

Identifizierung und Charakterisierung von
Genen und Proteinen in der
Xmrk-induzierten Entwicklung von Melanomen



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Janka Teutschbein

geb. am 03.09.1979 in Leipzig

Würzburg, März 2008

Angefertigt am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I,
Biozentrum der Universität Würzburg
in der Arbeitsgruppe von Dr. Svenja Meierjohann
unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Manfred Scharl

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Scharl

Gutachter: PD Dr. Thomas Munder

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für Peter und Max

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Summary	6
1. Einleitung	7
1.1. Ursachen und Entwicklung von Melanomen	7
• Die Stadien der Melanomgenese	7
• Suszeptibilitätsgene in erblich bedingten Melanomen.....	8
• Erworbene Mutationen und Hauptsignalwege in der Melanomgenese.....	10
• Rolle von Rezeptortyrosinkinasen in der Tumorgenese	11
1.2. Melanomforschung am <i>Xiphophorus</i> -Modell	13
• Das <i>Xiphophorus</i> -Melanom-Modell	13
• Das Onkogen Xmrk	14
• Bedeutung des <i>Xiphophorus</i> -Systems in der Melanomforschung	17
1.3. Analyse der Xmrk-abhängigen Signaltransduktion.....	19
• Microarray-Technologie.....	19
• Protein-Protein-Interaktionsstudien	19
1.4. Zielstellung der Arbeit.....	22
2. Ergebnisse und Diskussion	23
2.1. Regulation der Genexpression durch Xmrk.....	23
• Microarray-Analyse der differentiellen Genexpression	23
• Validierung der Microarray-Ergebnisse	26
• Identifizierung von Signalwegen.....	31
• Genexpression in humanen Melanomzelllinien	34
• Bedeutung der Genkandidaten als potenzielle Melanom-Proteine.....	36
2.2. Etablierung des Split-Ubiquitin-Systems zur Identifizierung von Xmrk- Interaktionspartnern	41
2.3. Charakterisierung der FAK – FYN Interaktion	46
3. Fazit und Ausblick	49
Literaturverzeichnis	53
Anhang A – Zusätzliche Ergebnisse	63
Anhang B – Originalpublikationen	66
Anhang C – Materialien und Methoden	133
Lebenslauf	143
Danksagung	146
Erklärung	147

Zusammenfassung

Melanome stellen die gefährlichste Form von Hautkrebs mit der höchsten Mortalitätsrate dar. Der Transformation normaler Melanozyten zu malignen Melanomen liegen komplexe molekulare und biochemische Veränderungen zu Grunde. Im *Xiphophorus*-Melanom-Modell ist die onkogene Rezeptortyrosinkinase "*Xiphophorus melanoma receptor kinase*" (Xmrk) der alleinige Auslöser der Melanominisation und -progression. Die Aufklärung der Xmrk-vermittelten Signaltransduktion kann zum besseren Verständnis von Ereignissen, die auch bei der humanen Melanomentwicklung eine Rolle spielen, beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Microarray-Technologie die Regulation der Genexpression durch Xmrk analysiert. Zu den nach Rezeptoraktivierung am stärksten herabregulierten Genen gehörten "son of sevenless homolog 1" (*Sos1*) und "ubiquitin-conjugating enzyme E2I" (*Ube2i*); stark hochreguliert waren "early growth response 1" (*Egr1*), "cysteine-rich protein 61" (*Cyr61*), "dual-specificity phosphatase 4" (*Dusp4*), "fos-like antigen 1" (*Fos1*), "epithelial membrane protein" (*Emp1*), Osteopontin (*Opn*), "insulin-like growth factor binding protein 3" (*Igfbp3*) und "tumor-associated antigen L6" (*Taal6*). Die für die Regulation dieser Gene verantwortlichen Signalwege wurden durch die Anwendung von niedermolekularen Inhibitoren und siRNA identifiziert, wobei für die SRC-Kinase FYN eine zentrale Bedeutung bei der Xmrk-abhängigen Regulation der Genexpression festgestellt wurde. Darüber hinaus wurde die Expression der Gene in humanen Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten untersucht. Als besonders vielversprechende Kandidaten stellten sich dabei DUSP4 und TAAL6 heraus, deren Rolle in der humanen Melanominduktion und -progression Gegenstand zukünftiger Studien sein wird.

