prinzip ausgenutzt, um aus der isolierten RNA (mRNA) die cDNA herzustellen (cDNA = complementary DNA). Diese wird dann im Weiteren als Ausgangssubstanz der hochsensitiven PCR verwendet. Von Foley et al. (1993) wurde berichtet, dass bereits ein Molekül einer bestimmten mRNA pro Zelle mit dieser Methode nachgewiesen werden kann.

3.3.1. RNA-Umschreibung mit reverser Transkriptase

In allen Schritten dieses Verfahrens fanden RNasen-freie Pipettenspitzen, Eppendorf-Cups und DEPC-H_2O Anwendung. Für die RT-Reaktion wurden ca. 2 µg gesamtzellulärer RNA eingesetzt, gelöst in einem Mix, der sich aus 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1M DTT, 1 µl dN_6-Primer und 1 µl dNTP's mit DEPC-H_2O auf 19µl aufgefüllt, zusammensetzte. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 70°C inkubiert und nach Abkühlen mit 1 µl SuperScript reverse Transkriptase versetzt und weiter für 1 Stunde bei 37°C transkribiert. Anschließend wurde die Transkriptase durch 10 minutiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert und die RNA durch Zugabe von 1 µl RNase-A in 30 Minuten bei 37°C abgebaut.
Die in der RT-Reaktion gewonnene cDNA wurde zunächst mit einer β–Aktin- bzw. GAPDH-PCR auf ihre Qualität geprüft (siehe 3.4.2), und konnte bei den nachfolgenden Polymerase-Ketten-Reaktionen, wie unter 3.4 beschrieben, eingesetzt werden.

3.4 PCR (Polymerase-Chain-Reaction)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion gehört seit Mitte der 80-er Jahre zu den Methoden der Molekularbiologie. Mit ihrer Hilfe kann man Fragmente einer DNA durch bestimmte DNA-Primer gezielt amplifizieren. Das Prinzip besteht darin, bei 94°C die doppelsträngige DNA zu denaturieren, und bei angemessener Temperatur die Hybridisierung der Primer zu ermöglichen (Annealing). Im Weiteren wird die Temperatur auf 72°C erhöht, so dass die Taq-Polymerase die DNA-Fragmente verlängern kann. Da die Komplementierung der Template-

DNA an beiden Strängen gleichzeitg abläuft, wird diese innerhalb eines Zyklus in der Regel verdoppelt.

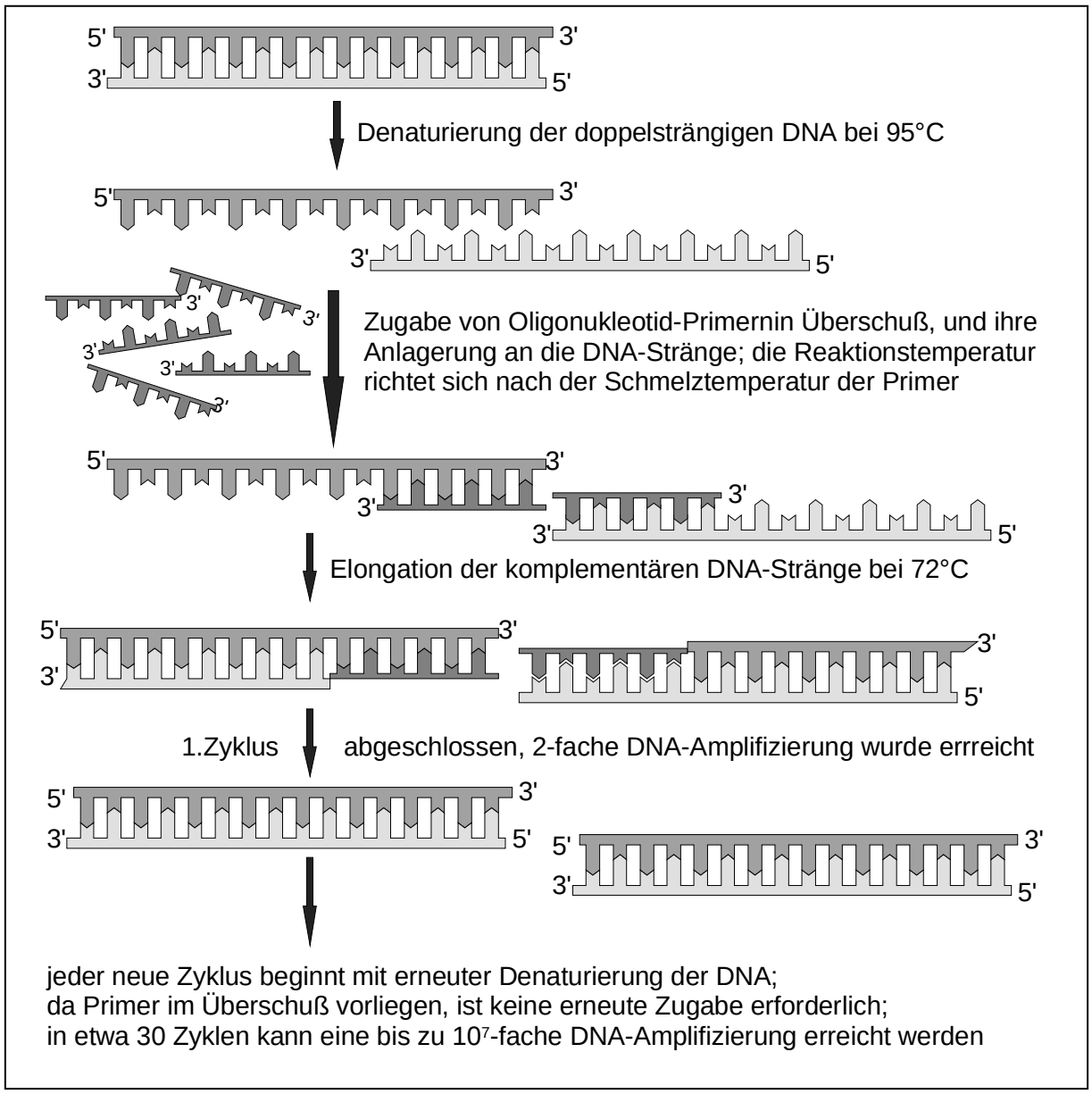


Abb. 5 Vereinfachte Darstellung der Abläufe bei einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.4.1. PCR mit p19^{ARF}-Primern

Die spezifische Amplifizierung der zu untersuchenden DNA-Fragmente des p19^{ARF}-Gens, wurde mit der Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion durchgeführt [Mullis et al., 1986].

Hierzu wurden 1 µl Ausgangs-cDNA, je 1 µg Primer $1^{\mu g}/_{\mu l}$ (reverse und forward), 5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl dNTPs, 0,5 µl Taq-Polymerase und 41 µl H_20 in einem Eppendorf-Cup zusammenpipettiert.
Da die Ergebnisse der PCR stark von der Qualität der cDNA abhängen, wurde alternativ einer anderen Vorschrift verfahren, durch die bessere Ergebnisse der PCR erzielt werden können. Hierfür fanden Verwendung: 25 µl 2x Safe-File-Puffer, 1 µl Urspungs-cDNA, je 1 µl Primer, 0,5 µl Taq-Polymerase und 21,5 µl H_20.
Die Amplifikation der DNA erfolgte bei beiden Verfahren durch 33 repetitive Zyklen von Denaturierung (1 Minute, 94°C), Annealing (1 Minute bei angemessener Annealing-Temperatur) und Verlängerung (1,5 Minuten bei 72°C).

3.4.2. PCR mit β–Aktin-Primern und GAPDH-Primern

Diese spezifische PCR für das β–Aktin bzw. GAPDH-Gen diente der qualitativen Kontrolle für die in der Reverse-Transkriptase-Reaktion gewonnenen cDNA. Sowohl β–Aktin als auch GAPDH gehören zu den sogenannten Haushaltsgenen, die in praktisch jeder Zelle exprimiert werden.
Der Reaktionsansatz bestand aus 1µl Ausgangs-cDNA, je 1 µg Primer (reverse und forward), 5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl dNTPs, 0,5 µl Taq-Polymerase, 41 µl H_20 zusammenpipettiert in einem Eppendorf-Cup. Die Amplifikation erfolgte während 32 repetitiver Zyklen bestehend aus Denaturierung (0,5 Minute, 94°C), Annealing (1 Minute, 68°C) und Verlängerung.

3.5. Reinigung der DNA-Fragmente

Die Reinigung der DNA-Fragmente für die spätere Sequenzierung erfolgte auf zweierlei Wegen.
Zum einen konnte die DNA bei einem starken Signal auf dem Agarose-Gel aus den PCR-Produkten direkt mit der PEG-Methode ausgefällt werden.
Wiesen die abgelaufenen PCRs jedoch auf dem Kontroll-Agarose-Gel zusätzliche Banden auf, so war es notwendig, die interessierenden Banden aus dem Gel zu extrahieren.

3.5.1. PEG-Fällung

Für die PEG-Fällung wurde das PCR-Produkt mit bidest H_2O auf ca. 50 µl verdünnt und die gleiche Volumeneinheit vom PEG-Mix hinzugefügt. Nach 10 minütigem Inkubieren bei Zimmertemperatur und Zentrifugation (10 Minuten bei 13.000 rpm) wurde der Überstand abpippetiert. Nach Zugabe von 100 µl 100% Ethanol wurde die Zentrifugation wiederholt. Das Pellet wurde anschließend in der SpeedVac getrocknet und in 20-30 µl bidest H_2O aufgenommen.
Anschliessend erfolgte die Prüfung der extrahierten DNA auf ihre Reinheit elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel (siehe 3.4.1 und Ergebniss-Teil).

3.5.2. DNA-Extraktion aus dem Gel

Aus dem Agarose-Gel (siehe 3.1.1.) wurden die zu sequenzierenden Banden mit einem Skalpel herausgeschnitten und mit dem QIAquick-DNA-Kit von der Firma QIAGEN (Hilden) extrahiert.
Die Reinigung der Gelfragmente erfolgte nach dem im Kit beiliegenden Protokoll. Hierzu wurden die Gel-Fragmente gewogen, und 1VE des Gels in 3VE des QX-1-Puffers 10 Minuten bei 50°C gelöst (dabei entsprachen 100 mg Gel ~ 100 µl QX1-Puffer). Nach der Zugabe von 1VE Isopropanol und Zentrifugation (1 Minute bei 10.000 rpm) erfolgten zwei Waschschritte mit QX1- und PE-Puffern bei denen jeweils 1 Minute mit 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Im letzten Schritt wurde 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert (um Pufferreste zu entfernen) und die DNA in 50 µl H_2O eluiert.
Abschließend konnte die Qualität der extrahierten DNA elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel (siehe 3.1.1 und Ergebnisse-Teil) überprüft werden.

3.6. Sequenzierung der DNA-Fragmente

Die Sequenzierung erlaubte es, die als Template nach der PCR erhaltenen DNA-Fragmente in ihrem Basencode aufzuschlüsseln. Das Prinzip basiert auf der Didesoxy-NTP-Kettenabbruchsreaktion nach Sanger et al. (1977) und erfolgte mit Hilfe eines automatischen Sequenzers der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA).

Die Sequezierungsreaktion beruht auf dem sequenzspezifischen Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden und dem daraus resultierenden Abbruch der Reaktion. Die entstehenden fluoreszenzmarkierten Fragmente können anhand ihrer unterschiedlichen Länge gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, und während dessen vom automatischen Sequencer mittels Laser gelesen werden. Für die Sequenzierung wurde eine bestimmte Menge des aufgereinigten PCR-Produkts (siehe 3.5.), nach quantitativer Abschätzung des Agarosegels, mit 4 µl Terminator Ready Reaction Mix, 1 µl Prrimer (3,2-10 $^{pmol}/_{\mu l}$) und 20 µl bidest H_2O zusammen gemischt. Die Reaktion beinhaltete 25 Zyklen aus 10 Sekunden 95°C und 5 Sekunden 45-60°C (je nach Schmelztemperatur des Primers, siehe Tabelle 1.), der letzte Zyklus beinhaltete 4 Minuten bei 60°C. Als nächstes folgte die Fällungsreaktion, in der das Produkt mit 80 µl HPLC- H_2O, 10 µl 3M Natriumcitratlösung (pH 4,6) und 250 µl 100% Ethanol behandelt wurde. Nach zwei Zentrifugationsschritten (15 und 5 Minuten bei 15.000 rpm) und zwischendurch Zugabe von 70% Ethanol, konnte das Fällungsprodukt (Pellet) bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C aufbewahrt werden.

Zur endgültigen Sequenzierung über die Centri-Sep-Säulen wurde das Pellet in 25 µl TSR gelöst und 5 Minuten bei 90°C denaturiert. Die Centri-Sep-Säulen wurde für die Sequenzierung entsprechend dem Herstellerprotokoll präpariert und mit dem Sequenzierungsprodukt beladen. Die Proben wurden von dem Sequencer automatisch gelesen und als Computerausdruck ausgegeben (siehe Ergebnisse-Teil).

$p19^{ARF}$-Primer	**Schmelztemperatur**
for2	68,4 °C
for3	62,7 °C
rev2	72,4 °C
rev3	62,5 °C

Tab. 1. Schmelztemperaturen der Primer

4. Proteinchemische Methoden

Bei den proteinchemischen Verfahren wurde als Methode der Wahl der Western-Blot angewendet, um Zellproteine in den angezüchteten Zellen, hier vor allem das $hp19^{ARF}$, nachzuweisen (siehe Abschnitt 4.3. und im Ergebnisse-Teil Abschnit 2.).

4.1. Isolierung von Zellproteinen

Für den Nachweis von bestimmten Antigenen (Proteinen), die sich auf der Zellmembran oder intrazellulär befinden, müssen diese aus den Zellen in Lösung gebracht werden. Diese zelluläre Desintegration kann mit Hilfe des RIPA-Puffers (Boehringer Mannheim GmbH) geschehen, der die Auflösung der Zellmembranen bewirkt, und zur Herstellung eines undegradierten Proteinlysates verhilft.
Dazu werden die Zellen aus den T75-Zellschallen mit 1 ml PBS abgekratzt und 5 Minuten bei 3.000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wird in 200 µl RIPA-Puffer 15 Minuten bei 4°C gelöst. Die RIPA-Lösung wird nach Herstellerprotokoll zubereitet, für 10 ml Lösung, aus: 2 ml Core-Puffer, 2 ml NaCl, 2 ml DetergenzMix, 2 ml SDS, 2 ml Wasser, eine Complete-Tablette (Proteasen-Inhibitorkomplex).
Anschließend wird 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, er stellt das zelluläre Proteinlysat dar und kann bei –20°C gelagert werden.

4.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Proteine sind in der Lage, unter alkalischen Bedingungen über ihre Peptidbindung mit zweiwertigen Kupfer-Ionen in Wechselwirkung zu treten. Dabei wird das Kupfer reduziert und es entsteht ein Protein-Kupfer-Komplex (Biuret-Reaktion). Anschließend reagiert das jetzt einwertige Kupfer mit Bicinchoninsäure (BCA) unter Ausbildung eines violetten Farbkomplexes, der bei einer Wellenlänge von 562 nm Licht absorbiert. Diese Reaktion wird auch aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze 0,5 µg) und relativ kleinen Zeitaufwandes genutzt, um den Proteingehalt der Proben zu bestimmen [Smith et al. 1985].
Hierzu wurde das BCA-Protein-Assay-Reagent-Kit (Pierce), bestehend aus Proteinreagenz A und B sowie Proteinstandardreihe verwendet. Es wurden jeweils 5 µl Probe zu 200 µl BCA-

Kupfer(II)-Lösung (Reagenz A und B im Verhältnis 50:1) gegeben und nach 15-30 minütiger Inkubation bei RT durch Licht-Absorptionsmessung bei 562 nm im Spektralphotometer gegen eine Standardkurve der Proteingehalt bestimmt. Die Standards bestanden aus verschieden konzentrierten BSA-Lösungen, und wurden aus dem mitgelieferten BSA-Stock (2 mg/ml BSA in Solution aus 0,9% NaCl und 0,05%HCL) hergestellt.

4.3. Western–Blot

Western-Blot, eine Immunblotmethode, gehört zu den sehr häufig genutzten Techniken um bestimmt Antigene (Proteine) zu identifizieren [Towbin, Staehhelin, Gordon, 1979]. Dabei werden die Proteine aus einem Proteinpool (RIPA-Lysat, siehe 4.1) elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel (siehe 4.3.1) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und anschließend nach der Überführung auf eine PVDF-Membran durch Immundetektionsverfahren sichtbar gemacht.

4.3.1 Immunchemischer Protein-Nachweis

Die Proteinlysate (RIPA-Lysate) verschiedener Zelllinien wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Novex Invitrogen Co, oder 15%-iges SDS-PAGE-Gel eigener Herstellung) und bei einer Spannung von 70 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde auf dem Gel zusätzlich stets ein Proteinmarker (Seeblue, Firma Novex Invitrogen Co., siehe 2.2) aufgetragen.
Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels eines „Semi-Dry-Elektrobloting-Verfahrens“ auf PVDF-Membranen übertragen (Kyte-Anderson, 1987).
Die PVDF-Membran wurde ca. 10 Minuten in Methanol, anschließend im Blot-Transfer-Puffer (Novex Invitrogen Co., bzw. Blotpuffer eigener Herstellung) vorinkubiert und luftblasenfrei auf das PAA-Gel gelegt (siehe Abb.6). Dieses „Sandwich“ wurde auf beiden Seiten mit jeweils 2 in Blot-Transferpuffer getränkten Whatmanpapierlagen versehen, und in eine Blot-Kammer gelegt. Durch Anlegen eines Stromflusses von 150 mA konnten die Proteine aus dem PAA-Gel auf die PVDF-Membran überführt werden. Anschließend wurde die Membran mit 3% BSA in PBS geblockt (damit werden die freien Bindungsstellen auf der Membran abgedeckt) und über Nacht bei 4°C mit dem Anti-pl9^{ARF}-Antikörper (BioSource

Int., USA) inkubiert. Der Antikörper wurde in 15 ml 3%-igem BSA/PBS 1:1500 verdünnt. Am folgenden Tag wurde die Membran mehrfach mit PBS gewaschen und 1 bis 2 Stunden lang mit einem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Antikörperverdünnung 1:300 in 12 ml PBS) inkubiert. Nach dem letzten Waschschritt mit PBS wurden die gekoppelten Antikörper durch eine Anfärbung mit BCIP/NBT-Tabletten sichtbar gemacht.

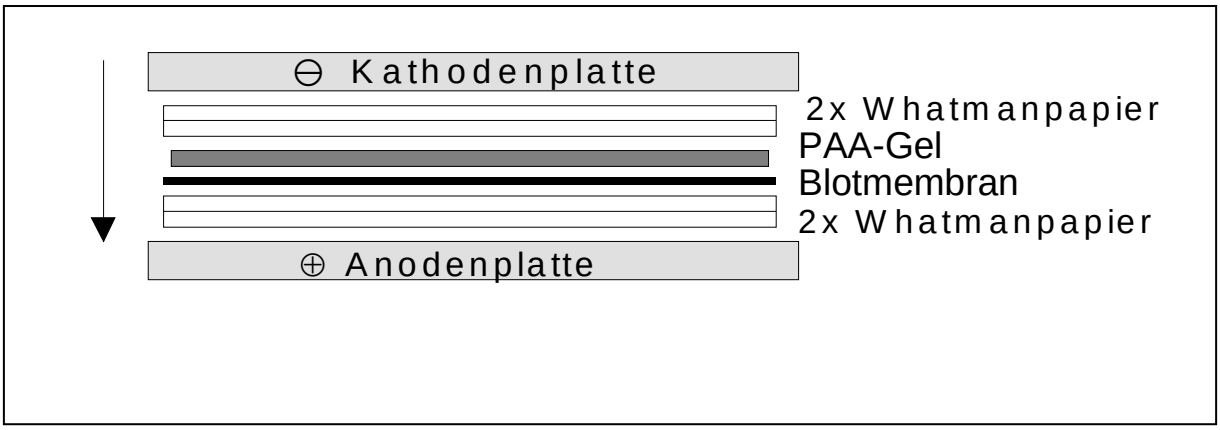


Abb. 6. Schema der Blot-Anordnung. Die Proteine sind negativ geladen und wandern dementsprechend im elektrischen Feld in Richtung der Anode, an der sich die PVDF-Blotmembran befindet. Die Whatmanpapiere werden zur besseren Leitung in Blot-Puffer getränkt.

5. Immunhistochemische Methoden

5.1. Gewebeschnitte–Vorbereitung

Die histologischen Gewebepräparate wurden freundlicherweise von der Klinik für Dermatologie und dem Institut für Pathologie der Universität München zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Patientengewebe von Resektaten und Biopsaten maligner Melanome, Naevi und Melanommetastasen.

Die nativen, ungefärbten, histologischen Schnitte mussten vor der immunhistochemischen Färbung über Nacht im Brutschrank bei 60°C inkubiert werden, um das Paraffin, in dem sie

eingebetet waren, zu entfernen. Am nächsten Tag konnten die Schnitte ohne weitere Bearbeitung eingesetzt werden.

5.2. Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Färbung gehört zu den sehr weit verbreiteten, indirekten Nachweiseverfahren für bestimmte Antigene. Sobald monoklonale Antikörper Anwendung finden können, kann eine hohe Spezifität erzielt werden, so dass nicht nur bestimmte Moleküle, sondern auch ihre, aufgrund von Genmutationen entstanden, Varianten nachgewiesen werden können.
Da fixierte Zellen in histologischen Gewebeschnitten für Antikörper durchlässig sind, können auch intrazellulär / intranukleär (wie hpl9^{ARF}) gelegene Antigene dargestellt werden.

Für unsere immunhistochemischen Färbungen wurden zwei verschiedene Möglichkeiten angewendet, die sich durch die verwendeten Farbstoffe und Enzymreaktionen unterscheiden, von dem methodischen Prinzip jedoch gleich sind. Zur Etablierung der Methode wurde die DAB-Färbung (Sigma) eingesetzt, da sie sensitivere Resultate lieferte. Wogegen die AEC-Färbung (DAKO-LSAB2-Kit) sich durch die besseren optischen Ergebnisse auszeichnete.
Die Färbungen wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, so dass über Nacht der primäre Antikörper (polyklonaler anti-rabbit Anti-pl9^{ARF} von BioSource Int., USA) inkubierte. Der Antikörper wurde in 2%-igem Magermilch/PBS 1:200 verdünnt.
Beide Varianten verliefen beim ersten Teil der Färbung nach dem gleichen Schema, erst im zweiten Teil (2.Tag) mussten sie unterschiedlich behandelt werden (siehe Abschnitte 5.2.2 und 5.2.3).
Die Färbung des Gewebes erfolgte in einem immunhistochemischen System bestehend aus mehreren Coverplates-Schienen, mit Platz für jeweils 12 Objektträger (Schenden, Deutschland), die in einer feuchten Kammer plaziert werden konnten (Werkstatt der RWTH-Aachen).

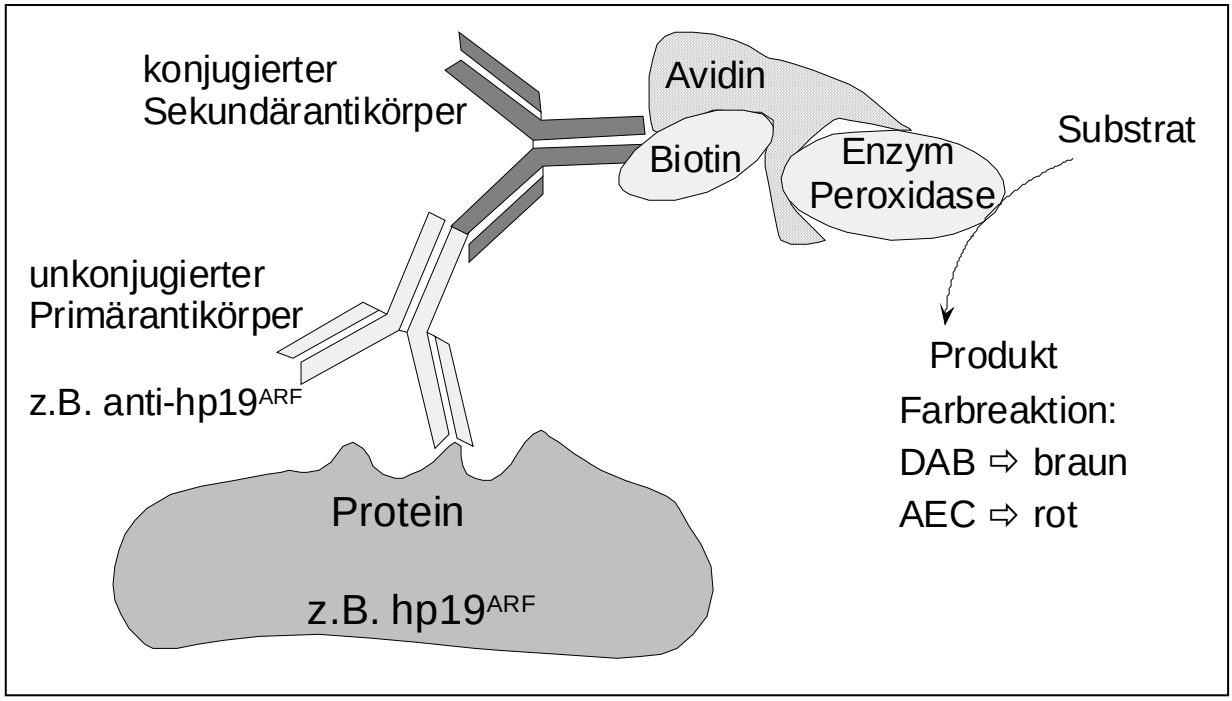


Abb.7. Reaktionsmodell der immunhistochemischen Färbemethode

5.2.1 Immunhistochemische Färbung mit spezifischem Antikörper

Die Schnitte wurden in mehreren Schritten für jeweils 5 Minuten mit Xylol, Methanol absteigender Konzentrationsreihe (100%, 90%, 75%) und bidest H_2O entparaffiniert und hydratisiert. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch 5 Minuten Methanol/H_2O_2 gehemmt. Die so vorbereiteten Präparate konnten weiter 4-mal je 5 Minuten in einer Mikrowelle (600W) in Tris-Na-Citrat-Puffer erhitzt werden. Die Mikrowellenbehandlung führt besonders bei paraffineingebetteten Schnitten zu größeren Erfolgen, da die nicht fixierungsresistenten Antigene so den Antikörpern wieder zugänglich gemacht werden [Shi et al., 1991]. Nach kurzem Abkühlen und einem Waschschritt mit PBS, überdeckt man das Gewebe für 15 Minuten mit Pferde-Normalserum, 1:10 in 2%-igem Magermilchpulver-PBS verdünnt. Anschließend konnte der primäre Anti-pl9^{ARF}-Antikörper auftragen werden, 1:200 in 2%-igem Magermilchpulver-PBS verdünnt. Die Präparate wurden bei 4°C über Nacht in feuchter Kammer inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Färbung je nach Bedarf mit DAB- oder AEC-Farbstoffen.