In einem anderen Ansatz zur Aufklärung des Signalnetzwerkes sollten Zielproteine von Xmrk durch Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems ermittelt werden. Aufgrund ungünstiger Expressions- oder Faltungseigenschaften von Xmrk in diesem System war es aber nicht möglich, den Rezeptor als Köderprotein einzusetzen. Das für die Xmrk-vermittelte Melanomentstehung zentrale Protein FYN konnte jedoch als Köder etabliert und seine Wechselwirkung mit der Tyrosinkinase FAK analysiert werden. Es wurde gezeigt, dass der phosphorylierte Tyrosinrest an Position 397 von FAK für die Interaktion einer N-terminal trunkierten FAK-Variante mit FYN notwendig ist und dass diese Phosphorylierung in Hefe gewährleistet zu sein scheint. Die Suche nach neuen Interaktionspartnern von FYN mittels der Split-Ubiquitin-Technologie könnte Einblicke in weitere FYN-abhängige Ereignisse bieten, die zur Aufklärung seiner zentralen Rolle bei der Tumorentstehung dienen könnte.

Summary

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer with the highest mortality rate. The transformation of melanocytes to malignant melanoma is based on complex molecular and biochemical alterations. In the *Xiphophorus* melanoma model, the oncogenic receptor tyrosine kinase *Xiphophorus* melanoma receptor kinase (Xmrk) is the sole trigger of melanoma initiation and progression. Elucidating Xmrk-dependent signaling pathways may contribute to a better understanding of processes that play a role in human melanomagenesis, too.

Here, the regulation of gene expression by Xmrk was analyzed using a microarray approach. The genes with the strongest down-regulation in response to receptor activation included son of sevenless homolog 1 (*Sos1*) and ubiquitin-conjugating enzyme E2I (*Ube2i*), whereas early growth response 1 (*Egr1*), cysteine-rich protein 61 (*Cyr61*), dual-specificity phosphatase 4 (*Dusp4*), fos-like antigen 1 (*Fos1*), epithelial membrane protein (*Emp1*), Osteopontin (*Opn*), insulin-like growth factor binding protein 3 (*Igfbp3*), and tumor-associated antigen L6 (*Taal6*) were strongly up-regulated. The pathways regulating expression of these genes were identified by applying small molecule inhibitors and siRNA. Interestingly, the SRC-family kinase FYN was found to be a key-player in Xmrk-dependent gene regulation. Furthermore, expression of the genes in human melanoma cell lines compared to normal human melanocytes was investigated. The most promising candidates, which might be important for melanoma induction and progression, were DUSP4 and TAAL6. Their potential suitability as diagnostic and prognostic melanoma markers will be addressed in future studies.

In addition to gene expression analysis, protein-protein interactions were to be assayed by the split-ubiquitin-system in order to identify novel Xmrk targets. Unfortunately, inappropriate expression or folding of the receptor in this system precluded it from working as bait. However, the FYN protein, which has a central role in Xmrk-mediated signaling, was established as bait and its association with FAK was analyzed in more detail. A phosphorylated tyrosine residue at position 397 of FAK was demonstrated to be necessary for the interaction of an N-terminally truncated FAK variant with FYN, and this phosphorylation event seems to be feasible in yeast. In future, a split-ubiquitin based screen for novel interaction partners of FYN might provide insights into FYN-dependent processes and help to understand its central role in tumor development.

1. Einleitung

1.1. Ursachen und Entwicklung von Melanomen

Die Inzidenz von Hautkrebs – dazu gehören Basaliome, Spinaliome und Melanome – stieg in den letzten Jahrzehnten beständig an. Heute handelt es sich laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) bei jedem dritten diagnostizierten Tumor um Hautkrebs; weltweit sind pro Jahr 2-3 Millionen Menschen betroffen. Obwohl Melanome mit 132.000 Fällen wesentlich seltener als Basaliome und Spinaliome auftreten, stellen sie die gefährlichste Form von Hautkrebs mit der höchsten Mortalitätsrate dar (<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>).

Melanome entstehen aus spezialisierten Pigmentzellen, den Melanozyten, welche vorwiegend in der Haut und in den Augen vorkommen und die für die Haut- und Haarfarbe verantwortlichen Melanine produzieren. Die Homeostase der Melanozyten wird durch epidermale Keratinozyten reguliert. Als Antwort auf UV-Strahlung sezernieren Keratinozyten Faktoren, die Überleben, Differenzierung, Proliferation und Motilität der Melanozyten kontrollieren und diese zur Melaninproduktion anregen, woraus die Bräunung der Haut bei Sonneneinstrahlung resultiert. Melanozyten spielen somit eine entscheidende Rolle beim Schutz unserer Haut vor Schäden durch UV-Strahlung. Ist die Signaltransduktion in Melanozyten jedoch durch Genmutationen gestört, kommt es zur malignen Transformation (Thompson *et al.*, 2005; Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Die Stadien der Melanomgenese

Die Transformation der Melanozyten bis hin zum malignen Melanom geschieht in mehreren Stufen, wobei jedoch nicht immer alle Phasen durchlaufen werden (Abb. 1). Die Naevi in der ersten Phase der Transformation sind im Allgemeinen gutartig, können sich aber zu "radial growth phase" (RGP)-Melanomen entwickeln, deren Zellen durch erhöhte Proliferation gekennzeichnet sind. In "vertical growth phase" (VGP)-Melanomen haben die Zellen bereits metastasierendes Potenzial und dringen in die Dermis ein. Durch Infiltration des vaskulären und lymphatischen Systems kommt es schließlich zum tödlichen Stadium – dem metastasierenden malignen Melanom (Kim *et al.*, 2002; Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

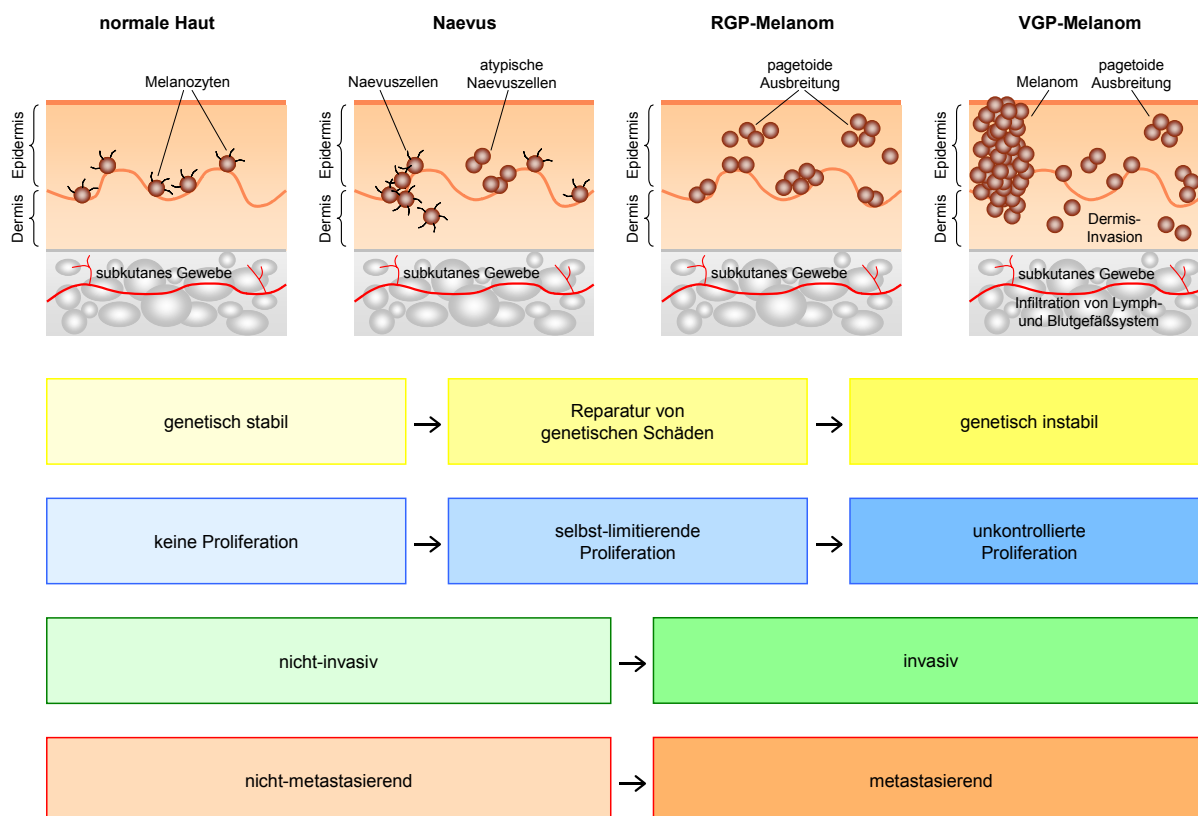


Abb. 1. Biologische Veränderungen während der Melanomprogression. Im Verlauf der Transformation normaler Melanozyten bis hin zum malignen Melanom nimmt die genetische Stabilität der Zellen ab, während Proliferation, Invasivität und Metastasenbildung zunehmen. RGP = "radial growth phase", VGP = "vertical growth phase"