5.2.2 DAB–Färbung

Die Behandlung der Präparate wurde mit dem Vectastain Elite ABC-Kit (Boehringer Ingelheim, Heidelberg), einem Immunperoxidasesystem, durchgeführt und die Antikörper anschließend mit DAB-Tabletten (Sigma) durch eine braune Anfärbung sichtbar gemacht. Das Verfahren zeigt eine hohe Effizienz und beruht auf der Kombination von nichtmarkierten Antikörpern (Anti-pl9^{ARF}) mit biotinyliertem Sekundärantikörper und dem vorgeformten ABC-Reagenz (Hsu et al., 1981).
Nach der Inkubation über Nacht mit dem primären Antikörper wurden die restlichen nicht gebundenen Antikörper mit Magermilchpulver-PBS ausgewaschen und das Gewebe für 30 Minuten bei RT mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit-Biotin) überschichtet. Durch PBS wurden zunächst nicht gebundene Immnuglobuline entfernt und die Schnitte anschliessend mit dem ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Complex aus dem Vectastain-Kit) für 30 Minuten bei RT behandelt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde für ca. 2 Minuten der aktivierte DAB-Färbekomplex auf das Gewebe aufgetragen. Anschließend wurden die Präparate mit Leitungswasser gewaschen und mit Hämalaun kurz gegengefärbt. Vor dem Eindeckeln der Objektträger mussten schließlich die ersten Schritte mit Xylol und diesmal aufsteigender Konzentrationsreihe Methanol wiederholt werden.

5.2.3 AEC–Färbung

Auch bei dieser Variante der Färbung handelt es sich um ein Peroxidase-System, welches auf dem Prinzip des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC, siehe Abb. 7) beruht. Der wesentliche Unterschied besteht in der aufgrund der verwendeten Farbkomplexe resultierenden roten Färbung der Antikörper-Antigen-Komplexe, und damit besserer Abgrenzbarkeit gegenüber dem braunen Melanin.
Zuerst wurden die nach der nächtlichen Inkubation nicht gebundene Antikörper mit PBS ausgewaschen und das Gewebe mit dem sekundärem Antikörper 30 Minuten bei RT überschichtet stehen gelassen. Zwischen den jeweiligen Schritten wurde immer wieder mit PBS kurz gespült. Danach trug man für 30 Minuten bei RT den Streptavidin-Peroxidase-Komplex (im Kit enthalten) auf die Präparate auf. Im folgenden Schritt inkubierte man das Gewebe mit der AEC-Substratsolution (2ml Acetat-Substart-Puffer + 1 Tropfen AEC-Chromogen; beide gebrauchsfertig im Kit enthalten), so dass je nach mikroskopischer

Intensitätskontrolle die Schnitte kürzer oder länger als 30 Minuten gefärbt wurden. Schließlich färbte man ca. 2 Minuten mit Hämalaun gegen und konnte die Objektträger abdecken.

6. *Zellkultur*

Für alle Tätigkeiten während der Zellkultivierung wurden sterilisierte Gefäße, Medien und Pipetten verwendet.
Es wurden 8 Melanomzelllinien und zwei Arten primärer Melanozyten (human und murin) kultiviert:

- Mel-A (murine Melanozyten aus der Maus);
- Mel-Im, Mel-Ei, Mel-Ho, Mel-Ju, Mel-Juso (humane Melanomzellen, J. Johnson);
- Sk-Mel, Mel-Wei (humane Melanomlinien, DSM ACC);
- Ph-Mel (primäre humane Melanozyten, Institut für Pathologie RWTH-Aachen);
- HTZ-19d (humane Hirnmetastase eines malignen Melanoms, Uni-Würzburg).

6.1. Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C mit 8% CO_2 kultiviert. Für die Passage wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin 5 Minuten bei 37°C inkubiert, um sie vom Zellschalenboden abzulösen. Die abgelösten Zellen wurden in frisches Kulturmedium aufgenommen und 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet resuspendiert im frischen DMEM-Medium (10% FKS) aufgenommen und die Zellen in neue Kulturflaschen verteilt.
Die Zellen wurden in T75-Kulturflaschen gezüchtet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

V. Ergebnisse

Um die Expression des hp19^{ARF}-Gens zu überprüfen, wurden mehrere RT-PCR-Experimente mit spezifischen Primern für Exon-1β sowie Exon-2/3 an 8 Melanomzelllinien und 2 Arten von primären Melanozyten durchgeführt (Zellen siehe Abschnitt IV, 2.7). Die Produkte von zwei voneinander unabhängigen PCRs für die jeweiligen Exons wurden anschließend sequenziert und die Sequenzen auf mögliche Veränderungen analysiert.
Die Expression des hp19^{ARF}-Proteins wurde *in vitro* an denselben Zelllinien anhand von Western-Blots und *in situ* am Patientengewebe mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen untersucht, in beiden Fällen mit dem selben polyklonalen anti-hp19^{ARF}-Antikörper (BIO SOURCE INT.).

1. hp19^{ARF}-Gen-Expression in Melanom-Zelllinien

1.1. Erzeugung und Kontrolle des Melanom-cDNA-Pools

Der Erfolg der reversen Transkription hängt von der Qualität der eingesetzten RNA ab, die daher nach der Isolierung aus den Zellen mit den Elektrophorese-Gelen kontrolliert wurde.
Im weiteren erfolgte anhand von PCRs die Qualitätsprüfung der mit der Reverse-Transkriptase-Methode umgeschriebenen cDNA, wofür sich die beiden Haushaltsgene β–Aktin und GAPDH gut eigneten.
Nachfolgend werden die Resultate dieser Untersuchungen vorgestellt.

1.1.1. Kontrolle der RNA-Integrität

Zur Isolierung der gesamtzellulären RNA siehe „Material und Methoden“ unter 3.2. Die elektrophoretische Überprüfung war grundlegend für die spätere reverse Transkription der RNA in cDNA. Die Abbildung 8 präsentiert das Ergebnis der RNA-Gelelektrophorese. Es ist zu erkennen, dass in allen präparierten Zelllinien qualitativ hochwertige RNA vorhanden ist, so dass mit der Umschreibung in die cDNA begonnen wurde (siehe Material und Methoden 3.3.).

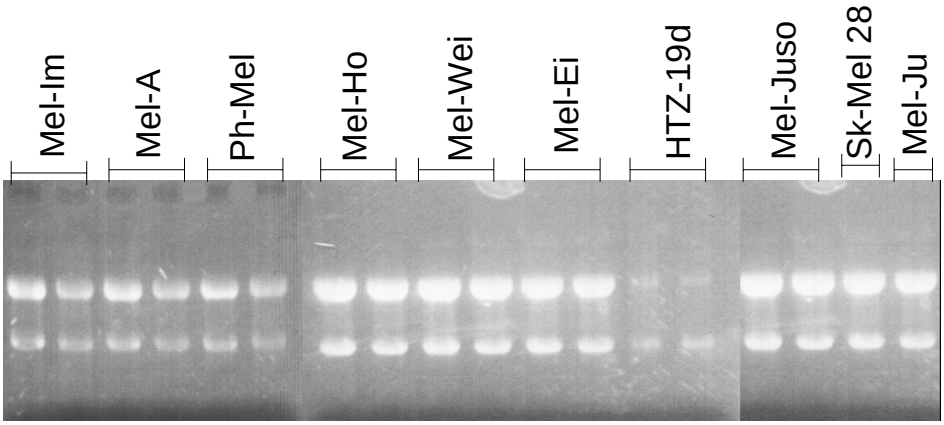


Abb. 8. Das Ergebnis der elektrophoretischen RNA-Integritätskontrolle

1.1.2. cDNA-Kontrolle in β–Aktin und GAPDH-PCRs

β–Aktin zählt zu den vielen Haushaltsgenen, welche in jeder, sowohl normalen als auch veränderten Zelle exprimiert werden, da entsprechendes Produktprotein am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt ist. So geht man davon aus, dass bei einer erfolgreichen reversen Transkription der gesamtzellulären mRNA mit geeigneten Primern, spezifisch die cDNA für β–Aktin amplifiziert werden kann. Das Ergebnis kann man als Nachweis für die Integrität der cDNA deuten. Durch die nachfolgende Untersuchungen wurde die cDNA aller Zelllinien durch PCR auf ihre Qualität getestet, sowie auf den Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und nachgewiesen (siehe Abb. 9).

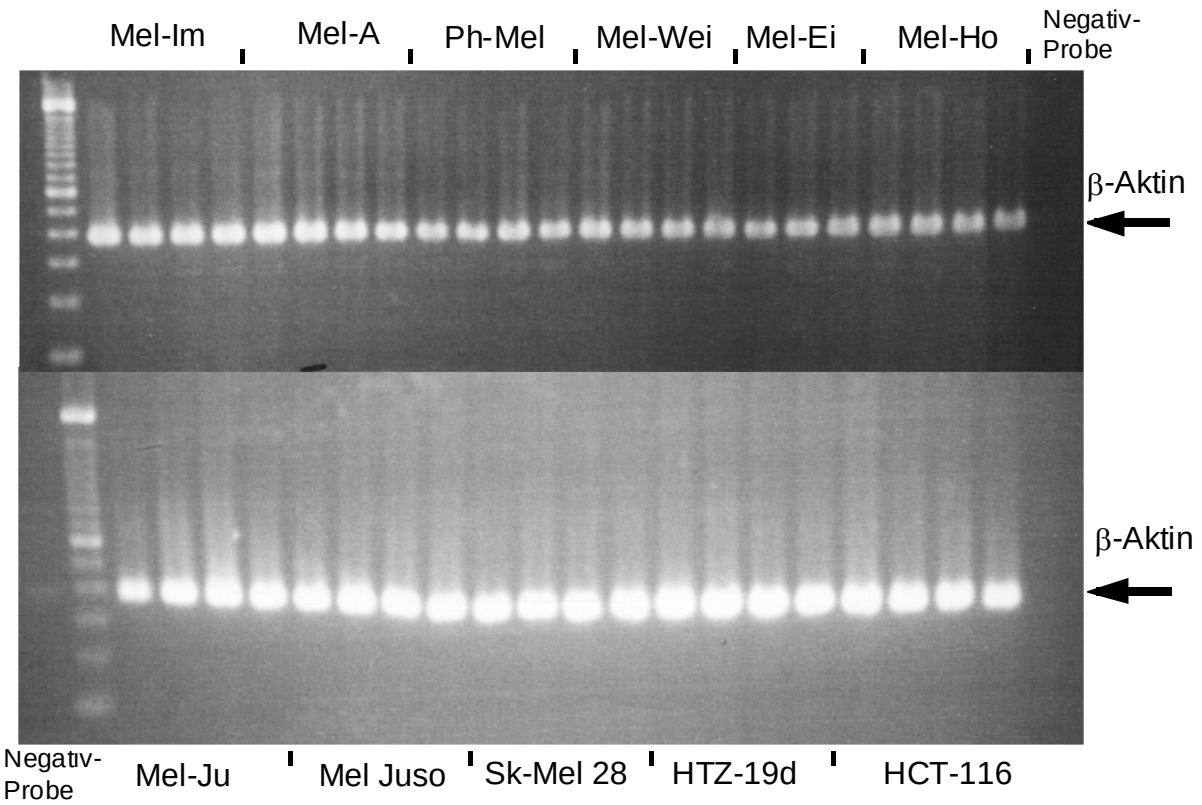


Abb. 9 1,8% Agarose-Gel der an allen Zellliniinen durchgeführten β-Aktin-PCR

Die Produkte der für β–Aktin etablierten PCR lassen auf dem Agarosegel charakteristische Banden bei ca. 390 bp erkennen. Daraus kann auf die Expression des Gens in allen Zelllinien geschlossen werden.

Zur weitergehenden Absicherung wurden zum gleichen Zweck an allen Zelllinien zusätzlich PCRs mit GAPDH-Primern durchgeführt.
Auch dieses gehört zu den in allen eukaryontischen Zelllinien exprimierten Haushaltsgenen, sein Transkriptionsprodukt ist an der Glykolyse beteiligt. Das Resultat einer dieser PCRs zeigt Abb. 10.

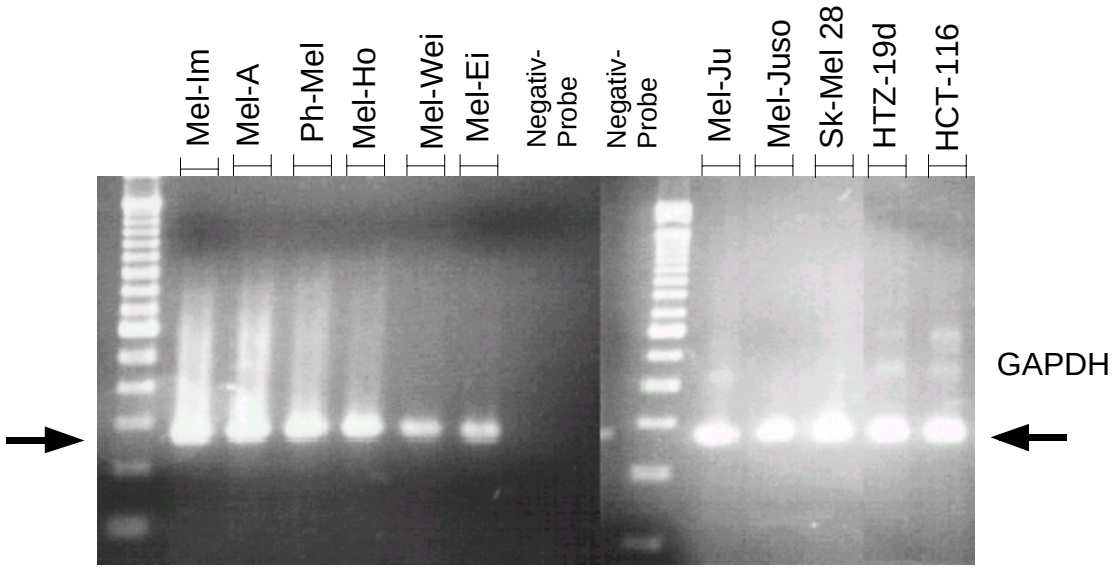


Abb. 10 1,8% Agarose-Gel der GAPDH-PCR, bei der alle Melanomzellinien sowie humane und murine primäre Melanozyten getestet wurden.

Wie auf dem gezeigten Agarose-Gel an der charakteristischen Bande bei ca. 260 bp zu erkennen ist, konnte GAPDH-mRNA in allen Zellen nachgewiesen werden.
Diese Versuche belegten die Integrität der gewonnen cDNAs, so dass diese für die nachfolgenden spezifischen PCRs eingesetzt wurden.

1.2. Nachweis der hp19^{ARF}-Genexpression in malignen Melanomen durch PCR

Nach der qualitativen Prüfung der cDNA in allen zu untersuchenden Zelllinien, konnte mit den spezifischen Polymerasen-Ketten-Reaktionen für hp19^{ARF} begonnen werden. Da die hp19^{ARF}-PCR-Methode in unserer Arbeitsgruppe noch nicht angewendet wurde, musste das entsprechende Protokoll zuerst mit den entwickelten Primern etabliert werden.

1.2.1. Auswahl geeigneter Primersequnzen für hp19^{ARF}

Um das hp19^{ARF} in den zu untersuchenden Zelllinien amplifizieren zu können, wurden anhand der vorliegenden hp19^{ARF}-Sequenz spezifische Primer ausgewählt. Es wurden

insgesamt 3 Primerpaare zusammengestellt, mit den Paaren for2-rev2 konnte das gesamt hp19^{ARF}-Gen, mit for2-rev3 das hp19^{ARF}-spezifische Fragment (Exon-1β) und mit for3-rev2, das für hp19^{ARF} + p16^{INK4a} (= Exon-2,3) gemeinsame Fragment, amplifiziert werden.

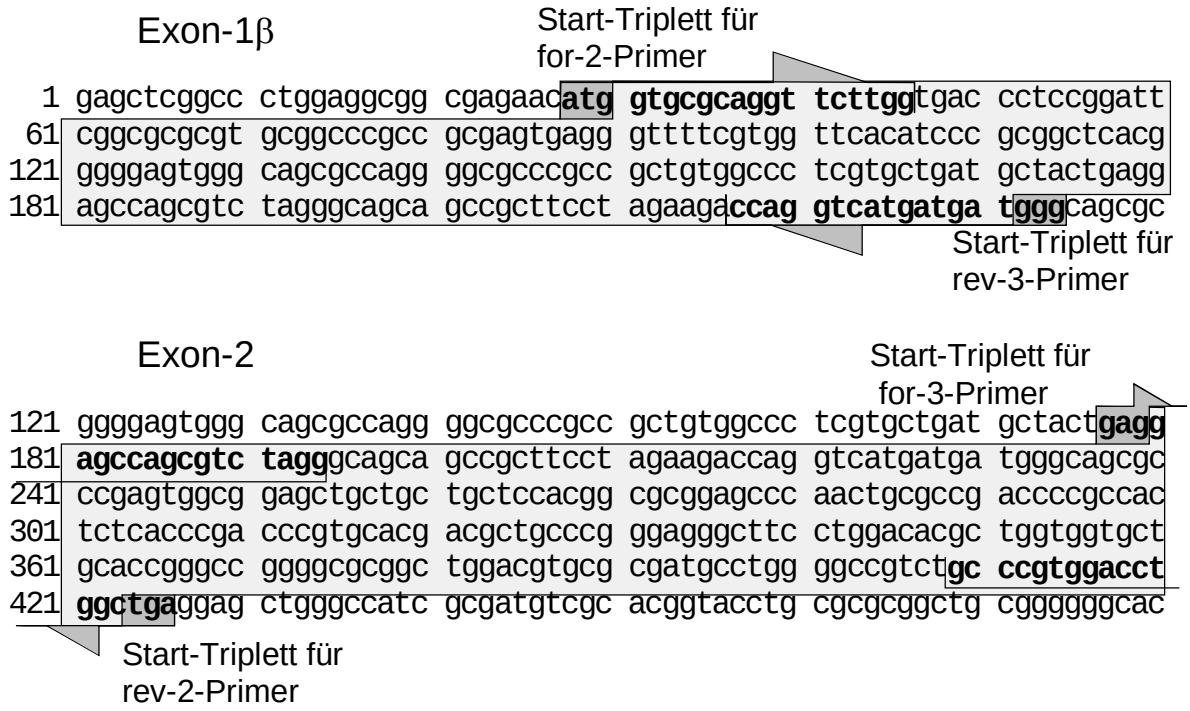


Abb.11 humane p19ARF-Gensequenz [Duro, Bernard, Della Valle et al., 1995] mit der Lage der für die PCR verwendeten Primer

Primerkombinationen:

for2: 5'-ATG GTG CGC AGG TTC TTG G-3'

ATG ist das Start-Triplett für die Vorwärts-Sequenz

mit rev3: 5'-CCC ATC ATC ATG ACC TGG-3'

CCC ist das Start-Triplett für die Rückwärts-Sequenz

⇒ ca. 206 bp langes Fragment spezifisch für hp19^{ARF}, da im Exon-1β liegend

for3: 5'-GAG GAG CCA GCG TCT AGG-3'

GAG ist das Start-Triplett für die Vorwärts-Sequenz

mit rev2: 5'-TCA GCC AGG TCC ACG GGC-3'

TCA ist das Start-Triplett für die Rückwärts-Sequenz

⇒ ca. 231 bp langes Fragment gemeinsam für hp19^{ARF} und p16^{INK4a}, da in Exons-2/3 liegend

1.2.2. Etablierung und Optimierung der hp19^{ARF}-PCR-Nachweise

Zunächst wurden Versuche mit dem for2-rev2-Primerpaar unternommen, dessen Amplifizierungsprodukt ein 437 bp großes Fragment darstellte.
Die Zykluszahl blieb in allen Versuchen bei 32. Die Annealingtemperatur wurde zunächst auf 55°C festgelegt und schrittweise in verschiedenen PCRs bis auf 60°C erhöht. Diese Versuche brachten jedoch keine spezifischen Ergebnisse, da sie von einer Reihe Fehlamplifikationsprodukte begleitet waren (siehe Abb. 12).

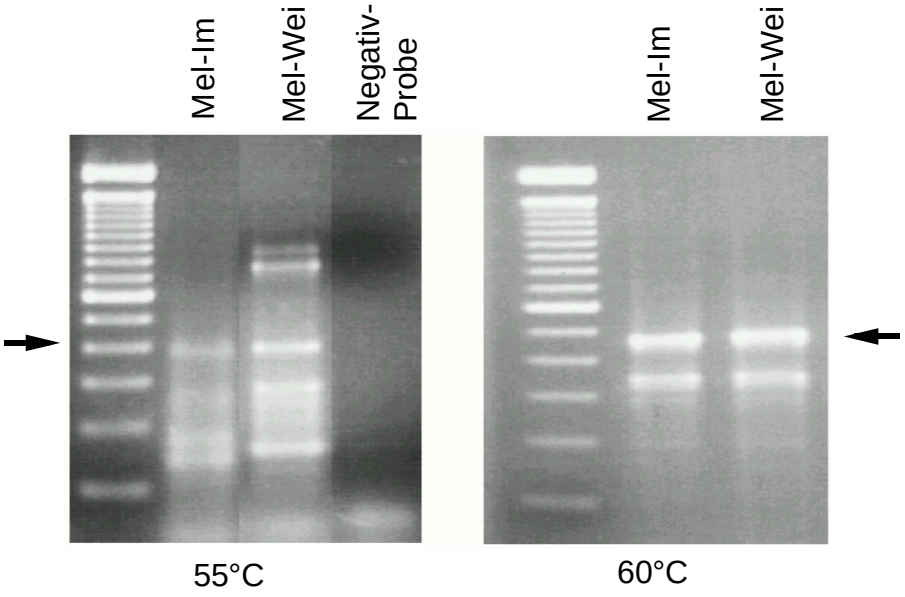
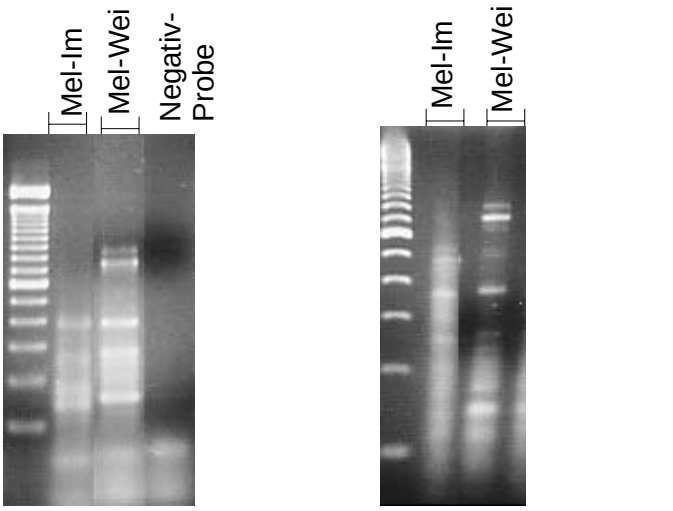


Abb.12 Beispiel für 2 PCRs mit Primern for2-rev2 bei verschiedenenen Annealing-Temperaturen.

Im Versuch, die Falschamplifikationsrate der PCR zu senken, wurden nested-PCRs mit einer weiteren, zwischen for2-rev2 liegenden Primerkombination (for2-rev3) bei Annealingtemperaturen von 60°C versucht. Abb. 13 zeigt einen derartigen nested-PCR-Versuch, bei dem zuerst eine hp19^{ARF}-Amplifikationsreaktion unter normalen Bedingungen mit 55°C-Annealingtemperatur durchgeführt wurde. Wegen der zahlreichen Nebenbanden wurde mit 1 µl des PCR-Produktes eine nested-PCR mit dem for2-rev3-Primerpaar und erhöhter Annealingtemperatur (65°C) durchgeführt. Die Fehlamplifikationsrate konnte mit diesem Versuch allerdings nicht reduziert werden (s. Abb. 13).



normale PCR mit for2-rev2; 55°C

nested-PCR(for2-rev3; 65°C) mit dem Produkt von der 55°C-PCR (links)

Abb.13 Beispiel für eine hp19^{ARF}-PCR und die darauf folgende nested-PCR.

Im folgenden wurde eine Reihe von neuartigen Puffern ausgetestet, die aufgrund ihrer Zusammensetzung (variierende Mengen an $MgCl_2$) bessere PCR-Ergebnisse liefern sollten. Dazu wurde zunächst eine PCR mit dem Primerpaar for2-rev2 und 69°C Annealingtemperatur, die zwischen den Schmelztemperaturen beider Primer lag, mit der Zelllinie Mel-Ho als Testreihe durchgeführt. Durch den Vergleich der Resultate mit den einzelnen Puffern auf dem Agarosegel konnte der beste für die jeweilige RT-PCR-Prozedur ausgesucht werden. Anhand der Versuchsergebnisse wurde Puffer D ausgewählt, da er auf dem 1,8%-Agarosekontrollgel das stärkste Signal bei 400bp ohne Nebenbanden ergab (siehe Abb. 14).

Die Sequenzierungsreaktionen der aus dem Gel isolierten DNA (Bande bei 400 bp) bestätigte, dass es sich dabei um hp19^{ARF}-DNA handelte. Auch für die zusätzlichen Amplifizierungsprodukte (Banden bei 250 und 700 bp), wurden Sequenzierungsreaktionen durchgeführt. Der Vergleich der Sequenzen mit der Gendatenbank ergab 18S-RNA als Resultat, was im Hinblick auf das Ziel der Experimente (hp19^{ARF}-Amplifizierung) als unspezifisch galt und eine weitere Optimierung der PCR-Prozedur erforderte.

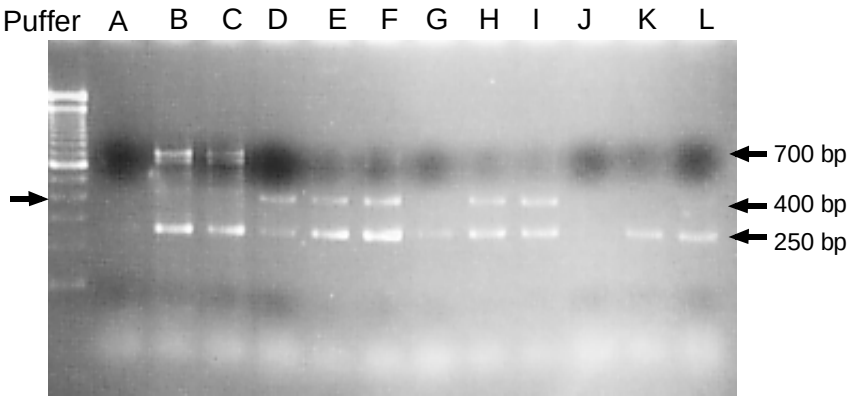


Abb. 14. Puffer-Test: Primer for2-rev2, Annealing 69°C, Zelllinie Mel-Ho

In den folgenden PCR-Versuchen mit allen Zelllinien ließen sich jedoch keine spezifischen Ergebnisse erzielen (siehe Abb. 15). Die als hp19^{ARF} vermuteten DNA-Fragmente bei 400bp wurden aus dem Agarosegel isoliert und sequenziert. Die Analyse ergab, dass es sich hierbei tatsächlich um hp19^{ARF}-DNA handelt, jedoch waren die Sequenzierungsprodukte aufgrund von Verunreinigungen nicht komplett auswertbar. Die Versuche das kleinere DNA-Fragment, bei 250bp, zu sequenzieren und der anschließende Vergleich der Sequenzen mit der Gendatenbank ergaben 18S-RNA als Resultat. Auch die Versuche die Annealingtemperatur zu variieren, brachten keine spezifischeren PCR-Ergebnisse.