Suszeptibilitätsgene in erblich bedingten Melanomen

Melanome treten entweder sporadisch auf (90%) oder sind erblich bedingt (10%) (High & Robinson, 2007) (Abb. 2). Im Falle der erblich bedingten (familiären) Melanome betreffen die Mutationen Gene in Keimzellen und können von Generation zu Generation weitergegeben werden. Zu den bisher identifizierten Suszeptibilitätsgenen gehören der Melanocortin-1-Rezeptor (*MC1R*), das Tumorsuppressorgen "cyclin-dependent kinase inhibitor 2A" (*CDKN2A*), das je nach Leserahmen für p16^{INK4A} oder "alternative reading frame" (p14^{ARF}) kodiert, und die "cyclin-dependent kinase 4" (*CDK4*) (High & Robinson, 2007).

Der *MC1R* bindet das Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH), welches nach UV-Exposition vermehrt gebildet wird. Dadurch werden die cAMP-Level in den Melanozyten gesteigert, was wiederum zur erhöhten Aktivität des an der Melaninsynthese beteiligten Enzyms Tyrosinase führt. Das *MC1R*-Gen reguliert somit die Menge des vor UV-Strahlung schützenden Eumelanins, und Mutationen

des Rezeptors können mit einem mindestens zweifach erhöhten Melanomrisiko einhergehen (High & Robinson, 2007).

Mutationen in den durch *CDKN2A* kodierten Proteinen $p16^{\text{INK4A}}$ bzw. $p14^{\text{ARF}}$ beeinträchtigen den Retinoblastom-Protein (Rb)- bzw. den p53-Signalweg. Im Wildtyp-Zustand hemmt $p16^{\text{INK4A}}$ die CDK4-vermittelte Inaktivierung von Rb, während $p14^{\text{ARF}}$ indirekt den Abbau von p53 verhindert. Beide Proteine können somit Zellen am G1-S "checkpoint" (Kontrollpunkt) des Zellzyklus arretieren und verhindern, dass Zellen mit DNA-Schäden, die zur Immortalisierung und Krebsentstehung führen können, in die S-Phase eintreten. In bis zu 40% der familiären Melanome ist *CDKN2A* mutiert, so dass $p16^{\text{INK4A}}$ oder $p14^{\text{ARF}}$ nicht funktionstüchtig sind und der Zellzyklus nicht gestoppt wird. Menschen mit Mutationen im *CDKN2A*-Gen tragen ein bis zu 70-fach erhöhtes Risiko, an Melanomen zu erkranken (High & Robinson, 2007).

CDK4 bildet mit Cyclin D1 (*CCND1*) einen Komplex, der Rb durch Phosphorylierung inaktiviert. Genamplifikation oder aktivierende Mutationen von *CDK4* führen zur Progression des Zellzyklus und zur unkontrollierten Proliferation der Zellen (High & Robinson, 2007).

In ca. 50-60% der Fälle erblicher Melanome kann keine der bekannten Mutationen identifiziert werden (High & Robinson, 2007) (Abb. 2).