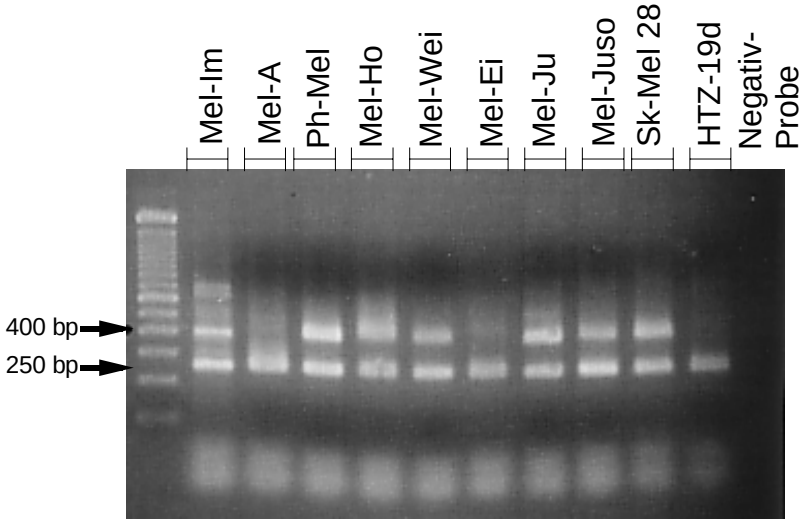


Abb. 15 hp19^{ARF}-PCR mit allen Zelllinien und for2-rev2-Primerpaar, 69°C, Puffer D

Aufgrund der beschriebenen Probleme war es notwendig, neue Primerpaare zu entwickeln, die so in die hp19^{ARF}-Sequenz eingebracht wurden, dass sich nach der PCR-Amplifizierung zwei Gen-Fragmente ergaben. Dabei handelte es sich um folgende Primerkombinationen: for2-rev3 für den vorderen Teil der Sequenz (hp19^{ARF} spezifisch, entspricht dem Exon 1β, ergaben ein 206 bp langes Fragment) und for3rev2 für den hinteren Teil der Sequenz (gemeinsam für hp19^{ARF} und p16^{INK4a}, entsprechend den Exons 2 und 3, ergaben ein 231 bp langes Fragment).

Zunächst mussten die beiden PCR-Methoden neu etabliert werden. Hierzu wurden direkt Annealingtemperaturen gewählt, die um den Schmelzpunkt der jeweiligen Primer lagen, und Puffertestreihen mit den 2x Safe File-PCR-Puffern durchgeführt. Abb. 16 zeigt die Ergebnisse der PCR-Puffertestreihe für beide Primerpaare.

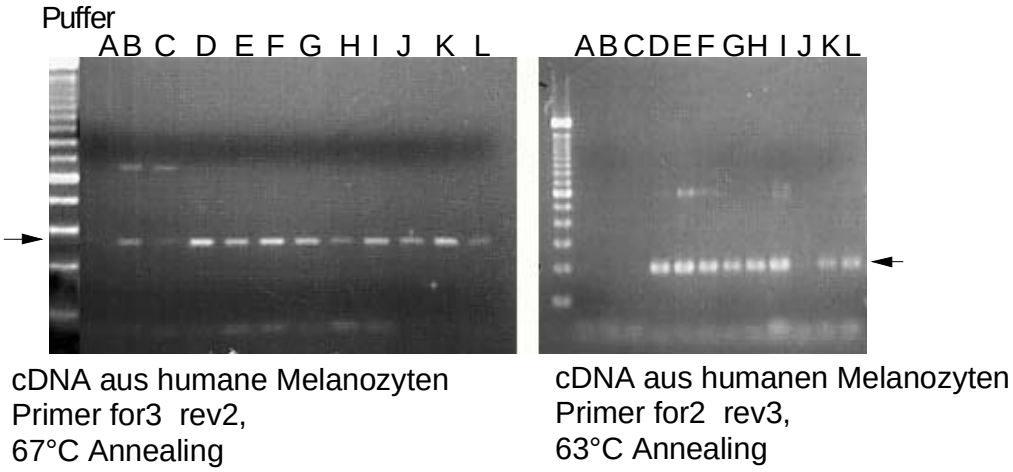


Abb. 16 Puffertestreihe für beide Primerpaare (for2-rev3 und for3-rev2)

Die Resultate dieser Tests fielen zufriedenstellend aus und konnten durch verschiedene Optimierungsversuche, wie z.B. Variieren der Annealingtemperaturen oder Zugabe von mehr Ausgangs-cDNA, nicht verbessert werden. Da die Produkte sich mit gutem Ergebnis sequenzieren ließen, wurde mit den PCR-Versuchsreihen begonnen.

1.2.3. $p19^{ARF}$-mRNA-Expression in malignen Melanom-Zelllinien

Nach der Etablierung der PCR wurde mit dem Screening aller vorhandenen Zelllinien begonnen.

Es wurden beide Gen-Fragmente in mehreren PCR-Ansätzen amplifiziert, um über ausreichende Template-Mengen für die nachfolgenden Sequenzierungsreaktionen zu verfügen. Für beide Gen-Fragmente wurde jeweils eine unterschiedliche PCR-Prozedur entwickelt, siehe Tabelle 2

for2 rev3	**for3 rev2**
32 Zyklen, Puffer D, 64°C Annealing	32 Zyklen, Puffer D, 67°C Annealing
oder	oder
32 Zyklen, Puffer G, 63°C Annealing	32 Zyklen, Puffer I, 67°C Annealing
⇨ ca. 206 bp Fragment	⇨ ca. 231 bp Fragment

Tab. 2 Etablierte PCR-Prozeduren für die jeweiligen $hp19^{ARF}$-Genfragmente

Beispiele für die abgelaufenen Reaktionen zeigen Abbildungen 17 und 18. Das Expressionsmuster in den einzelnen Zellininien wird in der Tabelle 3 dargestellt. Dabei handelt es sich um Experimente, deren Amplifizierungsprodukte anschließend gereinigt und sequenziert wurden.

Bei den PCR-Reaktionen mit dem for2-rev3-Primerpaar wurden jeweils zwei unterschiedliche Puffer mit jeweils anderen Annealingtemperaturen benutzt.

Zum Teil zeigte sich bei den Versuchen auf den Agarose-Gelen ein relativ schwaches Signal bei den Proben für die HTZ19d-Zelllinie (Hirnmetastase eines malignen Melanoms). Es stellte sich die Frage einer schwächeren bzw. fehlenden $hp19^{ARF}$-Expression in dieser Zelllinie. Dies konnte jedoch durch ein starkes Signal in Wiederholungs-PCRs unter gleichen Bedingungen mit z. T. anderen cDNA-Proben dieser Zelllinie widerlegt werden (siehe Abb. 17).

Zelllinie	*PCR mit Primern for2-rev3*	*PCR mit Primern for3-rev2*
Mel-Im	++	+++
Mel-A	+	++
Ph-Mel	+++	+++
Mel-Ho	+++	+++
Mel-Wei	++	++
Mel-Ei	+	++
Mel-Ju	+++	+++
Mel-Juso	++	+++
HTZ-19d	++	+++
Sk-Mel 28	++	++
HCT116	-	nicht durchgeführt

Tab. 3 Expressionsmuster der hp19^{ARF}-Expression in allen Zelllinien (+++ sehr starke Expression, ++ normale Expression, + schwache Expression, - keine Expression)

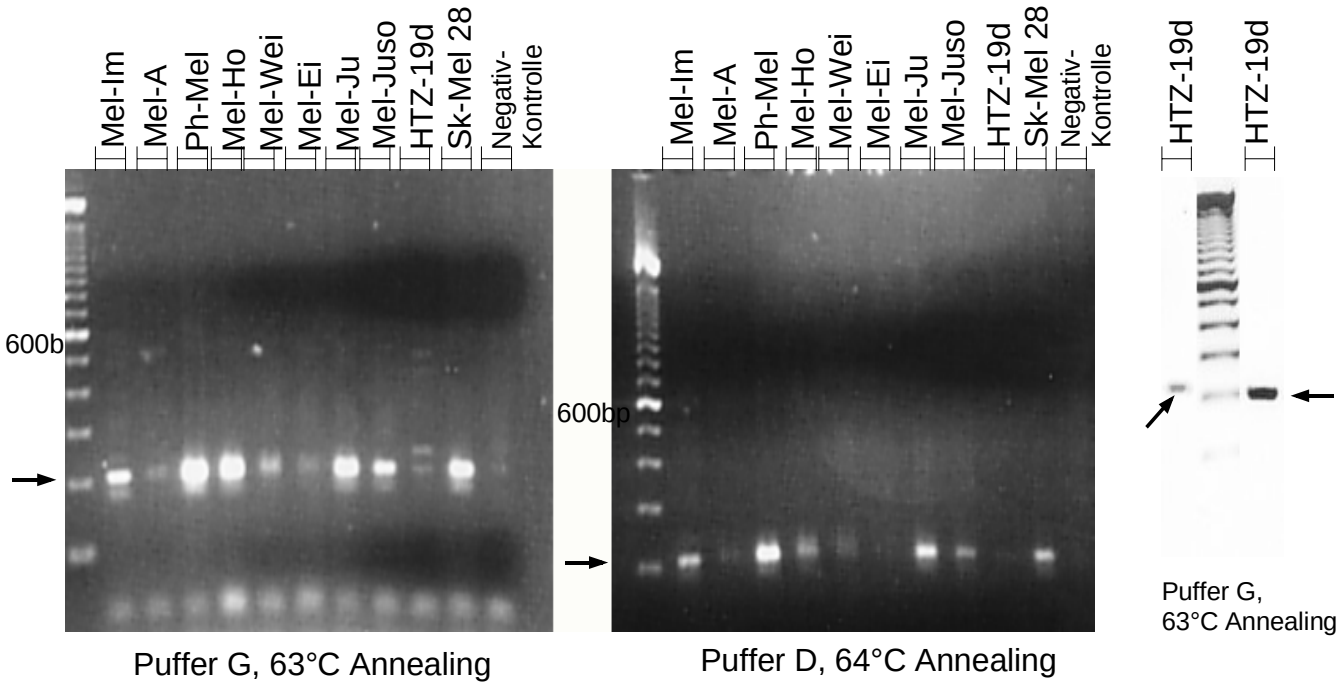


Abb. 17 1,8%-Agarosegele mit den Beispielen für PCRs mit for2-rev3-Primerpaaren sowie eine Wiederholungs-PCR für die HTZ19d-Zelllinie; die Pfeile markieren die hp19^{ARF}-charakteristischen Banden, bei ca. 200 bp.

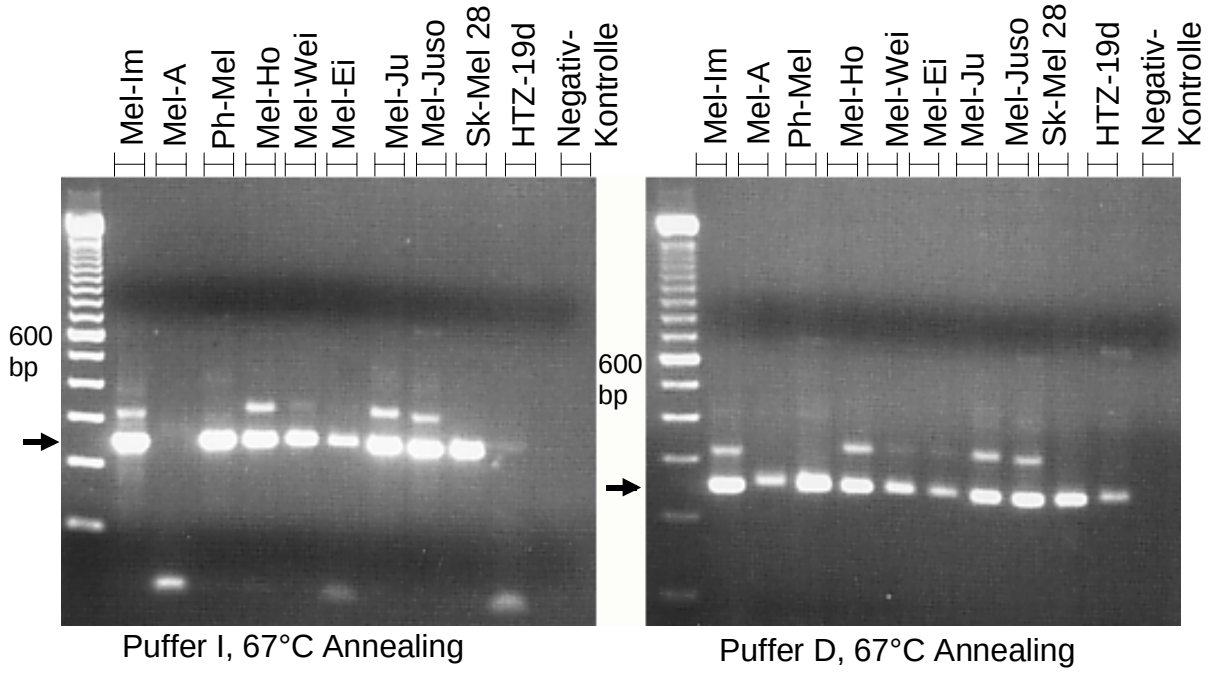


Abb. 18 Beispiele für 1,8%-Agarosegele von PC-Reaktionen mit for3-rev2; Pfeile markieren die charakteristischen Banden, das scheinbar unterschiedliche Laufverhalten der Proben ist ein Elektrophoreseartefakt

Wie auf den Abbildungen zu erkennen ist, boten einige der Zelllinien (Abb. 18: Mel-Im, Mel-Ho, Mel-Ju, Mel-Juso) Fehlamplifikationsprodukte in Form von Zusatzbanden bei ca. 310 bp. Zur Abklärung wurden diese DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert und sequenziert. Die Analyse der Sequenzen im Vergleich mit der Gendatenbank lieferte jedoch 18S-RNA als Ergebnis. So wurde ihnen keine Relevanz beigemessen, da aufgrund des viel intensiveren Signals für $hp19^{ARF}$ davon auszugehen war, dass sein Anteil am PCR-Produkt um vielfaches höher als der des Nebenproduktes ist. Die späteren $hp19^{ARF}$-Sequenzierungsreaktionen zeigten keinen Einfluss dieses Nebenamplifizierungseffektes auf deren Ergebnisse.

Zum Abschluss der PCR-Reihe wurde ein Versuch mit der cDNA der HCT116-Zelllinie durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Kolon-Karzinom-Zelllinie, bei der ein Verlust des $hp19^{ARF}$-Gens besteht [Yang, You,Yeh, Chang et al, 2000]. Aus diesem Grund eignet sich diese Zelllinie sehr gut als Negativ-Kontrolle für die entwickelte PCR-Prozedur.

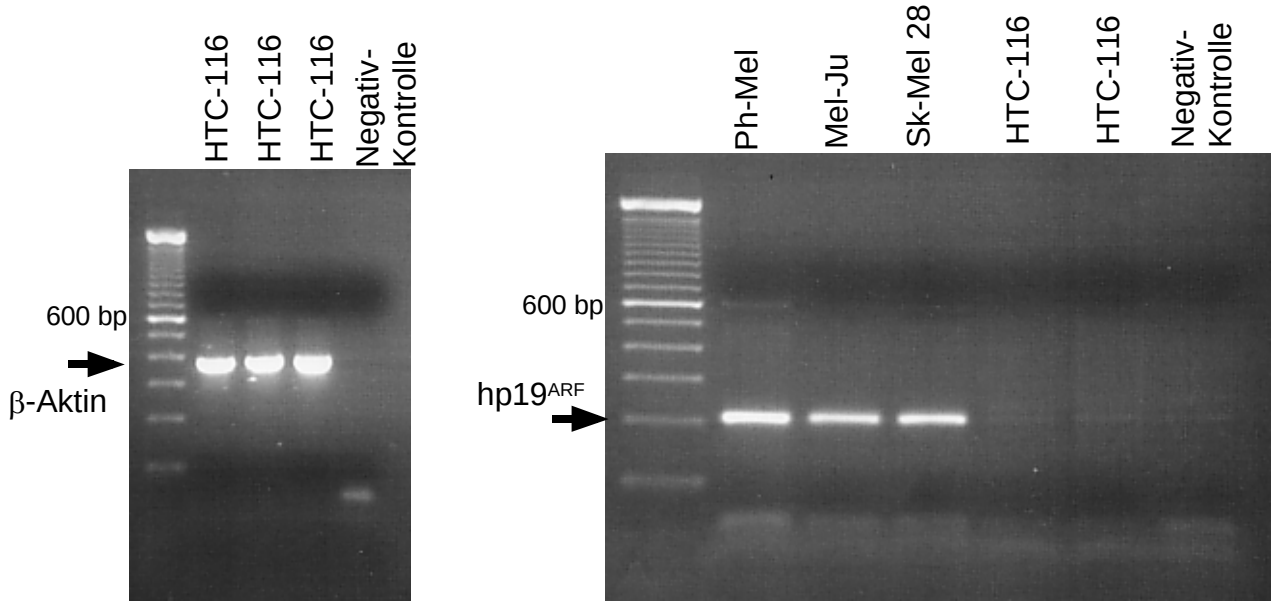


Abb. 19 1,8%-Agarosegele von PCRs mit HCT116-Zelllinie; links abgebildet eine Reaktion mit β-Aktin-Primern zur Kontrolle der cDNA-Qualität; rechts abgebildet die eigentliche Reaktion mit dem hp19^{ARF}-Primerpaar for2-rev3 für Exon-1β.

Die oben aufgeführte Abbildung 19 zeigt ein Exempel der Amplifizierungsreaktionen mit der HCT116-Zelllinie. Bei beiden wurde dieselbe cDNA verwendet. Vergleicht man das Expressionsmuster von β-Aktin mit dem von hp19^{ARF} bei HCT116, so ist trotz der qualitativ hochwertigen cDNA (= positive β-Aktin-Reaktion), keine hp19^{ARF}-spezifische Bande auf dem Agarosegel bei ca. 200 bp zu erkennen. Dies entspricht der beschriebenen, fehlenden hp19^{ARF}-Expression bei HCT116. Zur weiteren Differenzierung wurden in PCR (Primer for2-rev3, Puffer G, 63°C Annealing) zusammen mit HCT 116 auch die cDNAs von Sk-Mel, Ph-Mel und Mel-Ju (2 Melanom- sowie einer Melanozyten-Zelllinie) amplifiziert, es sind Zelllinien bei denen die positive Expression von hp19^{ARF} in den vorherigen Experimenten nachgewiesen werden konnte.

Wie den obigen Ausführungen zu entnehmen ist, konnten mit der etablierten PCR-Prozedur in allen Melanozyten- und Melanomzelllinien beide hp19^{ARF}-Genfragmente spezifisch amplifiziert und damit in allen untersuchten Proben eine hp19^{ARF}-Expression gezeigt werden.
Da mehrere Ansätze der jeweiligen PCR mit gleichen Resultaten durchgeführt wurden, konnte sowohl die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse belegt, als auch ausreichend Template für nachfolgende Sequenzierungsreaktionen hergestellt werden.

1.2.4. Sequenzierung und Analyse der hp19^{ARF}-PCR-Produkte

1.2.4.1. Sequenzierung der hp19^{ARF}-PCR-Produkte

Die anschließenden Sequenzierungsreaktionen erforderten eine Reinigung der PCR-Produkte beider Gen-Fragmente. Dafür wurde die Methode der PEG-Fällung angewendet. Auch die Amplifizierungsprodukte der Reaktion mit den for3-rev2-Primern wurden PEG-gefällt, da das hp19^{ARF}-charakteristische Signal (bei ca. 250 bp) deutlich stärker war und damit die entsprechende cDNA den Hauptanteil an dem Produkt darstellte (siehe Abb. 18).
Auf den 1,8%-igen Agarosegelen konnte man den Erfolg der PEG-Fällung überprüfen. Beispiele solcher Kontrollen sind unten dargestellt in Abbildung 20.

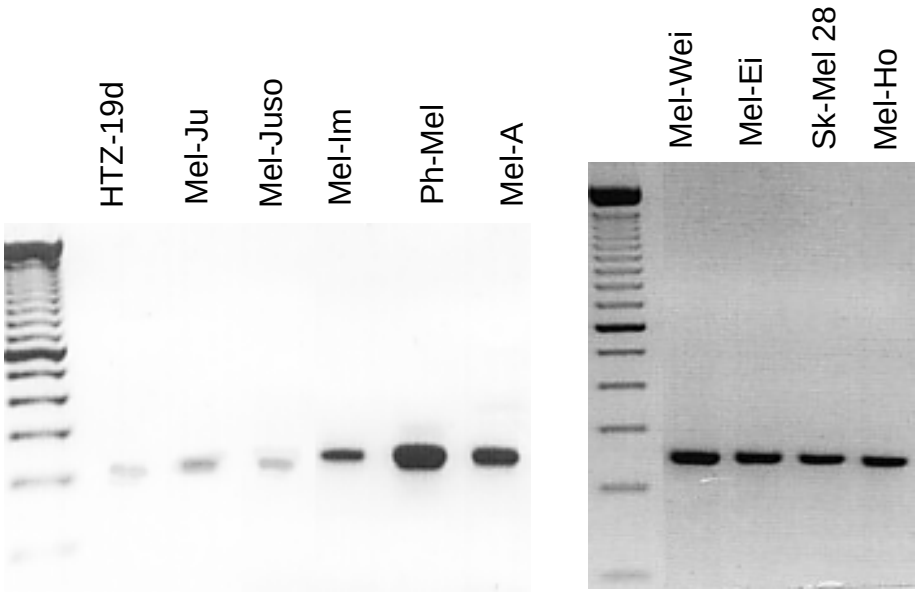
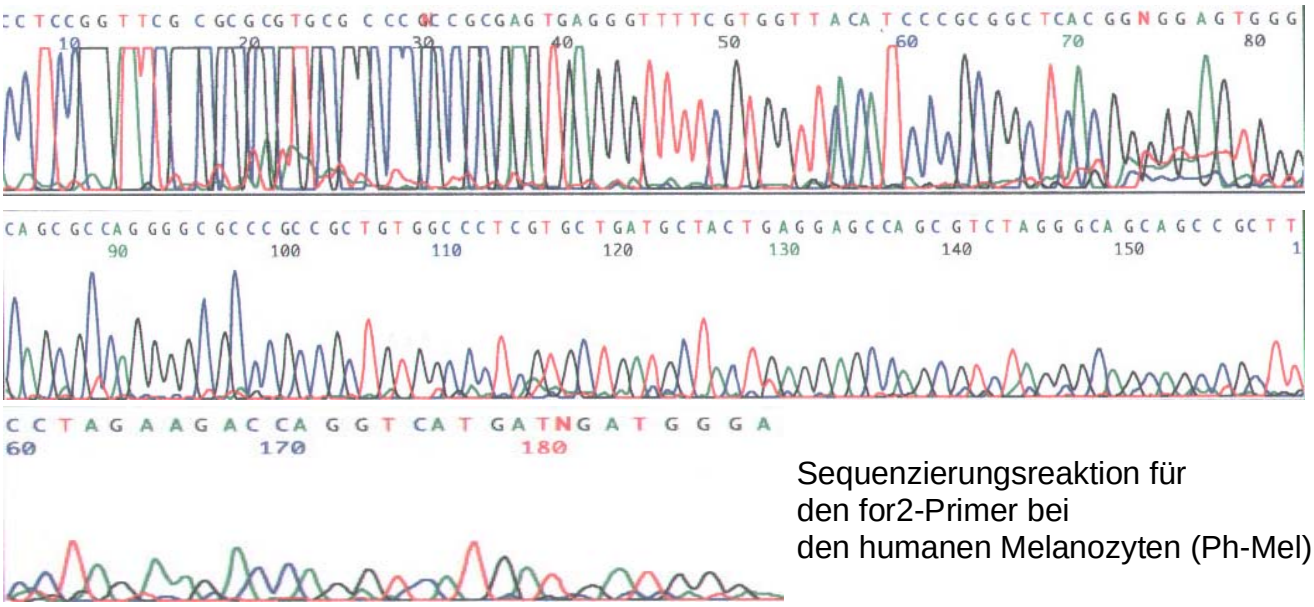


Abb. 20 1,8% Agarose-Gel mit den PEG-Fällungsprodukten einiger Zelllinien aus den Polymerasen-Ketten-Reaktionen mit beiden Primerpaaren; links for2-rev3, rechts for3-rev2.

Einige der Proben boten ein sehr schwaches Signal auf dem Gel, das mit einer schlechten Ausbeute der Fällung und damit geringem DNA-Gehalt der Probe korreliert.
Durch die Methode der Sequenzierung mit der vorherigen spezifischen PCR und dem Einsatz höherer Template-Menge (nach quantitativer Abschätzung des Probengehaltes), konnte dieser Effekt kompensiert werden, mit dem Ergebnis gut auswertbarer Sequenzen. Die Sequenzierungsmethode wie im „Material-und-Methoden"-Teil beschrieben, erfolgte bei allen Zelllinien und in jeweils beiden Primerrichtungen.

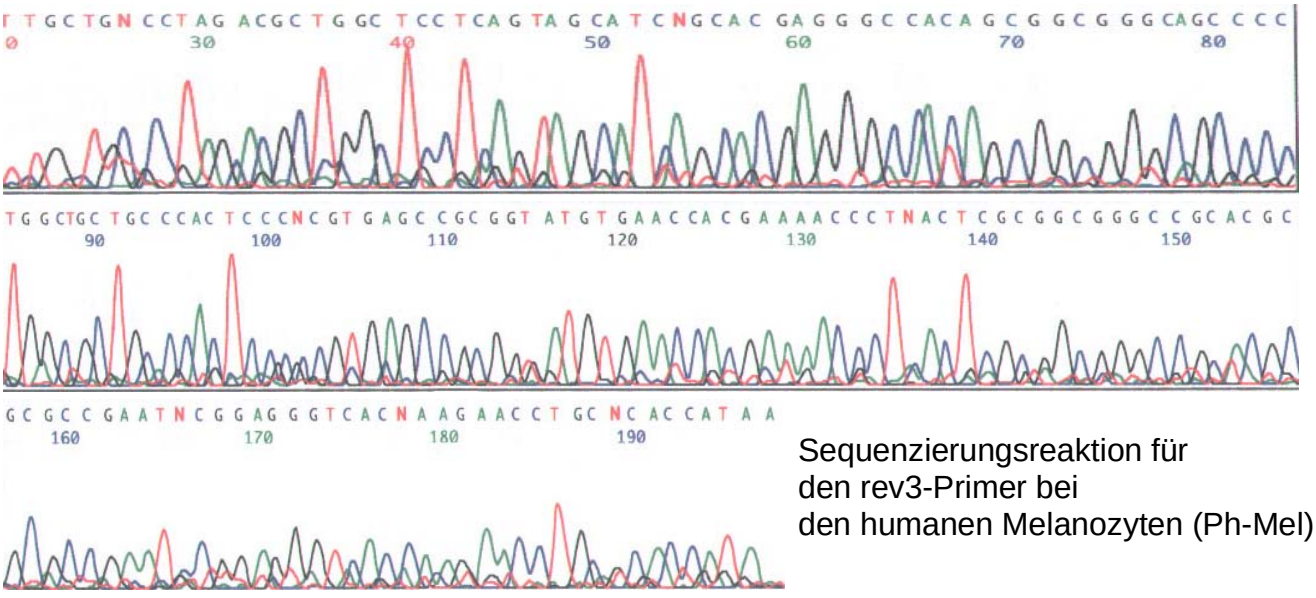
1.2.4.2. Analyse der hp19^{ARF}-Sequenzen

Mit den gereinigten PCR-Produkten aus allen Zelllinien wurden Sequenzierungsreaktionen vollzogen und anschließend die Sequenzen auf mögliche Mutationen untersucht.
Ein Beispiel solcher Sequenzierungsreaktion für die humanen Melanozyten in beiden Primerrichtungen ist in Abbildungen 21 und 22 gezeigt.



Sequenzierungsreaktion für
den for2-Primer bei
den humanen Melanozyten (Ph-Mel)

Abb. 21 Beispiel einer Sequenzierungsreaktion für die primären humanen Melanozyten; es wurde mit for2-Primer sequenziert.



Sequenzierungsreaktion für
den rev3-Primer bei
den humanen Melanozyten (Ph-Mel)

Abb. 22 Beispiel einer Sequenzierungsreaktion für die primären humanen Melanozyten; es wurde mit rev3-Primer sequenziert.

Die Überprüfung der Sequenzierungsergebnisse aller untersuchten Zelllinien im Vergleich mit der Original-Sequenz (siehe Abschnit 1.2.1) ergab jedoch keinerlei Veränderungen des Gens.
Es sind sowohl Vorwärts- als auch Rückwärts-Reaktion sequenziert und analysiert worden. Beide stimmten in ihrer Abfolge miteinander überein, so dass in keiner Zelllinie Basendeletionen, Punktmution bzw. Transitionen im Sinne einer Mutation hetero- oder homozygoter Art gefunden werden konnten.

2. hp19^{ARF}-Protein-Expression in malignen Melanom-Zelllinien

Anhand der PCR-Ergebnisse konnte belegt werden, dass in allen untersuchten Zelllinien das hp19^{ARF}-Gen exprimiert wird. Auch die Sequenzenanalysen ergaben keine Verluste oder Mutationen des Gens in den Zelllinien.
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren geprüft, ob durch irgendwelche Einflüsse der Translationsweg des hp19^{ARF}-Proteins einer Störung unterliegen könnte, d.h. die mRNA zwar transkribiert, das Protein jedoch nicht bzw. unvollständig synthetisiert wird [Della Valle, Duro et al., 1997].
Zur Klärung dieser Fragestellung, über die Anwesenheit des Proteins in den kultivierten Tumor- und Melanozyten-Zelllinien, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

2.1. Etablierung des Western-Blot-Nachweises von hp19^{ARF}

Alle Western-Blots wurden mit dem oben beschriebenen Anti-hp19^{ARF}-Antikörper aus dem Kaninchen der Firma BIO SOURCE INT. durchgeführt. Die Proben der RIPA-Lysate aller kultivierten Zelllinien wurden sowohl auf komerziell-erworbenen Nu-Page-SDS-Gelen der Firma NOVEX INVITROGEN Co. als auch auf selbst hergestellten 15%-igen SDS-Page-Gelen aufgetragen.
Die Kenntnis der Proteinkonzentration (BCA-Messung) in den Lysaten jeweiliger Zelllinien war essentiell für die richtige Interpretation der Western-Blot-Ergebnisse. Wichen die Signale auf den Blot-Membranen in ihrer Intensität voneinander ab, so konnte anhand der BCA-Daten ermittelt werden, ob es an der Proteinkonzentration der Lösung lag oder das entsprechende Protein (hp19^{ARF}) in niedriger Konzentration vorlag bzw. gar nicht vorhanden war.

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zelllysate (BCA-Messung siehe Tab. 4) erfolgte nach der Biuret-Reaktion mit dem BCA-Protein-Assay-Reagent-Kit der Firma PIERCE.

Gesamtzelluläre Proteinkonzentration in $^{\mu g}/_{\mu l}$

Zelllinie	**BCA1**	**BCA2**
Mel-Im	3,3	1,5
Mel-A	3,5	1,1
Ph-Mel	2,9	1,4
Mel-Ho	1,7	2,07
Mel-Wei	1,2	1,5
Mel-Ei	1,5	1,4
Mel-Ju	2,9	2,3
Mel-Juso	3,5	2,5
Sk-Mel 28	2,9	1,4
HTZ-19d	1,4	1,4
HeLa	0,96	0,76
KM_3	1,51	1,51
HCT 116	3,6	3,6

Tab. 4 Zwei voneinander unabhängige Bestimmungen der gesamtzellulären Proteinkonzentration.

Die Entwicklung der Western-Blot-Bedingungen begann zunächst mit 4 Zelllinien (Mel-Im, Mel-A, Ph-Mel, HeLa), wobei die Lysate der HeLa-Zellen nach Angaben des Herstellers als Positiv-Kontrolle fungierten.

Es wurde zunächst die geeignete Verdünnungskonzentration für den primären $hp19^{ARF}$-Antikörper bestimmt (s. Abb 23).

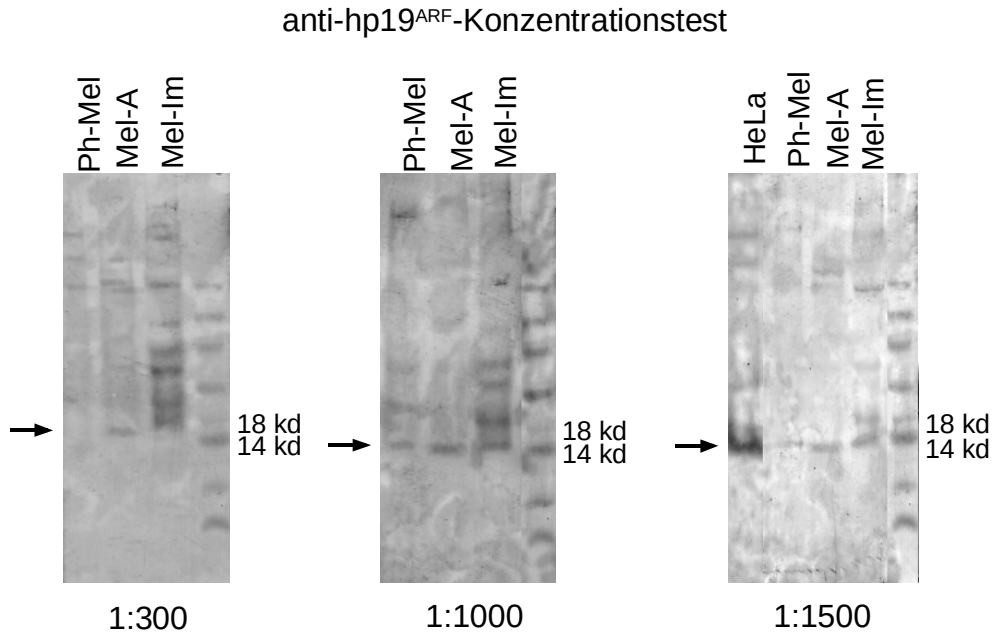


Abb. 23 Western-Blots zur Austestung der Konzentration des primären hp19^{ARF}-Antikörpers. Pfeile markieren die charakteristische hp19^{ARF}-Bande bei 14 kd.

Da sich bei den durchgeführten Versuchen keine Unterschiede der Antikörperreaktionen zwischen den einzelnen Konzentrationen (Antikörper verdünnt in 3% BSA/PBS) zeigten, die Konzentrationen von 1:300 und 1:1000 sogar unspezifischere Ergebnisse ergaben, wurde weiter mit der 1:1500 Konzentration des primären Antikörpers gearbeitet.

Um Fehlreaktionen zwischen dem verwendeten sekundären Anti-Rabbit-IgG-Antikörper und den Proteinen in den Proben auszuschließen und damit gleichzeitig die Spezifität des primären Antikörpers zu überprüfen, wurden auf einer Membran mehrere gleiche Proben der Zelllinien aufgetragen und anschließend ein Membranteil wie gewöhnlich mit dem primären und später dem sekundären Antikörper und ein Membranteil nur mit dem sekundären Antikörper behandelt (s. Abb. 24).

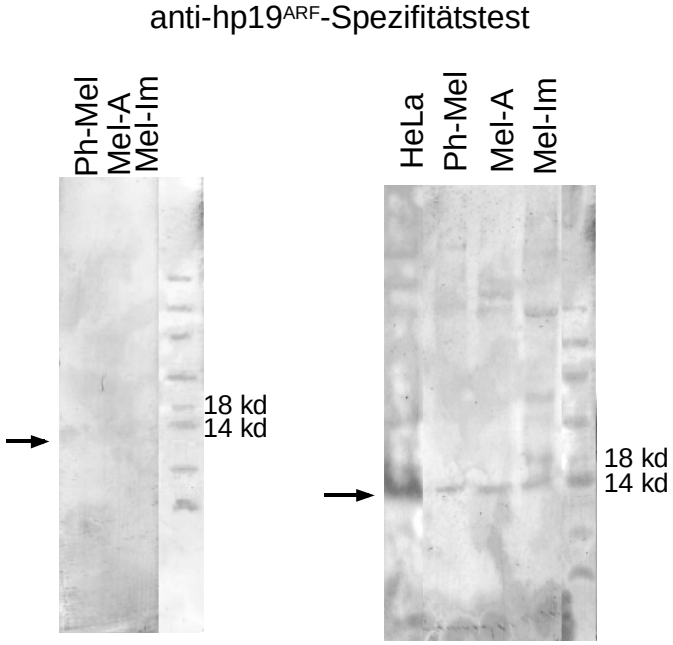


Abb. 24 Überprüfung der Spezifität des primären und des sekundären Antikörpers. Die Membran rechts zeigt einen normalen Western-Blot. Die Membran links wurde nur mit dem sekundären Antikörper behandelt, deshalb ist keine Reaktion sichtbar.

Auf der Membran, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurde, sind keine proteinspezifischen Banden zu sehen. Ganz anders verhält es sich bei der Membran, die gewöhnlich mit primärem und sekundärem Antikörper behandelt wurde. Anhand dieses Resultats kann man davon ausgehen, dass der sekundäre Antikörper eine gute Spezifität gegenüber Anti-hp19^{ARF}-Antikörper aufweist und Fehlbindungsreaktionen zwischen ihm und den Probeproteinen ausgeschlossen werden können.

In diversen Literaturbeiträgen werden nicht nur HeLa-Zellen, sondern auch humane Fibroblasten und Myozyten als Positivkontrollen für hp19^{ARF} bei den Western-Blots aufgeführt. Daher wurde auch hier die hp19^{ARF}-Expression in primären Fibroblasten und Myozyten überprüft (s. Abb. 25) [Della Valle, Duro et al., 1997].

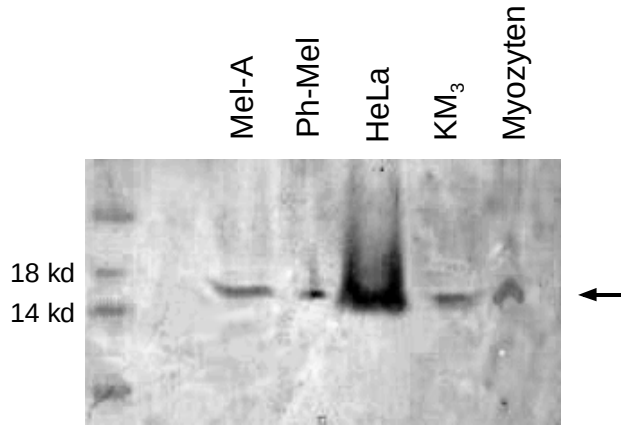


Abb. 25 Blot mit He-La, Fibroblasten und Myozyten als hp19^{ARF} Positivkontrollen, im Vergleich zu den kultivierten Melanozyten.

Abschließend wurden einige Versuche mit selbstgegossenen 15%-igen SDS-Page-Gelen vollzogen, da diese wegen ihrer Beschaffenheit in der Lage sind, Proteine im Bereich 10-60 kd (hp19^{ARF}- ca. 14 kd) besser aufzutrennen. Im Vergleich zu den kommerziell erworbenen Nu-Page-SDS-Gelen (NOVEX INV. Co.) konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden (s. Abb. 26), weshalb weiterhin die Nu-Page-SDS-Gele eingesetzt wurden.

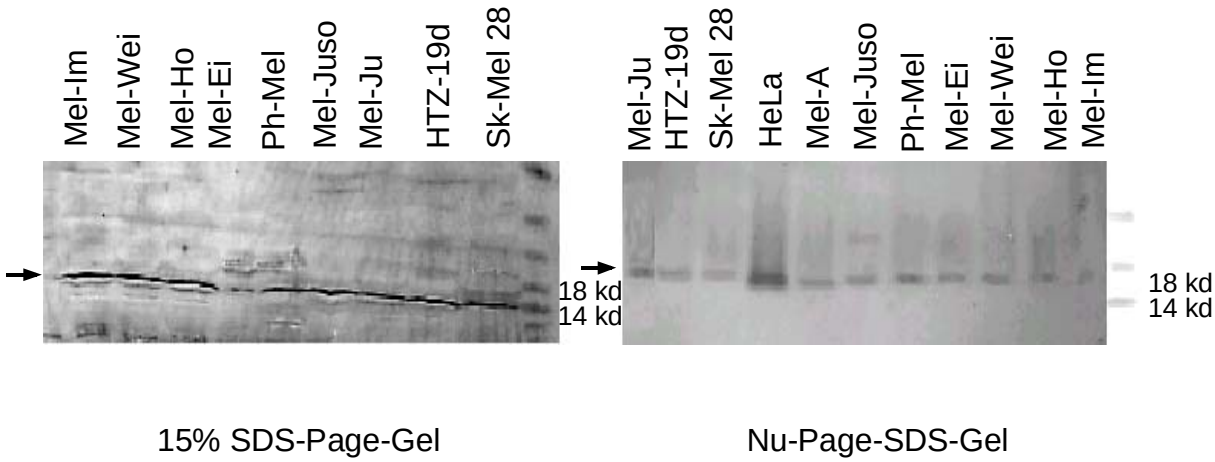


Abb. 26 Vergleich der Resultate zwischen einem kommerziell erworbenen (rechts) und einem selbsthergestellten SDS-Page-Gel (links). Zu erkennen sind die deutlich besseren Resultate mit den erworbenen Nu-Page-SDS-Gelen.

2.2. Analyse der hp19^{ARF}-Protein-Expression

Nach der Vorversuchsreihe konnte mit der Überprüfung aller Zelllinien begonnen werden. Die Bedingungen waren: hp19^{ARF}-Antikörperverdünnung 1:1500, Nu-Page-SDS-Gele, Sekundärantikörper-Verdünnung 1:300.

Bei jedem Experiment sind neben den Tumor- und Melanozyten- auch die HeLa-Zellen mitaufgetragen worden, da sie nach Angaben des Antikörperherstellers als Positivkontrolle gelten (dies wurde auch in den Vorversuchen bestätigt).

Es sind mehrere Western-Blot-Versuche durchgeführt worden, bei denen in allen Zelllinien das hp19^{ARF}-Protein nachgewiesen werden konnte. Beispiele für die Western-Blots sind auf der folgenden Abbildung 27 und als Zusammenstellung für zwei voneinander unabhängige Proteingehalt-Bestimmungen nach BCA2- und BCA1 in Tabelle 5 aufgezeigt.

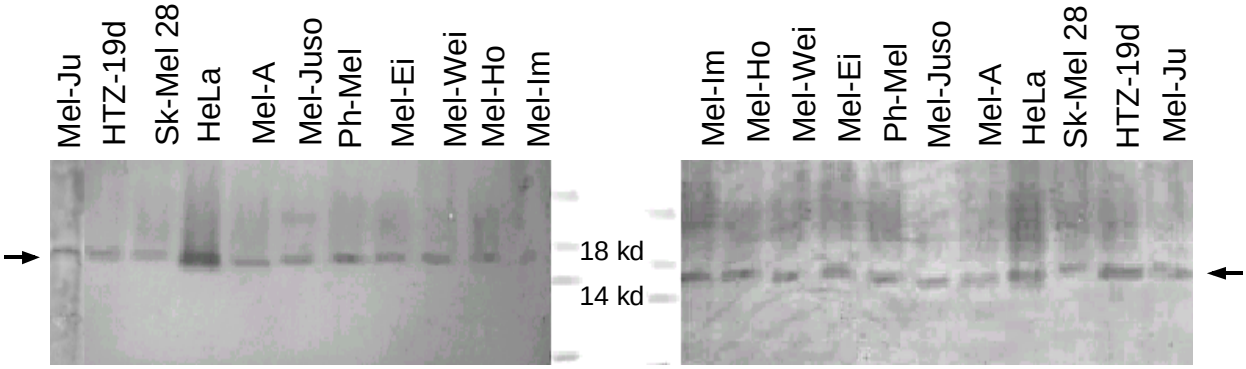


Abb. 27 Western-Blots mit Proben von allen zu untersuchenden Zelllinien einschließlich HeLa-Zellen. Man kann die hp19^{ARF}-Protein-Expression in allen Zellen erkennen (Bande bei ca. 14kd), Proteinbestimmung BCA2- links, und BCA1 rechts; gesamtzelluläre Proteinkonzentrationen siehe Tabelle 4

Bei allen Zelllinien wurden zur besseren Auswertung der Ergebnisse gleiche Mengen vom gesamtzellulären Protein aufgetragen (20 µg).

Zelllinie	*Western-Blot-Reaktion*	
	Lysat-BCA2	*Lysat-BCA1*
Mel-Im	++	++
Mel-A	+	+
Ph-Mel	++	++
Mel-Ho	++	++
Mel-Wei	++	++
Mel-Ei	++	++
HTZ-19d	++	+++
Sk-Mel 28	+	+
Mel-Ju	++	++
Mel-Juso	++	++
He-La	+++	+++
HCT 116	-	-

Tab. 5 Zusammenstellung der Proteinnachweisreaktionen in allen untersuchten Zelllinien (- negativ, + schwach, ++ normal, +++ stark)

Wie schon in den vorausgegangenen PCR-Experimenten dargestellt, wird das $hp19^{ARF}$-Gen in allen Zelllinien in vergleichbarer Stärke exprimiert (entspricht der Bandenintensität auf dem Agarosegel). So verhält es auch mit dem $hp19^{ARF}$-Protein, dessen Anwesenheit in allen Zelllinien vergleichbar ist.

Mit den Resultaten der Western-Blots konnte auch die in manchen PCRs vermutete schwache $hp19^{ARF}$-Expression in der HTZ19d-Zelllinie widerlegt werden, da der Proteinnachweis wie in Abb. 28 ein starkes Signal ergab.

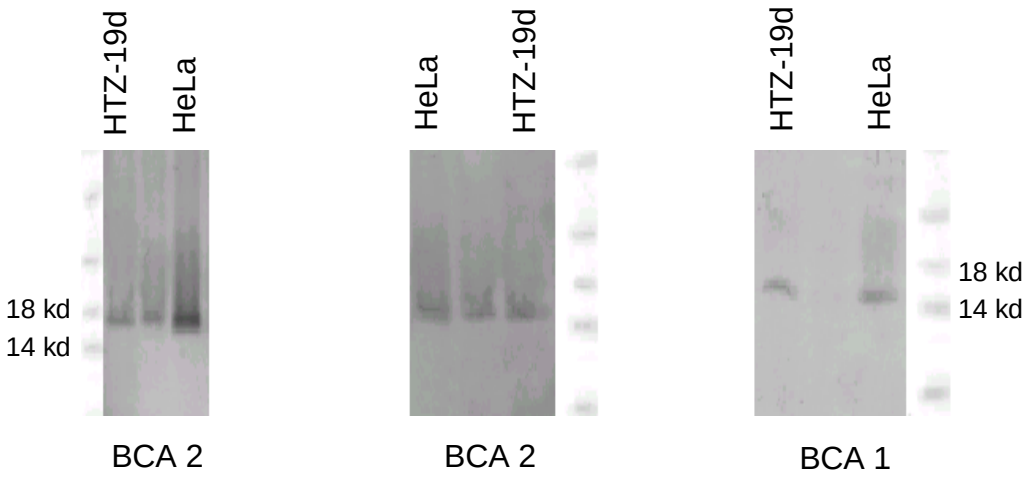


Abb. 28 Einige Beispiel für die hp19^{ARF}-Proteinexpression in der HTZ19d-Zelllinie.

Analog zu der PCR-Reihe wurden abschließende Western-Blots mit der HCT116-Zelllinie durchgeführt. Da das hp19^{ARF}-Gen in diesen Zellen nicht exprimiert wird, ist davon auszugehen, dass auch das Protein nicht mehr vorhanden (translatiert) sein kann [Yang, You, Yeh, Chang et al, 2000]. Dieser Sachverhalt konnte in den vorliegenden Proteinnachweis-Versuchen belegt werden (s. Abb. 29).

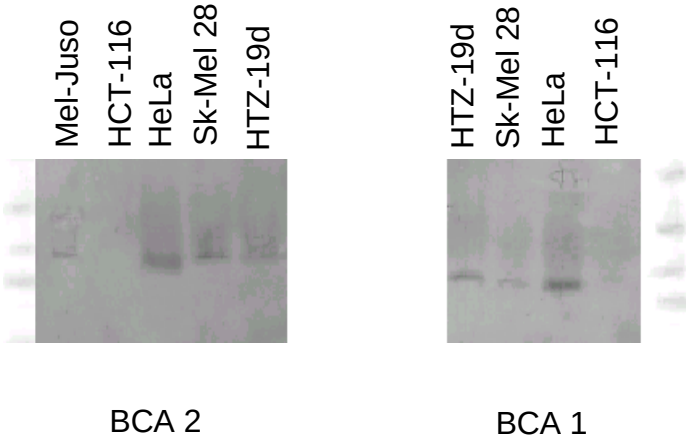


Abb. 29 Western-Blot mit der HCT116-Zelllinie, bei der das hp19^{ARF}-Gen verloren und damit kein hp19^{ARF}-Protein nachweisbar ist.

Aufgrund der vorhandenen PCR-Daten, in denen sich keine hp19^{ARF}-Genmutationen zeigten, sowie der durchgeführten Westen-Blots, bei denen in allen Zelllinien das hp19^{ARF}-Protein nachweisbar war, ergab sich die Schlußfolgerung, dass die hp19^{ARF}-Translation *in vitro* keine Aberrationen aufweist, die zu einem funktionsunfähigen oder gar zum Verlust des Proteins führen könnten.

3. Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von hp19^{ARF} in Melanomgeweben in vivo

Nach der Überprüfung der Gen- und Protein-Expression von hp19^{ARF} *in vitro* in den Zelllinien, stellte sich die Frage über den Sachverhalt *in vivo*. Da bis zu dem Zeitpunkt darüber in der Literatur noch keine stichhaltigen Hinweise zu finden waren, sollte dieser mit den nachfolgenden immunhistochemischen Färbungen *in situ* dargestellt werden. Dazu wurden mehrere Untersuchungen an einem randomisierten Kollektiv aus Gewebepräparaten von Patienten mit primären, malignen Melanomen durchgeführt. Darunter befanden sich sowohl verschiedene Typen von malignen Melanomen, als auch Naevi und Melanom-Metastasen.
Die Präparate wurden mit der DAB- (Sigma) und der AEC-Methode (Dako), wie im Abschnitt 2 von „Material und Methoden“ beschrieben, angefärbt. Bei allen Experimenten wurde der gleiche polyklonale anti-hp19^{ARF}-Antikörper eingesetzt, der auch bei den Western-Blots Verwendung fand. Es wurde lediglich seine Konzentration auf 1:200 geändert.

3.1. Ergebnisse

In der unten gezeigten Tabelle 6 sind die Resultate der immunhistochemischen Färbung nach Gewebeart getrennt aufgeführt.

Gewebe	Reaktion
Naevi	
dysplastischer Naevus	+
dysplastischer Naevus	+
Blauer Naevus	+
Naevus	+
Naevus	+
Naevus	+
Naevus	schwach +
dermaler Naevus	- / +
Junktions-Naevus	- / +
Naevuszell-Naevus	- / +
Naevus	- / +
Junktions-Naevuszell-Naevus	-
dysplastischer Naevus	-
Junktions-Naevuszell-Naevus	-
Primäre, maligne Melanome	
Amelanotisches, noduläres malignes Melanom	+
primäres noduläres malignes Melanom	+
primäres malignes Melanom	+
primäres malignes Melanom	- / +
primäres malignes Melanom	-
superfiziell spreitendes malignes Melanom	-
primäres malignes Melanom	-
malignes Melanom	-
superfiziell spreitendes malignes Melanom	-
superfiziell spreitendes malignes Melanom	-
primäres malignes Melanom	-
primäres malignes Melanom	-

Gewebe	Reaktion
Metastasen maligner Melanome	
LK-Metastase eines malignen Melanoms	- / +
Metastase eines malignen Melanoms	- / +
Metastase eines malignen Melanoms	- / +
Metastase eines malignen Melanoms	-
Metastase eines malignen Melanoms	-
LK-Metastase eines malignen Melanoms	-

Tab. 6 Zusammenfassung der Ergebnisse immunhistochemischer Färbungen an Patientengewebe (-/+ auf dem Präparat sind sowohl positive als auch negative Zellen zu finden, LK = Lymphknotenmetastase).

Wie schon der Tabelle zu entnehmen ist, wurde bei den Experimenten Gewebe verschiedener Dignität verwendet. Es hat sich ein relativ durchmischtes Bild der Proteindetektion ergeben, so dass beim gleichartigen Gewebe sowohl positive als auch negative Reaktionen zu erkennen waren.

In den folgenden Abbildungen 30 bis 32 werden Beispiele der Färbungen für die jeweiligen Tumorarten präsentiert.