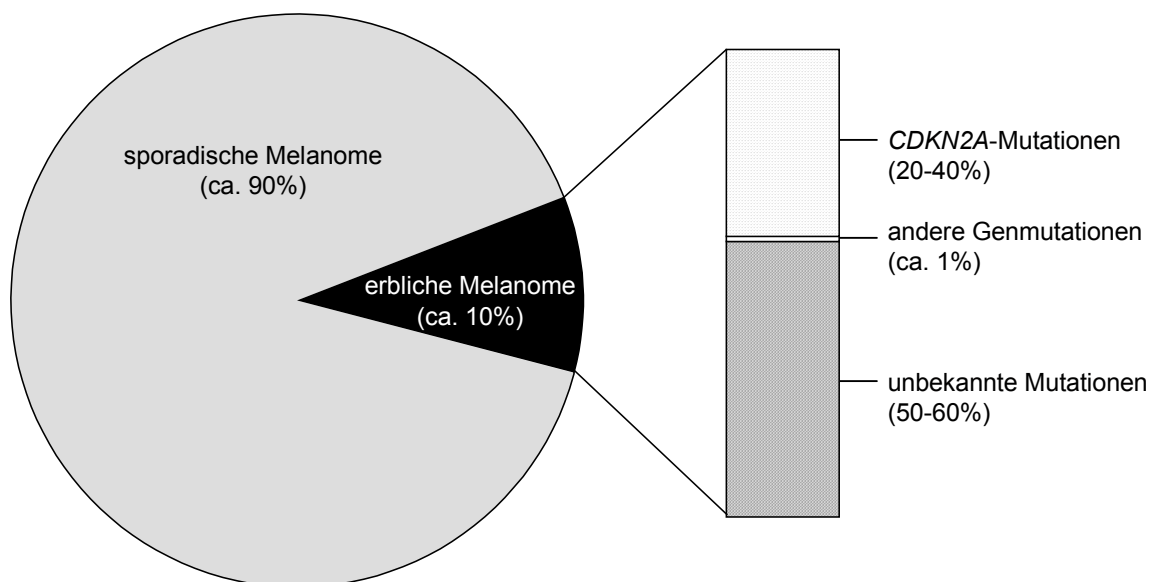


Abb. 2. Erbliche Mutationen in Melanomen. Ca. 90% der Melanome treten sporadisch auf, während 10% durch familiäre genetische Defekte bedingt sind. In 20-40% dieser erblichen Fälle sind *CDKN2A*-Mutationen beteiligt, während andere Mutationen wesentlich seltener vorkommen. In ca. 60% der erblichen Melanome ist die verantwortliche Mutation unbekannt.

Erworbene Mutationen und Hauptsignalwege in der Melanomgenese

Säugerzellen besitzen zahlreiche Schutzmechanismen gegen die Transformation von normalen Zellen zu Krebszellen. Eine einzelne Mutation ist daher in der Regel nicht die Ursache von Krebs, kann aber zu dessen Entstehung beitragen, wenn sich die Läsionen in multiplen Signalwegen akkumulieren (Vogelstein & Kinzler, 2004; Becker *et al.*, 2006).

Bei sporadischen Melanomen betreffen die Mutationen eine einzelne Zelle und werden dann an alle Abkömmlinge dieser Zelle weitergegeben. Zu solchen somatischen Mutationen scheint entsprechend zahlreicher epidemiologischer und genetischer Studien die Einwirkung von UV-Strahlen entscheidend beizutragen (Ivry *et al.*, 2006). Durch ihren direkten mutagenen Effekt auf DNA, die Stimulierung der Produktion autokriner Wachstumsfaktoren, die Reduktion der Immunantwort der Haut, den Verlust von Adhäsionsrezeptoren und den Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies können die Melanozyten sich der Kontrolle durch Keratinozyten entziehen, daraufhin proliferieren und sich in der Epidermis ausbreiten (Thompson *et al.*, 2005; Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Ein in sporadischen humanen Melanomen häufig betroffener Signalweg ist die RAS/RAF/MAPK-Kaskade. Aktivierende Mutationen von *B-RAF* in 40-80% und *N-RAS* in 10-20% der Melanome führen zu Veränderungen in zellulären Prozessen wie Apoptose, Proliferation, Adhäsion, Überleben in der extrazellulären Matrix und Verlust der Kontrolle durch Keratinozyten (Sosman & Puzanov, 2006).

Eine weitere entscheidende Rolle bei diesen Prozessen spielt der PI3K/AKT-Weg, der in vielen Melanomen hyperaktiviert ist. Die Phosphoinositid-3-OH-Kinase (PI3K) wandelt bestimmte Membranlipide, die Phosphoinositide, in sekundäre Botenstoffe um, welche zahlreiche Signalwege aktivieren und durch die Lipidphosphatase "phosphate and tensin homologue" (PTEN) in ihrer Wirkung terminiert werden. Die PI3K selbst trägt in 3% der metastasierenden Melanome aktivierende Mutationen (Omholt *et al.*, 2006); in 5-20% der fortgeschrittenen Melanome ist die Phosphatase PTEN nicht funktionstüchtig (Wu *et al.*, 2003); Proteinkinase B (PKB, auch bekannt als AKT) als PI3K-Effektor wird in bis zu 60% der Melanome überexprimiert (Stahl *et al.*, 2004).

Sowohl die RAS/RAF/MAPK-Kaskade als auch der PI3K/AKT-Weg werden durch aktivierte Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) initiiert (Abb. 3).