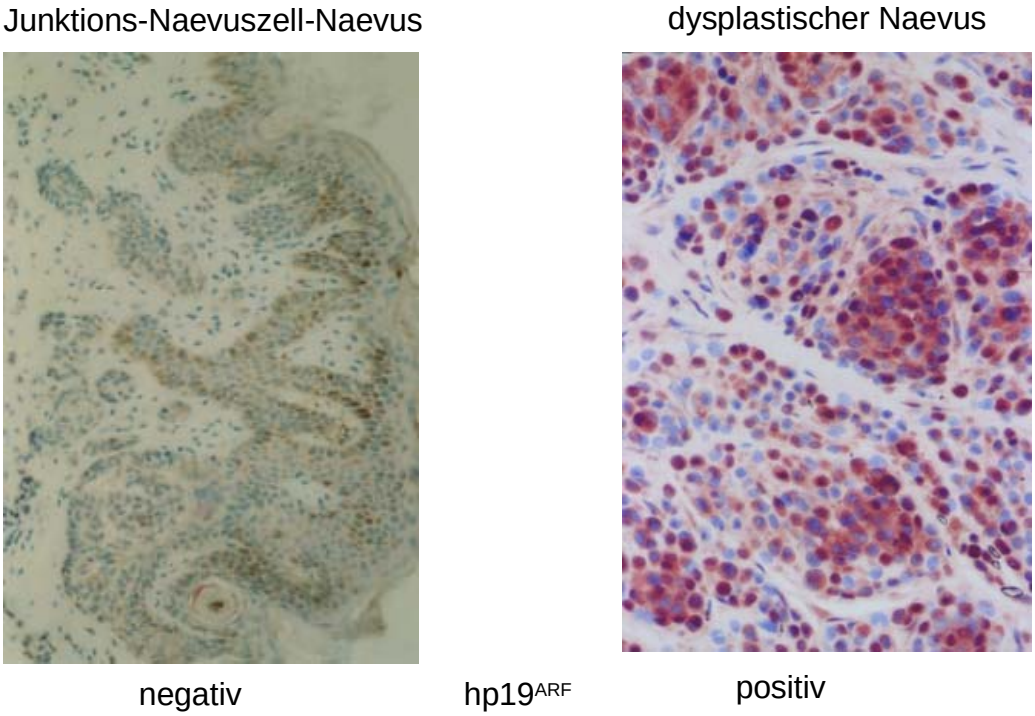


Abb. 30 Beispiel für immunhistochemische Färbung an einem Junktions-Naevuszell-Naevus mit negativer Reaktion (links), sowie einem dysplastischen Naevus mit positivem Proteinnachweis (rechts).

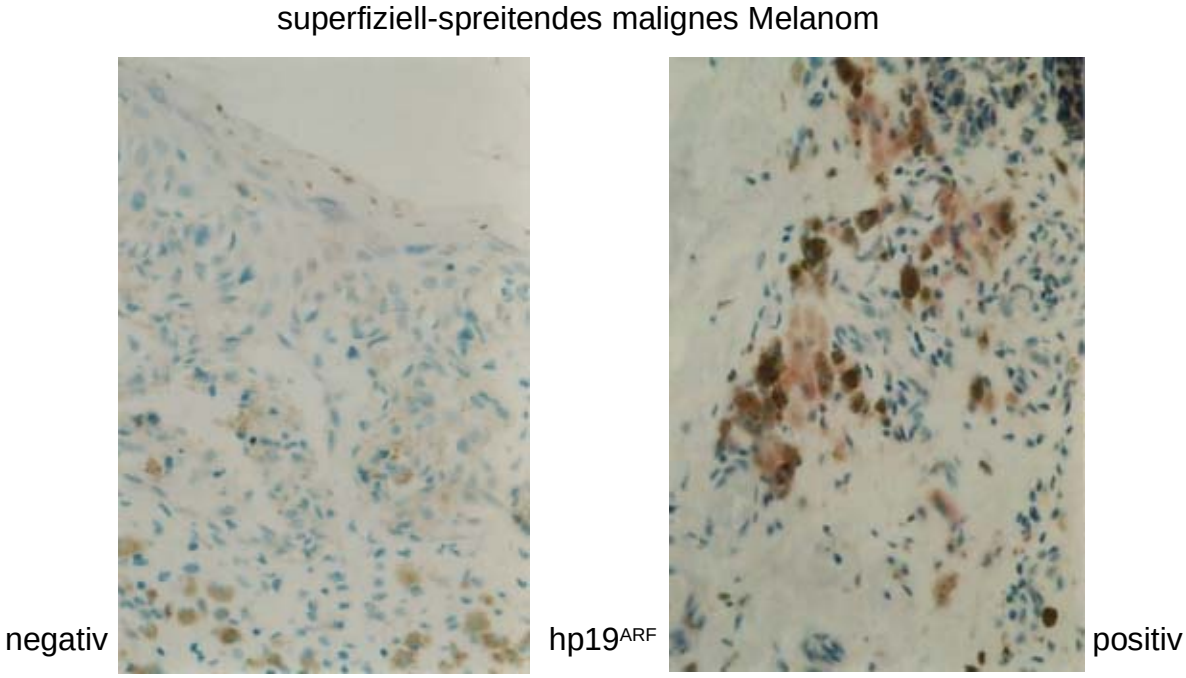
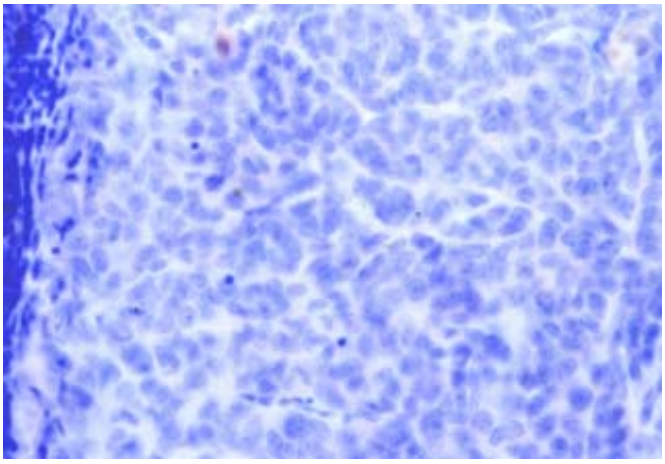


Abb. 31 Immunhistochemie von zwei primären, malignen Melanomen mit negativem Proteinnachweis (links) und positivem (rechts).



Lymphknoten-Metastase

hp19^{ARF}-negativ

Abb. 32 Lymphknoten-Metastase eines malignen Melanoms, die beim immunhistochemischen Proteinnachweis sowohl positive, als auch negative Reaktionen aufweist.

Unter den insgesamt 32 untersuchten Präparaten befanden sich 14 Naevi, 12 primäre, maligne Melanome und 6 Metastasen maligner Melanome. Die hp19^{ARF}-Proteinnachweise ergaben folgende Resultate:

Tumorart	*Anzahl*	*Positive (+) Proteinnachweise*	*Negative (-) Proteinnachweise*	*Gemischte (-/+) Proteinnachweise*
Naevus	14	7 (50%)	3 (21%)	4 (29%)
Melanom	12	3 (25%)	8 (66%)	1 (9%)
Metastase	6	0 (0%)	3 (50%)	3 (50%)

Tab. 7 Zusammenstellung der Proteinnachweise in den Gewebearten

Aus diesen Daten konnte keine eindeutige Leitlinie für Verlust oder Anwesenheit von hp19^{ARF} herausgearbeitet werden, vergleichbar zu den Zelllinien, die alle eindeutig eine Expression des Gens und Proteins nachweisen. Jedoch deuten die Daten, vor allem in Anbetracht der tabellarischen Zusammenstellung (Tab. 7), auf eine Tendenz zum Verlust des hp19^{ARF}-Proteins *in vivo* und zwar in einer scheinbaren Korrelation mit der fortschreitenden Progression des Tumors.

VI. Diskussion

Die grundlegende Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand in der Frage, ob Verluste oder Mutationen des $p19^{ARF}$-Gens, bzw. Verluste seine Proteinexpression bei der Entstehung oder Progression maligner Melanome von Bedeutung sind.

Das $p19^{ARF}$-Gen (β-Transkript vom Exon-1 des INK4a-Locus) wurde erstmalig in der Arbeitsgruppe um Quelle (1995) bei dem Versuch der Isolation und Charakterisierung der Maus-cDNA für $p16^{INK4a}$ entdeckt [Quelle et al., 1995a, 1995b].

Der INK4a-Locus befindet sich bei der Maus auf dem Chromosom 4 und beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9, und beinhaltet 3 Exons (1α/β, 2, 3) von denen 1α, 2, 3 bei der Transkription für $p16^{INK4a}$ und 1β sowie 2 im alternativen Raster für $hp19^{ARF}$ abgelesen werden. Daraus ergeben sich nach der Translation zwei voneinander völlig unabhängige Proteine.

Innerhalb kurzer Zeit wurde von Duro et al. (1995) auch das humane Equivalent zum $p19^{ARF}$-Gen gefunden, und von Mao und Stone konnte auch das dazu gehörige Protein identifiziert werden [Duro et al., 1995; Mao et al., 1995; Stone et al, 1995].

Das humane $p19^{ARF}$ (= $hp19^{ARF}$ {definiert nach dem murinen Protein}, auch bekannt als $p14^{ARF}$ oder ARF), ist ein intranukleär gelegenes Protein, das zu der Gruppe der Tumorsuppressoren gerechnet wird. Es besteht aus 132 AS und hat somit ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 14 kd. Das murine Protein besteht hingegen aus 169 Aminosäuren mit resultierendem Molekulargewicht von 19 kd.

In jüngster Zeit nimmt das Interesse an $hp19^{ARF}$ stetig zu. Begründet wird es in den genetischen und funktionellen Zusammenhängen zwischen $hp19^{ARF}$ und $p16^{INK4a}$, sowie der Tatsache, dass $p16^{INK4a}$ in einer Reihe von familiären Melanomen vielfältige Mutationen aufweist und von vielen Autoren als „ein Melanom-Suszeptibilitätgen“ angesehen wird [Cannon-Albright et al., 1992; Noncarrow et al., 1993; Fargnoli et al., 1998].

Aufgrund dieser Tatsachen wird spekuliert, ob $hp19^{ARF}$ eine Rolle bei der Entstehung von malignen Melanomen, v.a. bei den familiären Tumoren, spielen könnte und wird so auch zu den Melanom-Gen-Kandidaten gezählt [FitzGerald et al, 1996].

Es existieren zahlreiche Möglichkeiten der Inaktivierung von Genen oder Proteinen, die sich oft aus der Struktur eines zellulären Signalweges ergeben. Ob in dem jeweiligen Fall das Gen bzw. Protein selbst betroffen ist oder ein weiteres Gen desselben Signaltransduktionsweges, und auf welche Art und Weise, erfordert langwierigere und aufwendigere Untersuchungen.

Als Beitrag zur Klärung der komplexen Zusammenhänge in der Zellzyklusprogression war es das Ziel dieser Arbeit, die Exspression von $hp19^{ARF}$ in malignen Melanomen zu untersuchen, und mögliche Genmutationen bzw. Proteinverluste in den Zelllinien und Gewebepräparaten zu definieren. Zu diesem Zweck wurden 8 Melanomzelllinien und 2 primäre Melanozytenarten auf Gen- (PCR) und Proteinexpression (Western-Blot) untersucht, sowie zur Darstellung der Proteinexpression *in vivo* an 32 Gewebepräparaten von Patienten mit malignen Melanomen, Naevi, Melanom-Metastasen immunhistochemische *in situ*-Nachweisverfahren durchgeführt.

Wie die im Teil V dargestellten Ergebnisse zeigen, wurden in keiner der Zelllinien Expressionsverluste von $hp19^{ARF}$ gefunden, die auf eine mögliche Veränderung des Gens, seiner Transkription oder Translation hinweisen könnten.

Sowohl die PCR-Nachweise, als auch die Sequenzierungsreaktionen derer Produkte, mit anschließender Sequenzenanalyse zeigen in allen 10 Zellarten eine regelrechte, mutationsfreie Genexpression. Ihre Ausprägung, ablesbar an der Intensität der Banden auf dem Agarose-Gel, variiert zwischen den einzelnen Zellen (2 von 10 zeigen schwache, 5 von 10 mittlere und 3 von 10 starke Expression), da es sich aber um unterschiedliche Zellen handelt (die Metastasen {Mel-Im, Mel-Ju} sowie primäre-melanozytäre Zellen {Ph-Mel} bieten ein stärkeres Expressionsmuster), könnte dies auf andere Faktoren der zellulären Regulation in den jeweiligen schwächer exprimierenden Zellen zurückgeführt werden, wie z.B. Defekte in der Promotorregion des Gens, welche die Expression zwar nicht vollständig zum Erlöschen bringen, jedoch sie mehr oder weniger stark supprimieren können [Inoue et al., 2000]. Da die kodierenden Genabschnitte nach der Sequenzenanalyse eindeutig nicht betroffen sind, könnte auch von anderen Einflüssen ausgegangen werden, die außerhalb des Gens auf der Proteinebene eine Rolle spielen.

Die Tatsache, dass alle Zelllinien das Gen unverändert exprimieren, wird durch die Resultate der Western-Blots erhärtet, die in allen Zelllinien eine Anwesenheit des Proteins zeigen und mögliche Defekte auf der Proteinebene ausschliessen lassen. Durch den Einsatz gleicher Mengen des gesamtzellulären Proteins war es möglich anhand der Bandenintensität die Zelllinien im Bezug auf ihre Expression miteinander zu vergleichen. Somit erscheint das $hp19^{ARF}$ in den meisten Zelllinien, bis auf einige wenige (2 von 10 nämlich Sk-Mel 28 und Mel-A), in etwa gleichen Mengen vorhanden zu sein. Auch korreliert in den meisten Zelllinien die Expression der mRNA (in der PCR) mit der des Proteins (im Western-Blot). Unterschiede lassen sich jedoch in der Sk-Mel 28 Zelllinie vermuten, bei der die Expression der mRNA stärker erscheint als die des Proteins. Dies könnte ein Hinweis auf eine

Beeinträchtigung des Translationsweges, oder aber auf dysregulierte zelluläre Prozesse sein, z.B. vorzeitige Proteolyse oder Überexpression von supprimierenden Proteinen, die die Transkription verhindern oder das $hp19^{ARF}$-Protein in seiner Funktion beeinflussen (beispielsweise scheint mdm2 eine gewisse $hp19^{ARF}$-hemmende Wirkung zu besitzen [Chin et al., 1998]). Die bei Mel-A-Zellen beobachtete schwächere Proteinexpression könnte mit der Tatsache zusammenhängen, dass es sich hierbei um Melanozyten aus der Maus handelt und bei den Proteinnachweisen ein Antikörper gegen das humane $hp19^{ARF}$-Protein verwendet wurde. Da die Aminosäurensequenzen der murinen und humanen Proteine nur eine 50%-ige Identität aufweisen [Stott et al. 1998], ist eine abgeschwächte Immunreaktion des verwendeten Antikörpers bei den Mauszellen zu vermuten.

Generell konnte in den Experimenten eine regelrechte Expression von $hp19^{ARF}$ in allen untersuchten Zellen sowohl auf der Gen- als auch der Proteinebene gezeigt werden. Ob die vorhandenen Abweichungen, wie bei Sk-Mel 28, *in vitro* bei den Tumor-Zelllinien von Bedeutung sind, würde jedoch weitere Untersuchungen erfordern, so dass ihre möglichen Einflüsse in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

Vollkommen andere Verhältnisse ergaben sich bei den immunhistochemischen Analysen der $hp19^{ARF}$-Expression *in situ*. In den insgesamt 32 untersuchten Gewebe-Präparaten (14 Naevi, 12 maligne Melanome und 6 Melanom-Metastasen), zeigt sich ein differenziertes Expressionsmuster, auch innerhalb der einzelnen Gewebearten. Dadurch können zwar keine sicheren Aussagen über eindeutige Verluste von $hp19^{ARF}$ *in vivo* gemacht werden, jedoch lässt sich eine Tendenz in diese Richtung erkennen. Auch zeigt sich eine scheinbare Korrelation der negativen Proteinnachweise mit der Progression des Tumors, da bei den Naevi die Anzahl der negativen Reaktionen kleiner ist als bei den malignen Melanomen und bei diesen wiederum kleiner als bei den Metastasen (eindeutig positiv zu bewerten waren: 11 von 14 Naevi, 3 von 12 malignen Melanomen und 0 von 6 Metastasen). Ähnliche Resultate wurden auch schon für $p16^{INK4a}$ publiziert, das mit dem Fortschreiten der Melanomerkrankung Proteinverluste aufweist [Healy et al., 1998; Grover et al., 1998].

In einigen wenigen Untersuchungen gelang es auch anderen Arbeitsgruppen das $hp19^{ARF}$-Gen zu amplifizieren, jedoch fiel der proteinchemische Nachweis negativ aus [Gazzeri et al., 1998; Della Valle et al., 1997]. Da bei dieser Dissertationsarbeit das Patientengewebe nur auf proteinchemischer Ebene analysiert wurde, und keine Gen-Amplifizierungsversuche (RT-PCR) unternommen wurden, kann über mögliche Ursachen nur spekuliert werden. Zu denen könnten verschiedene Defekte der zellulären Regulation (über hinzu- oder ausgeschaltete Signaltransduktoren), eine Beeinträchtigung des Promotors oder vorzeitige Proteolyse zählen.

Es könnte genauso gut sein, dass das Protein exprimiert wird, jedoch in so niedrigen Mengen, dass es mit den immunhistochemischen Verfahren nicht nachgewiesen werden kann, wobei auch diese mit den erwähnten dysregulatorischen Prozessen in Beziehung gesetzt werden könnten. Hinzuzurechen ist auch die Tatsache, dass *in vitro* gezüchtet Zellen, optimalen proliferativen und differenzierenden Bedingungen ausgesetzt werden, über die normale Zellen *in vivo* nicht verfügen. Deshalb können ihre Gen- oder Protein-Expressionsmuster mit dem der Zelllinien nicht verglichen werden. Auch die Tatsache, dass alle für diese Arbeit kultivierten Zelllinien als Zellkulturartefakt einen Verlust des $p16^{INK4a}$-Proteins aufweisen [Bosserhoff et al., nicht publizierte Ergebnisse], könnte zur Erklärung der *in vitro* erzielten Resultate dienen, denn eine zusätzliche Ausschaltung von $hp19^{ARF}$ würde den Zellen keine selektiven Proliferationsvorteile mehr bringen. Es würde sich hier also um eine Art Gegenregulationsmechanismus handeln, bei dem die Zellen, die $p16^{INK4a}$-Verlust zeigen das $hp19^{ARF}$ weiterhin normal exprimieren. In Bezug auf diese Erkenntnis wurden an Zellen, die bei den *in-situ*-Experimenten negative Proteinnachweise boten, keine weiteren Untersuchungen auf genetischer Ebene mehr durchgeführt, da der $hp19^{ARF}$-Verlust in erster Linie als der führende, pathogenetische Faktor angenommen werden konnte.
Die vielfältigen, theoretischen Möglichkeiten der Beeinträchtigung von $hp19^{ARF}$ in seiner Funktion als Tumorsuppressor oder der Signalwege, in die es mit eingeschaltet ist, werden in den folgenden Abschnitten besprochen.

1. Zusammenhänge zwischen den Zellzyklusregulatoren und ihre Rolle bei der Pathogenese von Tumorerkrankungen

Der Genlocus auf dem Chromosom 9p21 stellt wegen seiner ungewöhnlichen Struktur ein sehr interessantes Forschungsobjekt dar. Es beinhaltet nämlich die kodierenden Sequenzen für mehrere Tumorsuppressorgene: $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$ und $hp19^{ARF}$ [Duro et al, 1995; Quelle et al, 1995].
In den letzen Jahren werden vor allem die schon erwähnten $hp19^{ARF}$ und $p16^{INK4a}$, sowie ihre Beteiligung an der Pathogenese humaner Karzinome vielfach diskutiert.
Beide Proteine werden in dem sogenannten INK4a-Locus (3 Exons) auf Chromosom 9p21 kodiert, wobei Exon-2 alternativ transkribiert wird. Strukturell sind die beiden Proteine zwar voneinander völlig verschieden und an anderen Signalwegen der zellulären Regulation

beteiligt, jedoch in ihren grundlegenden Funktionen miteinander vergleichbar. Beide spielen als Tumorsuppressorproteine eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, und zwar an den wichtigen Übertrittpunkten zwischen den einzelnen Zyklusphasen. Somit kann ihre Induktion über getrennte Signalwege zu einem Arrest des Zykluses führen: durch $hp19^{ARF}$ in der G1- sowie G2- Phase und durch $p16^{INK4a}$ in der G1-Phase.

Diese Effekte erklären auch, dass mögliche Inaktivierungsprozesse dieser Proteine (z.B. durch Gen-Mutationen/-Deletionen, Promotormethylierung oder Proteinverluste) zu einer unkontrollierten Proliferation und Transformation der Zellen mit der Folge einer malignen Entartung führen können. Dies ist am Beispiel von dem heutzutage wohl am besten untersuchten Tumorsuppressorgen p53 gut zu veranschaulichen, da p53 in über 60% aller humanen Tumoren verschiedene Mutationstypen aufweist [Hollstein et al, 1991; Levine et al, 1991], wobei das Melanom hier eine Ausnahme darstellt [Lubbe et al., 1994; Papp et al., 1996]. Ähnliche Verhältnisse werden bei dem Rb-Gen (Tumorsuppressorgen) beobachtet, das auch in einer Mehrzahl humaner Tumoren Mutationen aufweist [Ko, Prives, 1996].

In dem Sinne nimmt die Bedeutung von $p16^{INK4a}$ und $hp19^{ARF}$ zu, da beide in einem Netzwerk der Zellzyklusprävention involviert sind, bei dem sie direkt mit p53, mdm2 und Rb interagieren [Ruas & Peters 1998; Sherr 1998; Chin et al. 1998].

An diesere Stelle sei angemerkt, dass Mutationen von $p15^{INK4b}$ (dem dritten Produkt des INK4a-Locus) zwar in einigen wenigen Tumortypen gefunden wurden, jedoch sich ihre Relevanz als unbedeutsam erwies, so dass die Funktion von $p15^{INK4b}$ in humanen Karzinomen nicht geklärt ist und deshalb nicht weiter diskutiert werden soll [Hangaishi et al., 1996; Drexler 1998].

Die hohe Komplexität der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Genen, ihren Induktoren oder Inhibitoren, sowie den von ihnen gesteuerten Elementen, führt immer wieder zu Problemen bei ihrer Erforschung. Fast täglich entstehen neue Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen den beteiligten Genen und Proteinen, die den Kreis der Mitglieder noch mehr erweitern und weitere Untersuchungen erfordern. Es ist verständlich, dass teilweise nur kleine Defekte eines der beteiligten Faktoren enorme Folgen haben können, wie z.B. das Wachstum maligner Tumoren.

Hier sollen nur einige ausgewählte der heute bekannten und zum Teil gut untersuchten molekularen Elemente besprochen werden, da eine Abhandlung über die Gesamtheit der Zusammenhänge aus heutiger Sicht nicht möglich ist, und sicherlich den Rahmen sprengen würde. Eine vereinfachte Übersicht der komplexen Wechselwirkungen bietet Abbildung 33.

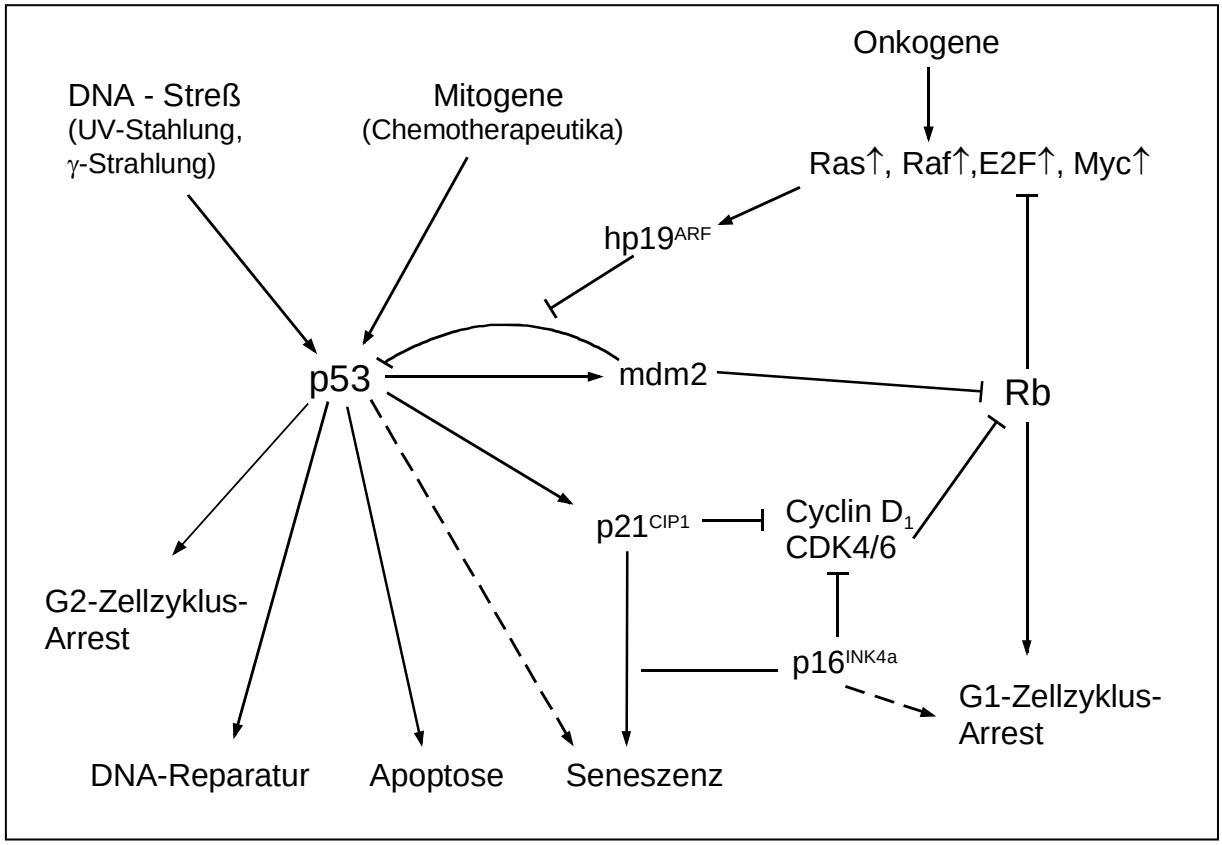


Abb. 33 Schematische Darstellung der Beziehungen zwischen den Zellzyklus-Regulationsfaktoren

Der INK4a-Locus scheint eine sehr wichtige Rolle in der Pathogenese von verschiedenen Tumoren zu spielen, und das nicht nur aufgrund seiner Wechselwirkung mit anderen Tumorsuppressoren oder Tumorprogressoren. In einer Mehrzahl der kultivierten humanen TumorZelllinien (>75%) weist er diverse Defekte (Deletionen, Rearrangements, Punktmutationen, Promotormethylierung) auf. Wie in weitergehenden Untersuchungen festzustellen war, handelt es sich immer um Defekte des INK4a/ARF-Locus, die benachbarten Genregionen waren nur zu einem Bruchteil, wenn überhaupt, betroffen [Nobori et al., 1994; Hall, Peters et al., 1996]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die vorherrschenden Mutationen des Gens eine gewisse Tumorabhängigkeit besitzen (z.B. C:T-Transitionen als UV-typische Veränderung bei kutanen Tumoren). Aus der Funktion der in dem Genlocus kodierten Proteine wird verständlich, dass deren Inaktivierung einen großen Wachstumsvorteil mit sich bringt.