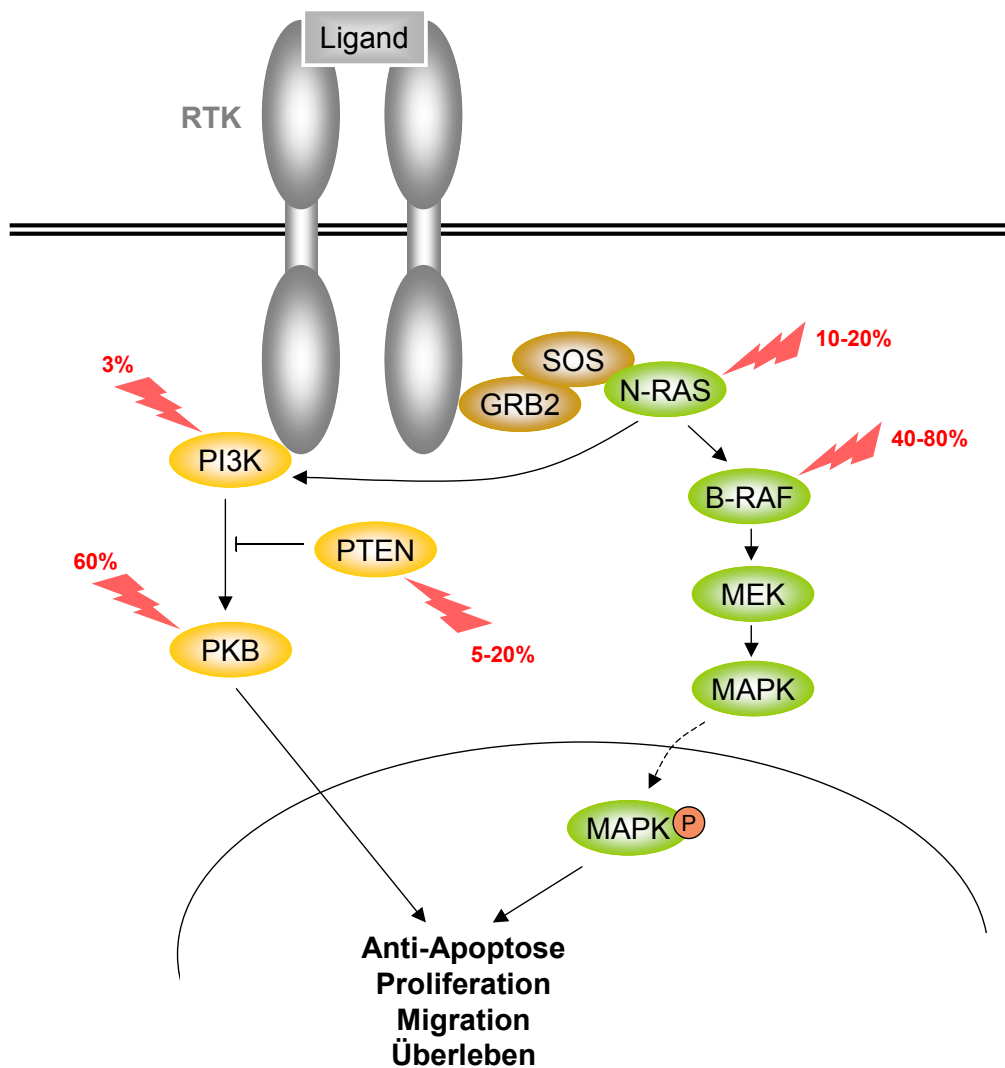


Abb. 3. Hauptsignalwege in der Melanomgenese. Die roten Pfeile markieren diejenigen Signalkomponenten, die im entsprechend angegebenen prozentualen Teil der Melanomfälle von Mutationen oder Überexpression betroffen sind.

Rolle von Rezeptortyrosinkinasen in der Tumorgenese

RTKs spielen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung vielzelliger Organismen, ihre Aktivität muss daher strikt kontrolliert werden. Die Bindung eines Liganden führt zur Dimerisierung, infolgedessen zur Autophosphorylierung an intrazellulären Tyrosinresten und somit zur Aktivierung der Rezeptoren. Spezifische Phosphotyrosine fungieren als Andockstellen für verschiedene Substrate und leiten so intrazelluläre Signalwege ein (Schlessinger, 2000). Tumore und andere Krankheiten können entstehen, wenn die Aktivität der RTKs konstitutiv wird und permanent Signale in der Zelle induziert werden (Robertson *et al.*, 2000).