Die beiden auf dem Chromosom 9p21 kodierten Proteine ($hp19^{ARF}$ und $p16^{INK4a}$) gehören zu der großen und immer weiter wachsenden Familie der Tumorsuppressorproteine. Sie sind in der Steuerung des Zellzykluses von entscheidender Bedeutung und interagieren mit p53, mdm2, Rb, Ras, und vielen anderen Zyklusregulatoren, in dem sie diese Faktoren steuern oder von ihnen selbst gesteuert werden. Somit können auch Funktionsveränderungen in diesem Netzwerk, das in normalen Zellen im Gleichgewicht befindliche System mit dem Resultat der Hyperproliferation und maligne Transformation der Zellen beeinflussen. Diese werden in den folgenden Abschnitten besprochen.

$hp19^{ARF}$ und $p16^{INK4a}$ sind an den so genannten p53- und Rb-Wegen der Tumorsuppression während des Zellzyklusablaufs beteiligt.

Der durch $hp19^{ARF}$ hervorgerufene Zellzyklusarrest ist jedoch im Gegensatz zu $p16^{INK4a}$ CDK-unabhängig. Das Protein ist aufgrund seiner vielfältigen Wechselwirkungen in der Lage, den Zellzyklusablauf an zwei verschiedenen Punkten zu unterbinden: 1.) an dem Übergang von der G1- in die S-Phase und 2.) am Übergang zwischen der G2- und der M-Phase.

Dabei gilt das $hp19^{ARF}$ als der direkte Inhibitor von mdm2, einem Onkogen, dessen Funktion in der proteolytischen und transkriptionellen Inaktivierung von p53 besteht, und das von p53 selbst transkriptionell aktiviert wird (= negativer Rückkopplungseffekt zur Verhinderung von unbeabsichtigter Apoptose) [Haupt et al., 1997; Momand et al., 1992; Barak et al., 1993]. So erfüllt $hp19^{ARF}$ die Rolle eines zwar indirekten, über mdm2 vermittelten, aber sehr potenten Protektors der p53-Funktion [Quelle et al., 1995].

P53 ist normalerweise in seinem aktiven Wildtyp intranukleär lokalisiert. Für den Prozess der Degeneration muss es von mdm2 aus dem Kern an die entsprechenden zytoplasmatischen Proteosomen exportiert werden, dieser Vorgang wird auch „Shuttling“ genannt. An genau diesem Punkt entfaltet $hp19^{ARF}$ seine Wirkung. Nach neueren Erkenntnissen scheint dieses auch intranukleär liegende Protein (es befindet sich im Nukleolus) den durch mdm2 bewirkten zytoplasmatischen Export von p53 zu blockieren, in dem es den Wechsel von mdm2 zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleoplasma hemmt [Tao et al., 1999]. Auf diese Weise wird ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase erreicht.

$p16^{INK4a}$ hingegen wirkt sich über die Blockade der Phosphorylierung des Rb-Proteins auf den Zellzyklus aus (siehe Abb. 34). Dies geschieht in dem $p16^{INK4a}$ das D1-Cyclin hemmt, welches seinerseits in normalen Zellen, oder durch den Einfluss diverser mitogener Faktoren, die cyclin-abhängige Kinase 4 aktivieren und damit die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) bewirken würden [Sherr, 1996]. Das Rb-Protein gehört zu den sehr potenten Inhibitoren des Zellykluses (Tumorsuppressorprotein, das bei allen Kindern mit einem Retinoblastom inaktiviert vorliegt [Kulozik et al., 2000]). Sein Restriktionspunkt liegt am Übergang von der G1- in die S-Phase. In der phosphorylierten Form ist es jedoch funktionslos, dies zu verhindern ist die Hauptwirkung von $p16^{INK4a}$ [Weintraub et al., 1992].

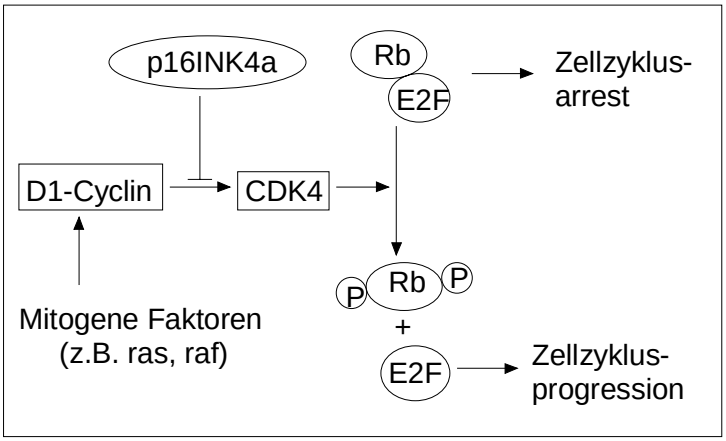


Abb. 34 Wirkungskette bei der Phosphorylierung des Rb-Proteins

Die einzelnen Stationen dieser Effektkette von $p16^{INK4a}$ bis hin zu Rb sind in vielen humanen Karzinomen von diversen Defekten sowohl der kodierenden Gene als auch der Proteine betroffen (siehe Abschnitt 2.).

2. $p16^{INK4a}$ als einer der grundlegenden Bausteine in der humanen Karzinogenese

$p16^{INK4a}$ ist ein von Serrano et al. 1993 identifiziertes Protein, das auf Chromosom 9p21 (in 3 Exons) kodiert wird. Seine Funktionsweise wurde in der Blockade des Zellzyklus am G1/S-Übergang über die Hemmung von CDK4 definiert [Serrano et al., 1993]. Seinen Einfluss auf den Zellzyklus entfaltet es über die Blockade der Rb-Hyperphosphorylierung. In einigen Untersuchungen zur Bedeutung des Proteins für die Tumorsuppression konnte seine p53-unabhängige Position aufgezeigt werden (in Zellen mit einem viralen Onkoprotein E6, welches das p53 blockiert, entfaltet $p16^{INK4a}$ nach wie vor seine Wirkung), jedoch ist seine Integrität auf ein funktionsfähiges Rb-Protein angewiesen [Zhu et al., 1999].

Vielfältige Studien des Proteins, seines Genlocus, sowie seiner Wirkungsachse im Zusammenspiel mit CDK4 ergaben, dass es eine Schlüsselrolle bei der Progression humaner Karzinome spielt [Kamb, Gruis et al., 1994]. Das INK4a-Gen zeigt dabei in den humanen Tumoren eine Mutationsfrequenz, die mit der von p53 vergleichbar ist. Ansehnlich ausgeprägt schien seine Involvierung in der Entstehung humaner Melanome vom familiären Typ [Wolfel et al., 1995; Zuo et al., 1996]. Dabei spielen verschiedene Arten von Defekten eine Rolle, die zum Teil eine gewisse Zugehörigkeit zu bestimmten Tumorarten aufweisen. Es kommen homozygote Deletionen, inaktivierende Promotor-Methylierung, Punktmutationen sowie Keimbahnmutationen vor. Die letzteren sind besonderes bei familiären Melanomen, mit einer Auftretenshäufigkeit von bis zu 50%, als der prädisponierende Faktor propagiert worden [Hussussian et al., 1994]. In der neusten Zeit unterlagen diese Ergebnisse jedoch kontroversen Diskussionen. Der Grund dafür liegt wohl in der Art und Weise, in der die Patientenauswahl für die damaligen Studien stattfand. Neuere Erkenntnisse belegen, dass nur etwa 20% der familiären malignen Melanome in Verbindung mit Mutationen des $p16^{INK4a}$-Gens zu setzen sind [FitzGerald et al., 1996; Bataille 2000]. Betrachtet man, dass etwa 5-10% aller malignen Melanome weltweit einen familiären Charakter besitzen, so ergibt sich für die restlichen sporadischen, malignen Melanome theoretisch eine $p16^{INK4a}$-Muationsinzidenz von etwa 0,02%, also nicht sonderlich viel um von einer engen Verbindung sprechen zu können. So nimmt die früher stark vertretene Bedeutung des $p16^{INK4a}$-Gens als das Melanom-Empfindlichkeitsgen [Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994] immer mehr ab. Es werden Überlegungen aufgestellt, dass entweder andere Gene (z.B. das PTEN [Rowan et al., 1999]) bzw. komplexe Gen-Gen-Interaktionen, in die $p16^{INK4a}$ involviert ist und die noch nicht vollständig verstanden sind, die Schlüsselrolle in der Pathogenese sporadischer Melanomen besitzen [Bataille, 2000]. So scheint nach neuen Erkenntnissen das $hp19^{ARF}$ einen gewissen Einfluss auf den $p16^{INK4a}$/Rb-Signalwege zu nehmen (siehe Abschnitt 3.1.1).

Interessanterweise wird dem $p16^{INK4a}$ aber doch noch ein wichtiger Einfluss bei der Progression des Melanoms beigemessen. Mit dem Fortschreiten der Tumorentwicklung wurde nämlich mehrfach eine fehlende Expression des Gens, oft assoziiert mit dem Verlust der Heterozygotie (LOH) im 9p21-Locus, gefunden [Healy et al., 1998; Grover et al., 1998]. Es liegen auch Ergebnisse vor, laut denen nahezu 40% der Naevi in Verbindung mit mutagenen Veränderungen des $p16^{INK4a}$-Gens stehen [Zhu et al., 1999].

Zwar mag die Beteiligung des INK4A-Locus bei den Melanom-Erkrankungen nicht eindeutig geklärt sein, aber in anderen Karzinomen spielt es aufgrund der Frequenz und Art, mit der seine Mutationen vorkommen, immer noch eine interessante Rolle.

Verschiedene Mutationstypen können zu der Entstehung von Malignomen führen. Ihre Mannigfaltigkeit kann das Gen und/oder Protein in vielerlei seiner Funktionen betreffen.
Homozygote Deletionen stellen den größten Anteil der gefundenen Genaberrationen dar, gefolgt von diversen Punktmutationen, bei denen meistens Basensubstitutionen mit folgendem Aminosäurenaustausch vorkommen oder neue Stopkodons und damit verkürzte Proteinsequenzen entstehen. Die erwähnten Keimbahnmutationen betreffen immer das Exon 1α und haben damit ausschließlich Auswirkungen auf $p16^{INK4a}$ ohne das $hp19^{ARF}$ zu berühren. Sie wurden meistens in Bezug auf familiäre, maligne Melanome festgestellt, haben aber auch bei familiären Adenokarzinomen des Pankreas eine bedeutsame Position [Sharpless et al., 1999].
Zu den interessanten Mutationen, die auch für Pathogenese familiärer, maligner Melanome von Bedeutung sein könnten, sind die in dem für die Bindungsfähigkeit des $p16^{INK4a}$-Proteins an CDK4 kodierendem Genbereich. Eher selten zu finden sind die Fälle, bei denen nicht das Gen mutiert ist, sondern sein Promotor methyliert wird, so dass die Transkription nicht sachgemäß ablaufen kann.
Die untere Tabelle 8 bietet eine Übersicht der Karzinome mit vorhandenen $p16^{INK4a}$-Mutationen.

Tumorart	*Mutationsart*	*Arbeitsgruppe*	*Mutationsfrequenz*
Melanom Primärtumor	PM	Gruis et al.	14%
Zelllinie	PM, HD	Gruis et al.	60%
Primärtumor	HD	Ruiz et al.	20%
familiäres Melanom	HD, PM	FitzGerald et al.	18%
	HD	Flores et al.	21%
sporad. dysplast. Naevus	HD	Lee et al.	75%
Pankreas Primärtumor	PM, HD	Rozenblum et al.	80%
Zelllinie	PM, HD	Rozenblum et al.	88%
Osteosarkom	PM, HD	Patino-Gercia et al.	6%
	HD, PR	Tsuchiya et al.	19%
Ewing-Sarkom	PM, HD	Kovar et al.	37%
	HD, Me	Tsuchiya et al.	17%
Blasen-Karzinom	PM	Gruis et al.	12%
	PM	Sorlie et al.	6%
Astrozytom	PM, HD	Tsuzuki et al.	30%
Akute Lymphoblasten-Leukämie	PM, HD	Faderl et al.	40%
Gliom	PM, HD	Ishii et al.	64%
Mamma-Ca	PM, Me	Brenner et al.	48%
Non-Hodgkin-Lymphom	PM, HD, Me	Villuendas et al.	37%
Spinaliom	PM	Soufir et al.	24%
Basaliom	PM	Soufir et al.	3,5%
Hepatozelluläres Karzinom	PM, HD, Me	Jin et al.	60%

Tab. 8 Zusammenstellung einiger Tumorarten mit $p16^{INK4a}$-Involvierung (PM=Punktmutation; HD=homozygote Deletion; Me=Promotormethylierung)

Aber nicht nur das $p16^{INK4a}$-Gen stellt einen wichtigen Faktor in der Tumorentwicklung dar. Als Tumorsuppressorprotein ist es in einen komplexen Schaltkreis eingebunden (siehe Abb. 33 und 34), dessen Mitglieder auch von verschiedenen Funktionsverlusten mit der Folge des Tumorwachstums betroffen sein können.

Das am besten bekannte Element dieser Wirkungskette ist das Rb-Protein, ein Tumorsuppressorprotein, das als der fundamentale Faktor bei der Entstehung von

Retinoblastomen identifiziert wurde. Aber auch in anderen Tumortypen scheint es eine große Bedeutung zu haben bzw. wird in diesen häufig mutiert vorgefunden. Folgende Tabelle (Tabelle 9) präsentiert einen kurzen Überblick der wichtigsten Mitglieder des $p16^{INK4a}$-Rb-Signalweges, entsprechend der Abbildung 34, und die Tumorerkrankungen, in denen sie vorzugsweise mutiert vorkommen.

Gen / Protein	*Mutationsart*	*Tumorerkrankung*
$p16^{INK4a}$	Deletionen	Gliome, siehe auch Tab 2.1.
	Punktmutationen	Sarkome, ALL
	Promotormethylierung	familiäre maligne Melanome
D1-Cyclin	Translokationen	Nebenschilddrüsenadenome, Oesophagus-Ca, Blasen-Ca, Mamma-Ca,
	Amplifikationen	Karzinome im Kopf-Hals-Bereich
CDK4	Amplifikationen	Sarkome, Gliome, familiäre maligne Melanome
Rb	Deletionen	Sarkome, kleinzelliges Bronchial-Ca, Osteosarkome, Hämatop.-Neoplasien
	Punktmutationen	Blasen-Ca, Prostata-Ca, Zervix-Ca,
	Inaktivierung durch E7-Onkoprotein	familiäres Retinoblastom

Tab. 9 Übersicht der Mutationsarten der $p16^{INK4a}$-Rb-Signalweg-Mitglieder mit den zugehörigen Tumoren

Interessanterweise sind Karzinome, bei denen das $p16^{INK4a}$ und Rb im selben Tumor gleichzeitig von Mutationen betroffen bzw. inaktiviert sind sehr selten. Dies mag wohl daran liegen, dass beide an derselben Signalkette beteiligt sind, und eine derartige Mutation, die $p16^{INK4a}$ und Rb gleichzeitig inaktiviert, für das Tumorwachstum keinen Vorteil bedeuten würde.

So kontrovers die heutigen Forschungsresultate in Bezug auf maligne Melanome auch sein mögen, scheint eine abschliessende Bewertung noch nicht möglich zu sein, da die ständig erweiternden Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren noch nicht komplett

entschlüsselt worden sind. So wurde beispielweise davon ausgegangen, dass die Funktionswege von $p16^{INK4a}$ und $hp19^{ARF}$ voneinander völlig unabhängig sind, doch die neueren Untersuchungen deuten auf eine Involvierung von $hp19^{ARF}$ in den Rb-Signalweg, über mdm2, E2F, myc und andere Faktoren. Deshalb sollen diese Zusammenhänge, zumindest ansatzweise, im Hinblick auf diese Dissertationsarbeit besprochen werden.

3. $hp19^{ARF}$ in seiner Beziehung zur Entstehung maligner Tumoren

Seit seiner Entdeckung wurde der INK4a-Locus (Chromosom 9p21) intensiv erforscht, da er die kodierenden Sequenzen für mehrere Tumorsuppressorgene birgt. Seine Bedeutung in der Tumorentwicklung nahm noch mehr zu, als Quelle et al. 1995 ein β-Transkript des Locus, das $hp19^{ARF}$ entdeckten. Auch seine Funktion wurde in der Tumorsuppression definiert, jedoch auf eine von $p16^{INK4a}$-differente Art, nämlich über p53 und nicht Rb [Quelle et al., 1995b]. Folgerichtig kam die Überlegung über den Einfluss von $hp19^{ARF}$ in der Entstehung maligner Tumoren auf.

In diesem Sinne wurde eine Vielzahl von Studien und Experimenten mit der Frage über die Beteiligung von $hp19^{ARF}$ in der Karzinogenese verschiedener Tumoren durchgeführt. Deren Ergebnisse brachten jedoch mehr Fragen als Antworten auf, da die Wechselwirkungen des Proteins/Gens komplexer zu sein scheinen als anfangs gedacht.

Aufgrund seiner Beziehung zu $p16^{INK4a}$, welches lange Zeit als „das Melanom-Gen“ propagiert worden ist [Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994] (zumindest bei familiären Melanomerkrankungen), wurde die Frage über die Position von $hp19^{ARF}$ bei dem malignen Melanom ein wichtiger Aspekt bei der Erforschung seiner Pathogenese.

In Bezug darauf wurden während dieser Dissertationsarbeit einige Zelllinien aus malignen Melanomen und Metastasen maligner Melanome auf mögliche Gen- und Protein-Expressionsmängel von $hp19^{ARF}$, sowie die Proteinexpression *in situ* anhand von immunhistochemischen Färbungen analysiert.

Aufgrund früherer Untersuchungen kam es in der letzten Zeit zu kontroversen Diskussionen über $hp19^{ARF}$ als den pathogenen Faktor der Karzinogenese. Die vorgelegten Ergebnisse über Frequenz und Art der gefundenen Mutationen bzw. Proteinverluste, sobald solche überhaupt gefunden wurden, wichen sehr stark voneinander ab [Bataille 2000; Chin et al., 1998].

Insbesondere in Bezug auf Melanome gehen die Meinungen sehr weit auseinander. Wie aus

den Resultaten jüngster zahlreicher Studien zu entnehmen ist, sind nur sehr wenige Mutationen des hp19^{ARF}-Gens gefunden worden: Larsen et al. (1996) fanden Mutationen des Exon-1β in zwei Melanom-Zelllinien, auch Kumar et al. (1998) fanden solche Mutationen in zwei Melanom-Zelllinien. Spezifische Mutationen des hp19^{ARF}-Gens sind eher rar und lassen die Spekulationen aufkommen, dass sie weder in familiären noch in sporadischen malignen Melanomen zu den prädisponierenden Faktoren gezählt werden könnten.

Diese Vermutung würde sich auch im Hinblick auf die Ergebnisse unserer *in-vitro*-Untersuchungen von hp19^{ARF} ergeben, da weder in RT-PCR (mit anschließender Sequenzanalyse) Gen-Mutationen oder Gen-Minderexpressionen, noch in Western-Blot Protein-Expressionsverluste (als Hinweis auf eine mögliche Translationsbeeinträchtigung) gefunden werden konnten. Ob sie allerdings auch für die *in-vivo*-Verhältnisse zutrifft sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, da bei unseren *in-situ*-Experimenten ein tendenzieller Proteinverlust gezeigt werden konnte.

In der folgende Tabelle 10 werden einige Studien über hp19^{ARF} Genmutationen bzw. Protein-Expressionsverluste im malignen Melanom mit ihren Resultaten zusammengefasst.

Melanomtyp	*Arbeitsgruppe*	*Anzahl untersuchter Tumore*	*Anzahl gefundener hp19^{ARF}-Mutationen*
sporad., primäres MM	Peris et al. 1999	10	0
primäres MM	Ruiz et al. 1998	48	1
familiäres MM	Flores et al., 1997	48	0
familiäres MM	Fargnoli et al. 1998	10	0
familiäres MM	Liu et al. 1997	?	0
familiäres MM	FitzGerald et al. 1996	33	0
Zelllinie von MM	Kumar et al. 1998	5	2
uveales MM	Soufir et al. 2000	155	0
sporad., primäres MM	Kumar et al 1999	45	?

Tab. 10 Auflistung einiger Studien über das maligne Melanom in Bezug auf hp19^{ARF}-Mutationen (MM- malignes Melanom; ?-Anzahl nicht eruierbar)

Vielfältige Experimente ergaben, dass nur spezifische Mutationen des Exon-1β bzw.

Beeinträchtigungen der amino-terminalen Domäne des Proteins zu einem Funktionsverlust von $hp19^{ARF}$ führen können [Chin et al., 1998; Sharpless et al.,1999]. Aufgrund der chromosomalen Gegebenheiten zwischen $p16^{INK4a}$ und $hp19^{ARF}$, sind die ersten Exons der beiden voneinander völlig verschieden, hingegen wird das zweite Exon von beiden geteilt durch alternative Transkription beiden gemeinsam. Im Exon-1β wird die biologische Aktivität des $hp19^{ARF}$-Proteins kodiert, die für seine Funktion als Zellzyklus-Inhibitor, vorzugsweise durch die Bindung an mdm2, unablässig ist [Quelle et al., 1997; Kamijo et al., 1998]. Derartige spezifische Genaberrationen im Exon-1β konnten auch bei unseren Sequenzanalysen der Melanom-Zelllinien nicht gefunden werden, so dass von diesem Standpunkt aus von einer erhaltenen Integrität des Gens *in vitro* ausgegangen werden kann, und mögliche Störungen auf anderen Ebenen zu suchen sind (Protein, Signalweg-Transduktion).

Folglich sind Mutationen des INK4a-Locus, die Exons 2 und/oder 3 betreffen, für die $hp19^{ARF}$-Funktion belanglos [Serrano et al., 1996]. Diese sind jedoch sehr häufig bei den für $p16^{INK4a}$ beschriebenen Anomalien vorzufinden, und führen zu dessen Funktionsverlust mit einer resultierenden Unzulänglichkeit des Rb-Signalweges und dem Tumorwachstum.

Vielfältige Mutationsanalysen des INK4a-Locus ergaben, dass zwar deren Frequenz mit der von den p53-Aberrationen vergleichbar ist, jedoch darin die $p16^{INK4a}$–Veränderungen überwiegen und kaum Mutationen zu finden sind, die exklusiv $hp19^{ARF}$ betreffen ohne das α-Transkript mit einzubeziehen [Sharpless et al., 1999].

Die Konsequenzen einer spezifischen Mutation von $hp19^{ARF}$ im Exon-1β sind schwerwiegend, und in einem breiten Tumorspektrum mit erhöhter Sensibilität gegenüber karzinogenen Substanzen wiederzufinden. Die Auswirkungen dieser Mutationen liegen in der Schwächung der Hauptfunktion von $hp19^{ARF}$, nämlich der Einleitung des Zellzyklus-Arrestes über die Blockierung der mdm2-bedingten p53-Degeneration (mdm2 ist bis jetzt das einzige bekannte Protein welches direkt mit $hp19^{ARF}$ wechselwirkt). Hierfür muss das $hp19^{ARF}$ im Nukleolus an das mdm2 über bestimmte Domänen binden. In diesem Sinne ergeben sich hypothetische Mutationsmuster, die z.B. die Unfähigkeit des $hp19^{ARF}$ mit mdm2 zu interagieren, oder Defekte in den amino- und carboxy-terminalen Proteinabschnitten, die für die nukleoleäre $hp19^{ARF}$-Lokalisation essentiell sind.

Möglich wären auch Veränderungen in der Promotor-Region des $hp19^{ARF}$-Gens (z.B. Promotormethylierung), wie sie auch schon bei $p16^{INK4a}$ beschrieben worden sind, oder andere noch nicht bekannte Anomalien des Translationvorganges, die nicht direkt das Gen betreffen, jedoch zu einer fehlenden Proteinexpression führen. Es gibt vereinzelte Berichte,

bei denen zwar das Gen in der RT-PCR nachgewiesen werden konnte, dagegen die proteinchemische $hp19^{ARF}$-Bestätigung negativ ausfiel [Gazzeri et al., 1998; Dell Valle et al., 1997]. Dies würde neuartige Störungs-, Entkopplungsprozesse der mRNA-Translation voraussetzen, z.B. Anomalien der mRNA-Stabilität, beschleunigte Proteolyse oder neue, unbekannte Faktoren die das Protein hemmen. Solche konnten bei den *in-vitro*-Experimenten zu dieser Dissertationsarbeit zwar nicht beobachtet werden, wären jedoch für die *in-situ*-Verhältnisse durchaus von Bedeutung, da ein Proteinverlust in einer Reihe von Proben festgestellt werden konnte. Da bedauerlicherweise keine RT-PCR-Experimente am Gewebe betroffener Patienten durchgeführt werden konnten, bleiben sie nur als hypothetische Vermutungen und werden als solche in weiteren Teilen diskutiert.

Bei der Suche nach der Rolle von $hp19^{ARF}$ in der Karzinogenese wurden einige Mausmodelle erstellt, bei denen exklusiv das Exon-1β mutiert war. Die Phänotyp-Analysen ergaben mehr Ähnlichkeiten mit dem von Tieren, die Mutationen in Exons-2/3 von INK4a besaßen, als mit denen, die p53-Anomalien aufwiesen [Donehower, 1992], obwohl man primär vom Gegenteil ausgehen würde, da es beim Funktionsverlust von $hp19^{ARF}$ zu einer Entkopplung der mdm2-vermittelten p53-Degeneration kommt.

Das bei spezifischen $hp19^{ARF}$-Mutationen (Exon-1β) beobachtbare Tumorspektrum (s. Tab. 11) ist sehr ausgedehnt und beinhaltet bösartige Tumoren unterschiedlicher Aggressivität ohne Gewebsspezifität oder Altersabhängigkeit.