Molekulare Basis für die konstitutive Aktivierung von RTKs kann deren Überexpression durch Genamplifikation oder veränderte transkriptionelle Regulation sein. Ein prominentes Beispiel hierfür ist der in 35% der Fälle von Brustkrebs amplifizierte oder überexprimierte humane EGF-Rezeptor 2 (HER2). Die resultierende hohe Rezeptordichte in der Zellmembran begünstigt die Dimerisierung der Rezeptormonomere (Kurebayashi, 2001).

Eine Trunkierung der extrazellulären Domäne kann ebenfalls die permanente Aktivierung einer RTK zur Folge haben, wie es für die viralen Onkogene v-ErbB und v-kit sowie für eine in malignen Gliomen vorkommende Variante des EGF-Rezeptors (EGFRvIII) beschrieben wurde (Yamamoto *et al.*, 1983; Besmer *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 1997).

Ein weiterer, Melanozyten-spezifischer Aktivierungsmechanismus ist die autokrine Stimulierung durch den Wachstumsfaktor "basic fibroblast growth factor" (bFGF). Im Gegensatz zu normalen Melanozyten sind die Expressionslevel von bFGF in den meisten Melanomzellen erhöht. Der bFGF-Rezeptor wird dadurch in den Pigmentzellen konstitutiv autokrin stimuliert und initiiert und fördert die Melanomentwicklung (Halaban, 1996).

Schließlich wurde eine erhöhte Aktivität der RTKs durch Mutationen in allen funktionalen Domänen – nämlich in der Kinasedomäne, in der Region für die Substratbindung, in anderen extrazellulären Domänen oder im Transmembranbereich – beschrieben (Webster *et al.*, 1996; Songyang *et al.*, 1995; Sternberg & Gullick, 1989; Webster & Donoghue, 1996; Anderson *et al.*, 1998). Aminosäure-Substitutionen in der extrazellulären Domäne können den Verlust eines konservierten Cysteinrestes zur Folge haben, der an der Ausbildung einer Disulfidbrücke beteiligt ist. Das freiwerdende Cystein ist in der Lage, intermolekulare Bindungen einzugehen und so die dimere Konformation zu stabilisieren, d.h. Liganden-unabhängige Tyrosinkinase-Aktivität hervorzurufen. Solche Mutationen wurden u.a. in FGF-Rezeptoren und im RET-Rezeptor gefunden (Galvin *et al.*, 1996; Asai *et al.*, 1995). Auch Mutationen, die keine Cysteinreste betreffen, können durch abnormale Faltung der extrazellulären Domäne die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken verhindern und dadurch intermolekulare Bindungen fördern (Robertson *et al.*, 1998; Bongarzone *et al.*, 1999).

Ein weiteres Beispiel für derartige Mutationen, die mit der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken interferieren, findet sich im Melanom-induzierenden Onkogen "*Xiphophorus melanoma receptor kinase*" (Xmrk) (Dimitrijevic *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2001; Meierjohann *et al.*, 2006a). Diese RTK ist für die Entstehung maligner Melanome in Fischen der Gattung *Xiphophorus* verantwortlich, die in der Melanomforschung als Modellsystem dienen (Anders *et al.*, 1984; Meierjohann & Scharl, 2006).

1.2. Melanomforschung am *Xiphophorus*-Modell

Das *Xiphophorus*-Melanom-Modell

Fische der Gattung *Xiphophorus* sind in den Fließgewässern der Atlantikseite Zentralamerikas beheimatet. Ihre nächsten Verwandten sind Medakas, Stichlinge und Pufferfische. Die meisten *Xiphophorus*-Arten lassen sich gut in Laboratorien züchten. Sie dienen als Studienobjekte zur Erforschung von Verhalten, Evolution, Physiologie und Geschlechtsdetermination sowie als Tiermodell in der Krebsforschung.

In *Xiphophorus* kann die Entwicklung maligner Melanome durch selektive Züchtung induziert werden. Bereits in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts entstand das klassische Kreuzungsschema, das die Entstehung von *Xiphophorus*-Hybriden mit malignen Melanomen erklärt (Gordon, 1927; Kosswig, 1928) (Abb. 4). Grundlage hierfür ist ein Ungleichgewicht zwischen dem dominanten, Tumor-induzierenden Locus (*Tu*) und dem regulatorischen Locus (*R*), der vermutlich *Tu* reprimiert. *Tu* und *R* sind im *X. maculatus* (Platy, Spiegelkärpfling) auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und können daher durch gezielte Kreuzung mit der Spezies *X. hellerii* (Schwertträger), der sowohl *Tu* als auch *R* fehlen, separiert werden.