Tumorart	*Arbeitsgruppe*	*Anzahl untersuchter Tumore*	*Anzahl gefundener hp19^{ARF}-Mutationen*
Mesotheliom	Yang et al. 2000	11	10
Lymphobl. Leukämie	Faderl et al. 1999	42	0
Mamma-Karzinom	Brenner et al. 1996	18	0
Mamma-Karzinom	Kannan et al. 2000	?	0
Gliom	Ishii et al. 1999	34	22
Gliom	Tachibana et al. 2000	15	1
Glioblastom	Fulci et al. 2000	29	15
Astrozytom	Tsuzuki et al. 1996	23	5
Osteosarkom	Patino-Garcia et al. 1997	74	5
Osteosarkom	Tsuchiya et al. 2000	30	2
Ewing-Sarkom	Tsuchiya et al. 2000	24	3
Ewing-Sarkom	Kovar et al. 1997	27	8
Magen-Karzinom	Iida et al. 2000	7	5
Hepatozell. Karzinom	Jin et al. 2000	20	2
Pancreas-Karzinom	Rozenblum et al. 1997	40	24
Blasen-Karzinom	Sorlie et al. 1998	21	1
Blasen-Karzinom	Gruis et al. 1995	33	0
Blasen-Karzinom	Gruis et al. 1995	33	0
T-ALL	Gardie et al. 1998	RNA-Express. (+), aber Protein-Express. (-)	
kleinzell Bronchial-Ca	Gazzeri et al. 1998	RNA-Express. (+), aber Protein-Express. (-)	

Tab. 11 hp19^{ARF}-Mutationsanalyse in verschiedenen Tumorgeweben ([?] = aus vorliegender Literatur nicht eruierbare Anzahl)

In der Beeinträchtigung der Genexpression müssen allerdings nicht immer die für das Protein kodierenden Sequenzen betroffen sein. Auch Einflüsse, die sich auf die Promotorregion des Gens auswirken, z.B. Promtormethylierung (für hp19^{ARF} bisher noch nicht beschrieben) oder Verluste von Transkriptionsfaktoren können zu einer Inaktivierung des Gens führen. In der letzten Zeit ist ein hp19^{ARF}-Transkriptionsfaktor identifiziert worden, das DMP1 [Inoue et al., 2000]. Die Deaktivierung dieses Faktors ist in manchen Tumoren denkbar und wurde in Mausmodellen dargestellt. In Folge dessen waren die Tiere in ihrer Entwicklung stark

retardiert und entwickelten spontane Karzinome, beachtlich war jedoch die enorm gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber karzinogenen Reizen. In Zelllinien, die einen DMP1-Verlust aufwiesen, war eine Hemmung des Alterungsprozesses festzustellen [Inoue et al., 2000]. Diese Erkenntnisse suggerieren einen neuen Aspekt in der Beziehung von $hp19^{ARF}$ zur humanen Karzinogenese. Es ist aber zu beachten, dass der Verlust des DMP1-Transkriptionsfaktors zu einer deutlichen Verminderung des $hp19^{ARF}$-Proteins führt [Inoue et al., 2000], die sicherlich mit proteinchemischen Verfahren zu eruieren ist. Dies war zwar in unseren Experimenten mit den Melanomzelllinien nicht der Fall, da in allen das Protein nachweisbar war, theoretisch könnte es jedoch in den Tumoren, die in den immunhistochemischen Färbungen negative Resultate lieferten, als pathogenetischer Faktor eine Rolle spielen.

Wie man den Daten entnehmen kann, scheinen Aberrationen von $hp19^{ARF}$ doch eine Rolle bei der Karzinogenese zu spielen, obwohl sie wegen der Rarität, in ihrer Bedeutung als der ausschlaggebende Faktor von manchen Autoren immer noch angezweifelt werden [Chin et al., 1998]. Doch nicht $hp19^{ARF}$ selbst muss in seiner Integrität beeinträchtigt sein, um Tumore entstehen zu lassen. Da es mit vielen anderen wichtigen zellulären Faktoren interagiert, wäre es möglich, dass die einflussnehmenden Ereignisse unterhalb bzw. oberhalb von $hp19^{ARF}$ stattfinden. Die folgenden Abschnitte liefern einige Ansätze über tumorfördernde Beeinträchtigen des zellulären Signalweges, in den $hp19^{ARF}$ involviert ist.

3.1. Karzinogene Wechselwirkungen des $hp19^{ARF}$-Signalweges

Mutationen des $hp19^{ARF}$-Gens sind bislang nur in Einzelfällen nachgewiesen worden, und nur in wenigen Tumoren als evtl. pathogener Faktor anzusehen, dennoch bietet der Signalweg, in den das $hp19^{ARF}$ eingebunden ist, über seine Mitglieder eine Reihe von möglichen Angriffspunkten auf dem Pfad der Karzinogenese. Wie schon in der Abbildung 33 dargestellt, sind die Zusammenhänge in der Proliferationskontrolle sehr komplex und für die meisten der beteiligten Faktoren wurden Tumorwachstum-fördernde Veränderungen beschrieben.

3.1.1. $hp19^{ARF}$-p53-Funktionsachse

Der bekannteste Vertreter dieses Netzwerks ist wohl p53, „the guardian of the genome“, es

reagiert auf DNA-Streß und/oder mitogene Einflüsse mit der Einleitung des Zellzyklus-Arrestes in der G1-Phase oder bei irreparablen Schäden mit dem Anstoß der Apoptose. Die Integrität von p53 ist an ein funktionsfähiges $hp19^{ARF}$ gekoppelt (und umgekehrt), da dieses die mdm2-vermittelte Proteolyse von p53 verhindert [Kamijo et al., 1998; Serrano et al., 1996]. Somit ist die p53-Funktion auf das Gleichgewicht zwischen mdm2 und $hp19^{ARF}$ angewiesen.

Das p53 gehört in der humanen Karzinogenese zu den wohl am häufigsten involvierten Tumorsuppressorgenen, seine Mutationen sind in mehr als 50% aller Tumore in über 50 verschiedenen Gewebearten bekannt [Levine et al., 1997]. In Bezug auf Hauttumore (Basaliome, Spinaliome) sind sogar UV-typische Veränderungen (CC:TT-Transitionen) beschrieben worden (UV-Strahlung ist einer der Hauptfaktoren bei der Melanomentstehung), jedoch spielt das p53 in der Pathogenese von malignen Melanomen nach allgemeiner Meinung keine Rolle [Papp et al., 1996; Lubbe et al., 1994]. So kann von Anomalien in der Interaktion zwischen $hp19^{ARF}$ und p53 bei der Melanom-Pathogenese nicht gesprochen werden.

Anfangs wurde davon ausgegangen, dass die $hp19^{ARF}$-Funktion streng an p53 gebunden ist, da bei der Ausschaltung von p53 eine $hp19^{ARF}$-Überexpression zu verzeichnen war, die sich durch die Reinduktion von p53 rückgängig machen ließ [Quelle et al., 1995b]. Doch Resultate weitergehender Forschungen belegen eine zumindest teilweise p53-unabhängige $hp19^{ARF}$-Funktionsweise, mit der Vermutung, dass es über das mdm2 mit dem Rb-Protein interagieren, und damit auf den $p16^{INK4a}$-Signalweg Einfluss nehmen kann. Denn sobald beide Rb und p53 in den Zellen degeneriert werden, erlischt die Funktion von $hp19^{ARF}$. Wird aber eines der Gene wieder reinduziert so entfaltet $hp19^{ARF}$ erneut sein volle antiproliferative Wirkung [Carnero et al., 2000].

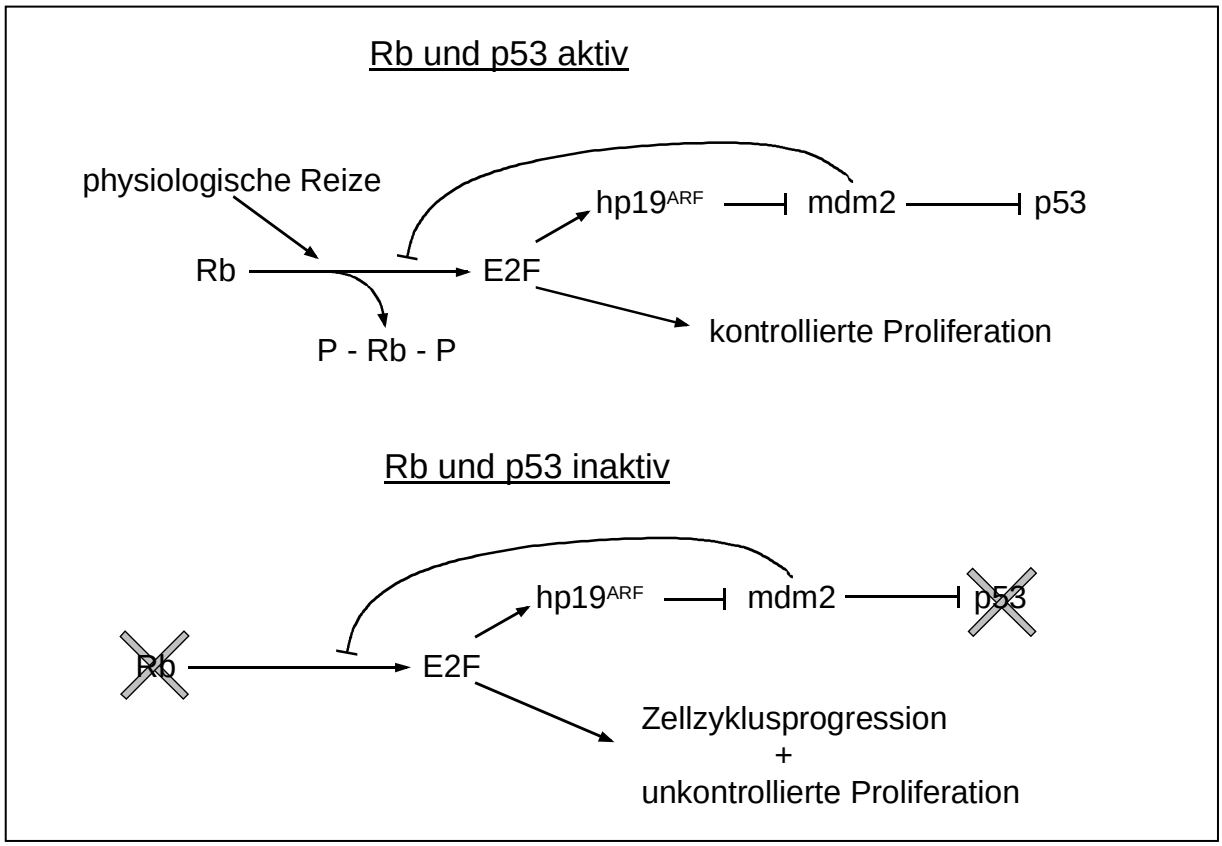


Abb. 35 Zellproliferation in normalen Zellen und nach Inaktivierung von Rb und p53.

Diese Erkenntnisse machen das Verständnis der Zusammenhänge nicht unbedingt leichter, eröffnen jedoch neue Möglichkeiten bei der Grundlagensuche der Karzinogenese. Denn es wäre durchaus denkbar, dass trotz der Anwesenheit von $hp19^{ARF}$, wie dies in unseren Experimenten an den Zelllinien der Fall war, dieses aufgrund von Verlusten von Rb oder p53 seine tumorsuppressive Wirkung nicht entfalten kann.

Ähnliche Effekte könnten auch weitere Faktoren wie z.B. Onkogene aufweisen. Seit langem schon wird ihnen eine entscheidende Rolle bei Tumorentstehung beigemessen. Ihre Interaktionen mit verschiedenen zellulären Elementen sind teilweise bekannt, jedoch entstehen immer wieder neuartige Verknüpfungen, die neues Licht auf die Karzinogenese werfen. So wird auch in der letzten Zeit die bestehende Wechselwirkung zwischen Ras (einem Onkogen) und $hp19^{ARF}$ in Hinsicht auf Karzinomentstehung erforscht.

3.1.2. Einfluss von Onkogene auf hp19^{ARF}

Das hp19^{ARF} wird in seiner Funktion von verschiedenen Faktoren in unterschiedlicher Art und Weise gehemmt bzw. aktiviert.

Es wird eine inhibitorische Wirkung von mdm2 auf hp19^{ARF} diskutiert, die vielleicht in einigen Tumorarten, die eine mdm2-Überexpression in Verbindung mit p53-Verlusten aufweisen, eine Rolle spielen mag [Oliner et al., 1992].

Viel interessanter erscheint die neuerdings stark postulierte Verbindung zwischen hp19^{ARF} und onkogenen Faktoren, wie z.B. Ras. Ras und die ihm nachgeschalteten Kinasen (Raf, MEK, ERK) und Transkriptionsfaktoren (jun, fos, myc) gehören zu den Signaltransduktionselementen zwischen der Zellmembran und dem Zellkern. Sie vermitteln vorzugsweise Wachstums- und Differenzierungssignale. Kommt es aber zu einer onkogenen Mutation dieser Faktoren, werden sie überaktiv und veranlassen die Zelle zu ungebremster Proliferation und Entdifferenzierung. Nahezu 30% aller humanen Karzinome weisen onkogen verändertes Ras auf [Bos et al., 1989]. Auch im malignen Melanom sind entsprechende Ras-Mutationen vor allem in Form von UV-induzierten Pyrimidindimeren zu beobachten, doch ihr Einfluss bei der Melanompathogenese konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden [Ball et al., 1994; Veer et al., 1989].

In jüngsten Untersuchungen wurde beobachtet, dass onkogen mutiertes Ras zu einer hp19^{ARF}-Aktivierung führt, interessanterweise aktiviert es aber auch das mdm2 , also den Gegenspieler von hp19^{ARF} im Zellzyklusgeschehen [Ries et al., 2000; Groth et al 2000].

In der Abbildung 36 werden die Zusammenhänge schematisch kurz wiedergegeben.

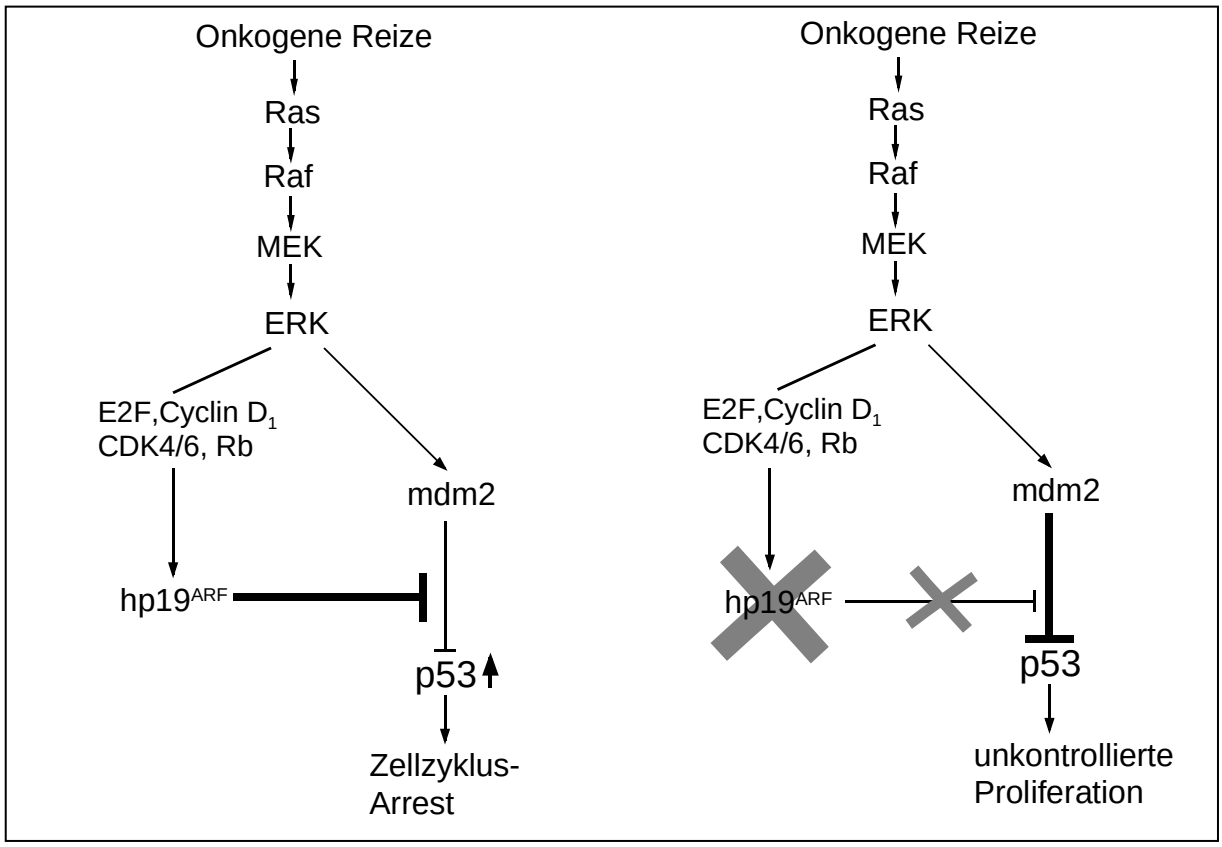


Abb. 36 Modell des regulatrischen Einflusses von hp19^{ARF} auf p53, in normalen Zellen (links) und Zellen mit hp19^{ARF}-Defizit (rechts).

Wie man der Abbildung entnehmen kann, werden in normalen Zellen beide sowohl das mdm2 als auch das hp19^{ARF} über die Ras-Signalkette aktiviert. Durch die inhibitorische Wirkung von hp19^{ARF} auf mdm2 wird die p53-Proteolyse angehalten, und eine Zellzyklus-Hemmung erreicht, so dass trotz des mutagen veränderten Ras keine unkontrollierte Zellproliferation stattfinden kann. Ganz anders verhält es sich in Tumorzellen, die sowohl eine mutierte Ras-Variante als auch einen hp19^{ARF}-Verlust aufweisen. In diesen Zellen kann Ras aufgrund der fehlenden mdm2-Hemmung und der daraus folgenden p53-Degeneration seine hyperproliferative Wirkung auf die Zellen entfalten. Somit kann man die Rolle von hp19^{ARF} folgerichtig mit dem Begriff des „onkogenen Zellschutzes“ beschreiben.

Wie schon erwähnt spielt mutiertes Ras auch in Melanomen eine wichtige Rolle (5-15% weisen ein onkogenes Ras auf), allerdings bedarf es, um seine proliferativen Effekte zu enthüllen, eines hp19^{ARF}-Verlustes. Dieser Sachverhalt könnte in Anbetracht dieser Arbeit bei den *in-situ*-Experimenten ebenfalls als denkbarer Faktor in Erwägung gezogen werden, und evtl. durch weitergehende Ras-Analysen geklärt werden.

Nun sind die erwähnten Mitglieder des hp19^{ARF}-Signalweges in unseren Experimenten nicht auf spezifische Mutationen/Dysregulationen näher untersucht worden, wie jedoch der vorangegangenen Darstellung zu entnehmen ist, sind ihre Wirkungen in der Mehrzahl an ein desintegriertes hp19^{ARF} gekoppelt. Diese Voraussetzung wurde zwar nicht bei den *in-vitro* jedoch durchaus bei den *in-situ*-Untersuchungen erfüllt, allerdings erfordert die endgültige Klärung weitere Analysen des Patientengewebes in Bezug auf die dargestellten Zusammenhänge zwischen den Faktoren.
Hinzu kommt noch die in jüngster Zeit festgestellte Verbindung zwischen den anfangs als getrennte Abläufe betrachteten p16^{INK4a}- und p19^{ARF}-Signalwegen [Quelle et al., 1995b; Stott et al., 1998], die über noch nicht komplett geklärte Zusammenhänge die Verhältnisse noch komplexer macht [Weber et al., 2000; Carnero et al.2000].

4. Ausblick

Das hp19^{ARF} nimmt aufgrund seiner Funktion als ein potentes Tumorsuppressorgen sicherlich eine wichtige Stellung im Prozeß der humanen Karzinogenese ein. Diese Tatsache belegen vielfältige Untersuchungen an diversen, menschlichen Tumorarten, die zum Teil Mutationen des Gens oder fehlende Proteinexpressionen aufweisen, hierzu gehören z.B. Mesotheliome, Neoplasien des hämatopoetischen Systems, Bronchial-Karzinome oder anaplastische Astrozytome [Yang et al., 2000].
In vielen Studien über das maligne Melanom, wie auch in dieser Dissertationsarbeit, konnten aber weder spezifische Mutationen des Gens, noch verminderte Expression des Proteins gefunden werden. Dies lässt an der Relevanz von hp19^{ARF} bei der Pathogenese dieser Tumorart Zweifel aufkommen lässt. Allerdings sollte zukünftig mehr zwischen den Verhältnissen *in vitro* und *in vivo* unterschieden werden. Wie unsere Ergebnisse zeigen, können sich *in vivo* aufgrund anderer Milieuverhältnisse durchaus Aberrationen des Gens und / oder Proteins ergeben, obwohl in den Zelllinien keinerlie Anomalien zu finden waren. Die dadurch neu aufkommenden Fragen über die Bedeutung von hp19^{ARF} in der Pathogenese von Tumoren könnten eventuell durch weitergreifende *in-situ*-Untersuchungen am Patientengut beantwortet werden.
Auch im Hinblick auf die Komplexität des Signalweges, in den hp19^{ARF} eingeschaltet ist, auf seine sich ständig erweiternden Interaktion mit Faktoren wie Ras, p53, Rb, mdm2, E2F, die

zum Teil noch nicht vollständig geklärten werden konnten, stellt sich die Frage über andere, in ihrer Rolle noch unbekannte Mitglieder/Zwischenstationen der Signalkette**,** die einen Einfluss auf das $hp19^{ARF}$ (hemmend oder aktivierend) nehmen und damit an der Entwicklung maligner Tumore von Bedeutung sein können. Ob und in welchem Ausmaß diese unbekannten Faktoren eine Rolle bei der Karzinogenese spielen, bedarf weiterer Forschungsarbeiten.

In Hinsicht auf die vorliegenden Ergebnisse scheint das $hp19^{ARF}$-Gen zwar nicht mehr der Anwärter für das "Melanom-Gen" zu sein, aber die Liste der möglichen Kandidaten, zu denen unter anderem die Chromosomen 1p36, 6q, 7p, 10q, 11q zählen, ist noch lange nicht vollständig eruiert und sollte künftig intensiver Erforschung unterworfen werden [Garbe, Dummer, Kaufmann, Tilgen; 1997]. In der Tat mag auch die weitere Erforschung des ungewöhnlichen INK4a-Locus auf dem Chromosom 9p21, in dem mittlerweile 3 verschiedene Proteine kodiert werden ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p19^{ARF}$), in Bezug auf Karzinomentstehung (maligne Melanome), noch weitere überraschenden Resultate liefern, womöglich beinhaltet es noch andere kodierende Sequenzen für noch unbekannte Proteine [Liu et al., 1997].
In Tumoren, bei denen mit großer Sicherheit eine Beteiligung des Gens an ihrer Entstehung nachgewiesen werden kann, stellt es einen interessanten Aspekt für die zukünftigen genetischen Therapiemöglichkeiten der Krebserkrankungen dar. So gelang es Yang et al. (2000) vor kurzem, durch die Einschleusung des $hp19^{ARF}$-Gens mittels eines adenoviralen Vektors in Mesotheliomzellen, die in über 70% der Fälle $hp19^{ARF}$-Mutationen aufweisen [Prins et al., 1998], deren Proliferation zu hemmen und damit eine Tumorregression zu bewirken [Yang et al., 2000].

VII. Literatur

Arap et al., 1997: "Functional analysis of the wild-type and malignant glioma derrived CDKN2Aß allels; evidence for an RB-independent growth suppressive pathway "
Oncogene 15, 2013-2020

Aberdam, Bertolotto, et al., 1998: "Involvement of microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein"
J Biol Chem 273; 19560-19565

Ball et al., 1994: "Ras mutations in human melanoma: a marker for malignant progression"
J Invest Dermatol 102; 285-290

Barak, Juven, Haffner et al., 1993: "Mdm2 expression in induced by wild type p53 activity"
EMBO J. 12, 461-468

Bataille, 2000: "Genetics in familial and sporadic melanoma"
Clinical and Experimental Dermatology 25; 464-470

Bergmann, Gruis, et al., 1994: "Genetics of seven Dutch familial atypical multiple mole-melanoma syndrome families: a review of linkage results including chromosomes 1 and 9."
J Invest Dermatol 103: 122s-125s

Becker, Meier, et al., 1989: "Proliferation of human melanomas in inhibited by antisense oligodesoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor"
EMBO J. 8; 3685-3691

Bodmer, 1994: "Cancer genetics"
BrMed Bull 50; 517-526

Bookstein und Allerd, 1993: „Recessive oncogenes"
Cancer 71; 1179-1186

Bos et al., 1989: “Ras oncogenes in human cancer: a review.“
Cancer Res. 49; 4682-4689

Boßerhoff A., 1996: „Charakterisierung von Wirkung und Regulation des Proteins MIA, melanoma inhibitory activity“
Dissertationsarbeit, Uni-Regensburg

Boukamp, Peter, Pascheberg, et al., 1995: „Step-wise progression in human skin carcinogenesis in vitro involves mutational inactivation of p53, Ras-H oncogene activation and additional chromosome loss.“
Oncogene 11; 961-969

Brugarolas et al., 1994: „Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency“
Nature 377, 552-557

Brenner et al. 1996: ”Preferential loss of expression of $p16^{INK4A}$ rather than $p19^{ARF}$ in breast cancer”
Clin Cancer Res. 2/12, 1993-1998

Caldas, Hahn, da Costa, Radston, Schutte et al. 1994: "Frequent mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma"
Nat Genet 8, 27-32

Cannon-Albright, Goldgar, Meyer, et al., 1992: “Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22”
Science 258; 1148-1152

Carnero et al., 2000: “$p16^{INK4A}$ and $p19^{ARF}$ act in overlapping pathways in cellular immortalization”
Nature Cell Biology 2, 148-155

Cairns et al., 1994: „Rates of p16 (mts1) mutations in primary tumors with 9p loss“
Science 265; 415-416

Chin, Pomerantz, Polsky, Jackobson, Cohen, Cordon-Cardo, Horner, De Pinho, 1997: "Cooperastive effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo"
Genes Dev 11: 2822-2834 (1997)

Chin et al., 1998: „The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene-two products-two pathways"
Trends Biochem. Sci. 23; 291-296

Clark, From, Bernardino, Mihm et al., 1969: "The histogenesis and biological behavior of primary human malignant melanomas of the skin."
Cancer Res 29; 705-727

Clark, Greene, Reimer, Ainsworth, et al., 1978: "Origin of familian malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. The B-K mole syndrome"
Arch Dermatol 114, 732-738

Clark, Elder, Guerry, et al., 1984: „A study of tumor progression: the precursor of superficial spreading and nodular melanoma"
Hum Pathol 15; 1147-1165

Clark, WH 1991: „Tumor progression and the nature of cancer"
Br J Cancer 64; 631-644

Cox, Aitchinson, Sirel, MacKie, et al., 1996: „Comparison between lentigo maligna melanoma and other histogenetic types of malignant melanoma of the head and neck. Scottish melanoma group"
Cancer 73; 940-944

Cowan, Halaban, et al., 1988: "Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas"
J Natl Cancer Inst 80; 1159-1164

Della Valle, Duro et al., 1997: "The human $p19^{ARF}$ protein is not detected in hemopoetic human cell lines that abundantly express the alternative beta transcript of $p16^{INK4A/MTS1}$ gene"
Oncogene 15(20), 2475-2481

Donehower, 1992: "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors"
Nature 356; 215-22

Drexler 1998: "Review of alternations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukaemia-lymphoma cells"
Leukemia 12; 845-859

Dracopoli, Alhadeff, et al., 1987: "Loss of heterozygosity at autosomal and x-linked loci during tumor progression in a patient with melanoma"
Canncer Res 47; 3995-4000

Dummer, Becker, Schwaaf, Leverkus, Moll, Brocker, 1995: „Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma."
Melanoma Res. 1995 Feb;5(1):67-8.

Duro, Bernard, Della Valle et al., 1995: "A new type of of $p16^{INK4A}$/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies"
Oncogene 11, 21-29

Eisen, Easty, Bennett, 1995: "The POU domain transcription factor Brn-2: elevated expression in malignant melanoma and regulation of melanocyte-specific gene expression."
Oncogene. 1995 Nov 16;11(10):2157-64.

Fang, Setaluri, 1999: „Role of Microphthalmia Transcription Factor in regulation of melanocyte differentiation marker TRP-1"
Biochem and Biophys Res Commun 256; 657-663

Faderl et al., 1999: " The prognostic significance of $p16^{INK4A}$/$p19^{ARF}$ and $p15^{INK4b}$ deletions in adult acute lymphoblastic leukemia"
Clin. Cancer Res. 7, 1855-1861

Fargnoli, Chimenti, Keller et al., 1998: "CDKN2a/p16INK4a mutations and lack of p19ARF involvement in familial melanoma kindreds"
J Invest Dermatol 111(6); 1202-1206

FitzGerald, Harkin, Silva-Arrieta et al, 1996: "Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: Analysis of a clinical-based population"
Pro Natl Acad Sci USA 6; 8541-8545

Flores, Pollock, Walke, Glendening, Lin, Palmer et al., 1997: "Analysis of the CDKN2A, CDKN2B and CDK4 genes in 48 Australian melanoma kindreds."
Oncogene 15(24); 2999-3005

Foley, Leonard, Engel, 1993
„Quantification of RNA using the polymerase chain reaction"
TIG 9; 380-384

Fountain, Karayiorgou, et al., 1992: "Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma"
Proc Natl Acad Sci USA 89; 10557-10561

Friedman, Rigel, et al., 1985: "The clinical features of malignant melanoma"
Dermatol Clin 3; 271-283

Fritsch, 1998: "Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas"
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1998

Fulci, Labuhn, Maier, Lachat, Hausmann, Hegi, Janzer et al., 2000: "p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma."
Oncogene 19(33); 3816-22

Garbe, Dummer, Kaufmann, Tilgen: "Dermatologische Onkologie"
Springer-Verlag 1997

Garbe, Orfanos, 1989: "Epidemiologie des malignen Melanoms in der Bundesrepublik Deutschland im internationalen Vergleich"
Onkologie 12'; 253-262

Gardie, Cayuela, Martini, Sigaux, 1998: "Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia."
Blood. 1998 Feb 1;91(3):1016-20.

Garland, Gorham, et al., 1992: „Could sunscreens increase melanoma risk"
Am J Public Health 82; 9614-615

Guan, Jenkins, Nichols, et al., 1994: "Growth suppression p18, a $p16^{INK4/MTS1}$ and $p14^{INK4/MTS2}$-related CDK6 inhibitor, correlates with wild type pRb function."
Genes Dev 8, 2939-2952

Gazzeri, Della Valle, Chaussade, Brambilla et al., 1998: "The human $p19^{ARF}$ protein encoded by the beta transcript of $p16^{INK4A}$ gene is frequently lost in small cell lung cancer"
Cancer Res 58(17), 3926-3931

Goldstein, Dracopoli, Vogel, Clark Jr., Tucker, et al., 1996: "Two-locus linkage analysis of cutaneous malignant melanoma/dysplastic nevi"
Am J Hum Genet 58; 1050-1056

Grover, Chana, et al., 1998: "Analysis of p16 protein in sporadic malignant melanoma"
Melanoma Res 8; 267-272

Groth, Weber, Willumsen, Sherr, Roussel, 2000: „Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D-dependent kinases."
J Biol Chem. 2000 Sep 1;275(35):27473-80.

Gruis, Velden, et al., 1995: “Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds”
Nat Genet 10; 351-353

Gruis, Weaver-Feldhaus, Liu, Frye, Eeles, et al., 1995: "Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression"
Am J Pathol 146; 1199-1206

Guo HB, Stoffel-Wagner B, Bierwirth T, Mezger J, Klingmuller D., 1995: “Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma.”
Eur J Cancer. 1995 Oct;31A(11):1898-902.

Hall, Peters et al., 1996: “Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer”
Adv Cancer Res 68

Hara K., 1993: “Melanocytic lesions in lymph nodes associated with congenital naevus.”
Histopathology. 1993 Nov;23(5):445-51.

Hara et al., 1996: ”Cooperative Effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span of human diploid fibroblasts, TIG-1”
Biochem Biophys Res Commun, 179, 528-534

Harning, Mainolfi, Bystryn, Henn, Merluzzi, Rothlein, 1991: “Serum levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in human malignant melanoma.”
Cancer Res. 1991 Sep 15;51(18):5003-5.

Harris, 1996: “p53, at the crossroads of molecular carcinogenesis and molecular epidemiology”
J Invest Dermtol Sympos Proc 1; 115-118

Hangaishi, Ogawa, Imamura et al., 1996: “Inactivation of multiple tumor suppressor genes involved in negative regulation of the cell cycle, MTS1/p16INK4a/CDNK2, MTS27p15INK4b, p53, and Rb genes in primary lymphoid malignancies”

Blood 87; 4949-4958

Haupt, Maya, Kazaz et al., 1997: "mdm2 promotes the rapid degradation of p53"
Nature 387; 296-299

He, Sparks, Rago, Hermeking, Zawel, da Costa, Morin, Vogelstein, Kinzler, 1998:
„Identification of c-MYC as a target of the APC pathway."
Science. 1998 Sep 4;281(5382):1509-12.

Healy, Belgaid et al., 1998: "Prognostic significance of allelic losses in primary melanoma"
Oncogene16; 2213-2218

Herlyn et al., 1996: "Activated ras. Yet another player in melanoma?"
Am J Pathol 149; 739-744

Hollstein, Sidransky et al, 1991: „p53 mutations in human cancer"
Science 253; 49-53

Hornef, Lux, Rassner, 1992: "Neuron specific enolase (NSE) - a suitable tumor marker in malignant melanoma?"
Hautarzt. 1992 Feb;43(2):77-80.

Horikoshi, Ito, Wakamatsu, Onodera, Eguchi, 1994: "Evaluation of melanin-related metabolites as markers of melanoma progression."
Cancer. 1994 Feb 1;73(3):629-36.

Hsu et al., 1981: "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunperoxidase techniques: a comparsion between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure"
J Histochem Cytochem 29; 577

Hudson, Krige et al., 1993: "Plantar melanoma in black souzh africans"
Surg 80; 992-99)

Hussussian, Stuewing, Goldstein, 1994: "Germline p16 mutations in familial melanoma"
Nature Genet 8; 15-21

Iida, Akiyama, Nakajima, Ichikawa, Nihei et al., 2000: "Alterations and hypermethylation of the p14(ARF) gene in gastric cancer."
Int J Cancer 87; 654-8

Inoue, Wen, Rehg, Adachi, Cleveland et al., 2000: "Disruption of the ARF transcriptional activator DMP1 facilitates cell immortalization, Ras transformation, and tumorigenesis."
Genes Dev 14; 1797-809

Ishii et al., 1999: "Ferquent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, $p14^{ARF}$, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines "
Brain Pathol, 469-479

Jiang, Stone, Wagner, Wang, Dayananth, Kozak, Wold, Kamb, 1995:
"Comparative analysis of Homo sapiens and Mus musculus cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor genes p16 (MTS1) and p15 (MTS2)."
J Mol Evol. 1995 Dec;41(6):795-802.

Jin, Piao, Kim, et al., 2000: "p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma."
Cancer 89; 60-8

Kamb, Shattuck-Eidens, Eeles et al., 1994: "Analysis of the p16 gene (CDNK2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus"
Nat Genet 8; 23-26

Kamb et al., 1995: „Cell-cycle regulators and cancer"
Trends Genet 11; 136-140

Kamb, Gruis, et al., 1994: „Cell-cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types"
Science 264; 436-440

Kamijo, Weber, Zambetti et al., 1998: „Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and mdm2“
Proc Natl Acad Sci USA 95; 8292-8297

Kamijo et al., 1999: ”Tumor spectrum in ARF-deficient mice”
Cancer Res 59; 2217-2222

Kannan, Krishnamurthy, Feng, et al., 2000: “Mutation profile of the p53, fhit, p16INK4a/p19ARF and H-Ras genes in indian breast carcinomas.”
Int J Oncol 17; 1031-5

Kecker, Giovanelle, et al., 1990: “Consistent karyotypic abnormalities in human malignant melanomas”
Anticancer Res 10; 859-872

Ko, Prives, 1996: “p53: puzzle and paradigm.”
Genes Dev. 1996 May 1;10(9):1054-72.

Kovar, Jug, Aryee, Zoubek, et al., 1997: "Among genes involved in the Rb dependent cell cycle cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the ewing family of tumors"
Oncogene 15; 2225-2232

Kulozik, Hentze, 2000: “Molekulare Medizin - Grundlagen, Pathomechanismen, Klinik”
Walter de Gruyter-Verlag; Berlin-New York 2000

Kumar, Ssaurja, Punnonen, et al., 1998: „Selective deletions of exon 1beta of the p19ARF gene in metastatic melanoma cell lines“
Genes Chromosoms Cancer 23; 273-277

Kumar, Smeds, Lundh Rozell, Hemminki, 1999: “Loss of heterozygosity at chromosome 9p21 (INK4-p14ARF locus): homozygous deletions and mutations in the p16 and p14ARF genes in sporadic primary melanomas.”
Melanoma Res. 9; 138-47

Kyte-Anderson, 1987: "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose."
J Biochem Biophysic 10; 105-137

Laemmli et al., 1970: "Cleavage of structual proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4"
Nature 227; 680-685

Larsen CJ. 1996: "p16INK4a: a gene with a dual capacity to encode unrelated proteins that inhibit cell cycle progression."
Oncogene. 1996 May 16;12(10):2041-4.

Lee, Dong, Shin et al., 1997: "Genetic alterations of p16INK4A and p53 genes in sporadic dysplastic nevus"
Biochem Biophys Res Commun 237; 667-672

Levine, Momand et al, 1991: "The p53 tumor suppressor gene"
Nature 351; 453-456

Levine AJ, 1997: "p53, the cellular gatekeeper for growth and division"
Cell 88; 323-331

Liggett et al., 1996: "p16 and 16ß are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cell in vitro "
Cancer Res 56, 4119-4123

Li et al., 1994: "Transcriptional repression of the d-type cyclin dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb"
Cancer Res 54, 6078-6082

Liu, Lassan, Slingerland, et al., 1995: "Germline p16INK4a mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma"
Oncogene 11; 405-412

Liu, Goldstein, Tucker, Brill et al., 1997: “Affected members of melanoma-prone families with linkage to 9p21 but lacking mutations in CDKN2A do not harbor mutations in the coding regions of either CDKN2B or p19ARF.”
Genes Chromosomes Cancer 19; 52-4.

Lubbe, Reichel, Burg, 1994: “Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma."
J Invest Dermatol 102; 819-21

Mao et al., 1995: “A novel $p16^{INK4a}$ transcript”
Cancer Res 55, 2995-2997

Mishima, Nakanishi, et al., 1985: “Acral lentiginous melanoma and its precursor-heterogeneity of palmo-plantar melanomas”
Pathology 17; 258-265

Mihm, Clark, From, et al., 1971: “The clinical diagnosis, classification an histogenetic concepts of the early stages of cutaneous malignant melanomas.”
N Engl J Med 284; 1078-1082

Mikkelsen T, Cavenee WK., 1990: “Suppressors of the malignant phenotype.”
Cell Growth Differ. 1990 Apr;1(4):201-7

Momand, Zambetti, Olson et al., 1992: “The mdm2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53 transactivation”
Cell 69; 1237-1245

Mullis, Falona et al., 1986: “Specific encymatic amplification of DNA *in vitro*, the polymerase-chain-reaction”
Cold Spin Harbour Symp Biology 51, 263

Newcomb, Rao, Giknavorlan, et al. 1995: "Alternations of multiple tumor suppressor genes (p53(17p13), p161NK4 (9p21), and DBM (1 3q1 4)) in B-cell chronic lymphocytic leukemia"
Mol Oncogene 14; 811-818

Nobori, Miura, et al., 1994: „Deletions of the cyclin dependent kinase 4 inhibitor gene in multiple human cancers“
Nature 386; 753-756

Noncarrow, Palmer, et al., 1993: “Confirmation of chromosome 9p linkage in familial melanoma”
Am J Hum Genet 53; 936-942

Ohta, Nagai, Shimizu et al., 1994: „Rarity of somatic and germline mutations of the cyclin dependent kinase 4 inhibitor gene, CDK4 in melanoma.“
Cancer Res 54; 5269-5272

Oliner, Kinzler, Meltzer, George, Vogelstein, 1992: „Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas.”
Nature. 1992 Jul 2;358(6381):80-3.

Papp, Jafari, Schiffmann, 1996: “Lack of p53 mutations and loss of heterozygosity in non-cultured human melanocytic lesions.”
J Cancer Res Clin Oncol 122; 541-8

Patino-Garcia, Sierrasesumaga, 1997: "Analysis of the p16INKa and tp53 tumor suppressor genes in bone sarcoma pediatric patients"
Cancer Genet Cytogenet 98; 50-55

Pathak MA, 1991: “Ultraviolet radiation and the development of non-melanoma and melanoma skin cancer; clinical and experimental evidence”
Skin Pharmacol 4; 85-94

Pedersen und Wang, 1989: “Chromosomal evolution in the progression and metastasis of human malignant melanoma. A multiple lesion study”
Cancer Genet Cytogenet 41; 185-201

Peltenburg, Schier, 1994: "Transcriptional suppression of HLA-B by c-Myc is mediated through the core promotor elements"
Immunogenetics 40; 54-61

Peris, Chimenti, Fargnoli et al., 1999: "UV fingerprint CDKN2a but no p14ARF mutations in sporadic melanomas."
J Invest Dermatol 112; 825-6

Prins, Williamson, Kamp et al., 1998: „The gene for the cyclin-dependent-kinase-4-inhibitor, CDKN2A, is preferentially deleted in malignant mesothelioma"
Int J Cancer 11; 511-515

Puig, Ruiz, Lazaro, et al., 1995: "9p deletions in cutaneous malignant melanoma tumors: the minimal deleted ragion involves markers outside the p16 (CDNK2) gene."
Am J Hum Genet 57; 395-402

Quelle et al., 1995:
a. "Cloning and Characterization of murine $p16^{INK4a}$ and $p15^{INK4b}$ genes"
Oncogene 11, 635-645
b. "Alternativ reading frame of the INK4a-tumor suppressor gene encodes two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest"
Cell 83, 993-1000; 1995

Quelle et al., 1997: "Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16INK but not by the alternativ reading frame protein p19ARF"
Proc Natl Acad Sci USA 94; 669-673

Rampen, v. d. Meeren, et al., 1986: „Frequency of moles as a key to melanoma incidence?"
J Am Acad Dermatol 15; 1200-1203

Reed, McNutt, Prietto et al., 1994: „Expression of transforming growth factor-β2 in malignant melanoma correlates with depth of tumor invasion"
Amer J Path 145; 97-104

Ries, Biederer, Woods, Shifman, et al., 2000: "Opposing effects of ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF."
Cell 103; 321-30

Rowan, Bataille, et al., 1999: "Somatic mutations in the Peutz-Jeghers (LKB1/STKI) gene in sporadic malignant melanomas"
J Invest Dermatol 112; 509-511

Rozenblum, Schutte, et al., 1997: „Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma"
Cancer Res 57; 1731-1734

Rünger et al., 1997: "UV-Licht und Karzinogenese"
Dermatologische Onkologie, Hrsg. Grabe et al. pringer-Verlag; 13-21

Ruas & Peters, 1998: „The p16INK4a/CDNK2a tumor suppressor and its relatives"
Biochem Biophys Acta 1378; 115-117

Ruiz, Puig, Lynch, Castel et al., 1998: "Retention of the CDKN2A locus and low frequency of point mutations in primary and metastatic cutaneous malignant melanoma."
Int J Cancer 76; 312-6

Sanger, Nicklen, Coulson, 1977: „DNA Sequencing with chain termination inhibitors"
PNAS USA 74; 5463-5467

Saridaki, Koumantaki et al., 2000: „High frequency of loss of heterozygosity on chromosome region 9p21-p22 but lack of $p16^{INK4a}$/$p19^{ARF}$ mutations in Greek patient with basal cell carcinoma of the skin"
The Journal of Invastigative Dermatology 115; 719-725

Scheibenbogen, Mohler, Haefele, Hunstein, Keilholz, 1995: „Serum interleukin-8 (IL-8) is elevated in patients with metastatic melanoma and correlates with tumor load."
Melanoma Res. 1995 Jun;5(3):179-81.

Schnyder, 1966: „Tumore der Haut in genetischer Sicht“
Praxis 65; 1478-1482

Schwartze G, Fiedler H. , 1994: “The diagnostic significance of alpha-MSH in malignant melanoma of man”
Hautarzt. 1994 Jul;45(7):468-70.

Seline, Norris, Horikawa, Fujita, Middleton, 1996: “Expression of E and P-cadherin by melanoma cells decreases in progressive melanomas and following ultraviolet radiation.”
J Invest Dermatol. 1996 Jun;106(6):1320-4.

Serrano, Hannon et al., 1993: „A new regulator motif in cell-cycle control causing inhibition of cyclin D/CDK4“
Nature 366; 704-707

Serrano, Lee, et al., 1996: “Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality”
Cell 85; 27-37

Sharpless et al., 1999: “The INK4A/ARF locus and its two gene products”
Current Opinion in Genetics & Develoment 9; 22-30

Sherr and Roberts 1995: “Inhibitors of mammalian G1 cyclin dependent kinase”
Genes Dev 9, 1672-1677

Sherr, 1996: “Cancer cell cycles”
Science 274, 1672-1677

Sherr, 1998: “Tumor surveillance via the ARF-p53-pathway”
Genes Dev 12; 2984-2991

Shi, Key, Kalra, 1991: “Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancenent method for immunhistochemical staining based on microwave oven heating of tisseues sections”
J Histochem Cytochem 39; 741-748

Silye , Karayiannakis , Syrigos , Poole , van Noorden , Batchelor , Regele , 1998: "E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions."
J Pathol. 1998 Dec;186(4):350-5.

Smith et al., 1985: „Measurement of protein using bicinchoninic acid"
Anal Biochem 150; 75-85

Smith, Matthews, Jones, Kung, 1993: "Biological actions of oncogenes"
Pharmacol Ther 58; 211-236

Sober, Burstein, et al., 1995: "Precursors of skin cancer."
Cancer75; 645-650

Sonesson B, Eide S, Ringborg U, Rorsman H, Rosengren E., 1995: "Tyrosinase activity in the serum of patients with malignant melanoma."
Melanoma Res. 1995 Apr;5(2):113-6.

Sorlie, Martel-Planche, et al., 1998: "Analysis of p53, p161MTS, p21WAF1 and H-Ras in archived bladder tumors from workers exposed to aromatic amines"
Br J Cancer 77; 1573-1579

Soufir, Moles, Vilmer et al., 1999: "p16 UV mutations in human skin epithelial tumors"
Oncogene 18; 5477-5481

Soufir, et al., 2000: "Individuals with presumably hereditary uveal melanoma do not harbour germline mutations in the coding regions of either the P16INK4A, P14ARF or cdk4 genes."
Br J Cancer 82; 818-22

Stott, Bates, James, McConnell, et al., 1998: "The alternativ product from the human CDKN2A locus, $p14^{ARF}$, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2"
The EMBO Journal 17, 5001-5014

Stone et al., 1995: "Complex structure and regulation of the p16 (MTS1) locus"
Cancer Res. 55, 2988-2994

Sturm, Bisshop, Takahashi, Parsons, 1991: “A melanoma octamer binding protein is responsive to differentiating agents.”
Cell Growth Differ. 1991 Oct;2(10):519-24.

Tao et al, 1999: “$p19^{ARF}$ stabilizes p53 by blocking nucleo-zytoplasmatic shuttling of mdm2”
Proc Natl Acad Sci USA 96; 6937-6941

Tachibana, Smith, Sato et al., 2000: “Investigation of germline PTEN, p53, p16(INK4A)/p14(ARF), and CDK4 alterations in familial glioma.”
Am J Med Genet 92; 136-41

Towbin, Staehelin, Gordon, 1979: “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.1979.”
Biotechnology. 1992;24:145-9.

Tsuchiya, Sekine, Hinohara et al., 2000: “Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma.”
Cancer Genet Cytogenet 120; 91-8

Tsuzuki, Tsunoda, Sakaki, Konishi et al., 1996: "Alternations of retinoblastoma, p53, p16(CDKN2), and p15 genes in human astrocytomas"
Cancer 78; 287-293

Veer et al., 1989: “N-ras mutations in human cutaneus melanoma from sun exposed body site”
Mol Cell Biol 9; 3113-3116

Versteeg, Nordermeer et al., 1988: “c-Myc downregulates class 1 HLA expression in Human melanoma”
EMBO J 7; 1023-1029

Villuendes, Sanchez-Beato et al., 1998: "Loss of p16/INK4a protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression"
Am J Pathol 153; 887-897

Vogelstein und Kinzler, 1993: „The multistep nature of cancer“
TIG 9, 138-141

Wang, Uhara, Yamazaki, et al., 1996: “Immunhistochemical detection of CDK4 and p16INK proteins in1 cutaneous malignant melanoma.”
Br J Dermatol 13; 26-275

Wagener C., 1999: „Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren“
Thieme-Verlag 1999

Weber, Jeffers, Rehg, Randle, Lozano et al., 2000: “p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor.”
Genes Dev 14; 2358-65

Weinberg RA., 1989: “Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis.”
Cancer Res. 1989 Jul 15;49(14):3713-21

Weinberg, 1991: “Tumor suppressor genes”
Science 254; 1138-1145

Weinberg, 1995: „The retinoblastoma protein and cell cycle control“
Cell 81, 323-330

Weintraub, Prater, Dean, 1992: “Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element.”
Nature. 1992 Jul 16;358(6383):259-61.

Weiss, Garbe, Bertz, et al., 1990: „Risikofaktoren für die Entwicklung maligner Melanome in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse einer multizentrischen Fall-Kontroll-Studie“
Hautarzt 41; 309-313

Weiss, Heine et al., 1995: „Mutation and expression of p53 in malignant melanomas“
Skin cancer, recent results in cancer research, Vol.139; 137-154, Springer-Verlag

Weiß, Herbst, 1997: "Onkogene und Tumorsuppressorgene bei Hauttumoren"
Dermatologische Onkologie, Springer-Verlag 1997; 4-10

Westerdahl, Olsson, Ingvar, et al., 1995: „Is the use of suncreems a risk factor for malignant melanoma?"
Melanoma Res 5; 59-65

Wilkowski, 1990: "The inherited character of cancer- an historical survey"
Cancer Cells 2; 229-257

Wolfel, Hauer, Schneider et al., 1995: "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T-lymphocytes in a human melanoma"
Science 269; 1281-1284

Wynford, Jones, et al., 1996: „The tumor suppressor gene p53 as a regulator of proliferative life-span and tumor progression."
Biol Signals 5; 139-153

Yang, You,Yeh, Chang et al, 2000: "Adenovirus-mediated p14ARF gene transfer in human mesothelioma cells"
Journal of the National Cancer Institute 92; 636-641

Zuo, Weger, Yang et al., 1996: „Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familian melanoma"
Nat Genet 12; 97-99

Zhu, Duffy, Eldbrige, et al., 1999: "A major quantitative trait locus for mole density is linked to the familian melanoma gene CDNK2A: a maximum likehood combined linkage and association analysis in twins and thei sibs"
Am J Hum Genet 65; 483-492

Danksagung

Mein herzliches „Danke Schön“ geht an alle, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit physisch und psychisch unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. A. Bosserhoff, meiner wissenschaftlichen Mentorin („Doktormutter“), deren großartige Betreuung ich immer zu schätzen wusste und wissen werde.

Herrn Prof. Dr. med. R. Büttner, der als Leiter der Forschungsgruppe, und somit auch als der 2. Elternteil meiner Doktorfamilie, mir stets mit seiner fachlichen Kompetenz und Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ch. Mittermayer, der mir als Direktor des Instituts die uneingeschränkte Benutzung der Forschungseinrichtungen gestattet hat und dessen einzigartige Vorlesung mich auf die geheimnisvollen Pfade der Pathologie geführt hat.

Frau N.Krott, A. Fuß, C. Abschlag, E. Pagen, I. Losen, medizinisch-technische Assistentinnen am Institut für Pathologie, für die Einweisung in die Laborarbeit (die tollen Kochrezepte der Hexenküche) und Hilfestellung, wenn mal die Färbung nicht klappte oder die PCR nicht lief.

Frau I. Poser und I. Breibach, Herrn Dr. K. Günther und Dr. M. Moser, wissenschaftlichen Mitarbeitern der Forschungsgruppe, die mich an manchen verzweifelten Abenden und Wochenenden mit bestem Wissen und Gewissen unterstützt haben und hin und wieder wunderbare Photos meiner Agarosegele anfertigten.

Riesengrosser Dank geht an meine Eltern und meinen Bruder, die mir die ganze Zeit mit einem guten, aufbauenden Wort zur Seite standen und soweit möglich mich maximal unterstützten.

Und natürlich an Fr. Dr. med. Fischedick, meinem Lichtblick an den Abenden des tagelangen Schreibens und Herumexperimentierens, für die kompetente und liebevolle Zentrifugation meiner Zelllinien und vor allem für das Korrekturlesen.

Nicht zu vernachlässigen sei auch die grosse linguistische Unterstützung von Dr. med. Pauly bei der Korrektur gewisser sprachlicher Unzulänglichkeiten meinerseits.

An Alle nochmals einen ganz grossen Dank.

Lebenslauf:

Name:	Rafael Dobrowolski
Geburtsdatum:	10. August 1973
Geburtsort:	Radom / Polen

Schulbildung:

1980 - 1989	Grundschule und Kopernikus-Gymnasium in Radom / Polen
1989 - 1990	Deutsch - Sprachkurs in Köln
1990 - 1995	Wilhelmine-Fliedner-Realschule und Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Hilden
Mai 1995	Abitur
1995 - 1996	Zivildienst in St.-Josef-Krankenhaus in Bonn

Universität:

10.1996 - 09.1998	Vorklinisches Studium an der RWTH-Aachen
10.1998 - 09.2002	Klinisches Studium an der RWTH-Aachen
10.2001 - 10.2003	Praktisches Jahr im Luisenhospital Aachen
06.11.2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Approbation:

18.11.2002	Approbation als Arzt im Praktikum

Berufliche Tätigkeit:

Seit 01.12.2002	Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Luisenhospital Aachen, Dr. med. W. Reeker