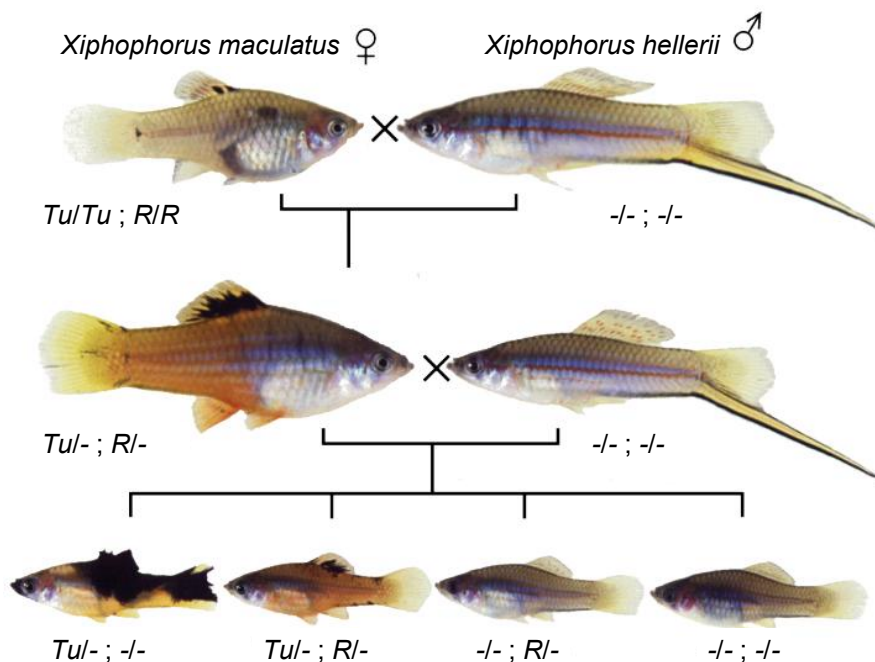


Abb. 4. Schema der „Gordon-Kosswig“- bzw. klassischen Kreuzung von *X. maculatus* mit *X. hellerii*, die zur Segregation von *Tu* und *R* und damit zu Nachkommen mit malignen Melanomen ($Tu/- ; -/-$), benignen Läsionen ($Tu/- ; R/-$) oder ohne veränderten Phänotyp ($-/- ; R/-$ und $-/- ; -/-$) führt.

Werden *X. maculatus* und *X. hellerii* gekreuzt, entstehen in der F1-Generation Fische, die heterozygot für *R* und *Tu* sind und durch den Verlust einer Kopie von *R* nicht-invasive, sogenannte benigne Pigmentzell-Läsionen entwickeln. Nach Rückkreuzung mit *X. hellerii* sind schließlich 25% der Nachkommen heterozygot für *Tu*, besitzen aber keine Kopie mehr von *R*. *Tu* ist in dieser Situation außer Kontrolle, wird überexprimiert und entfaltet sein onkogenes Potenzial.

Das Onkogen Xmrk

Die molekulare Natur des regulatorischen Locus *R* konnte bisher nicht identifiziert werden. Ein viel diskutierter Kandidat ist *cdkn2ab*, welcher Homologien zum humanen *CDKN2A* und *CDKN2B* aufweist (Kazianis *et al.*, 1999).

Der *Tu*-Locus kodiert für das Onkogen Xmrk (Wittbrodt *et al.*, 1989). Es handelt sich dabei um eine zur Familie der EGF-Rezeptoren gehörende RTK. Im Laufe der Evolution der Gattung *Xiphophorus* entstand Xmrk durch ein lokales Duplikationsereignis aus dem Proto-Onkogen *egfrb*. Im Zuge der Duplikation wurde Xmrk an eine neue 5'-Region fusioniert und damit die transkriptionelle Kontrolle des Onkogens verändert. Zusätzlich zur Überexpression sind Mutationen in der extrazellulären Domäne des Xmrk-Proteins für dessen onkogenes Potential verantwortlich. Zwei der insgesamt 14 Aminosäure-Substitutionen, C578S und G359R, interferieren sterisch mit der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken. Infolgedessen können die in der extrazellulären Domäne des Rezeptors frei gewordenen Cystein-Reste intermolekulare Disulfidbrücken bilden. Das führt zur permanenten, Liganden-unabhängigen Dimerisierung des Xmrk-Proteins und somit zu konstitutiver Autophosphorylierung und deregulierter Signaltransduktion (Dimitrijevic *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2001; Wellbrock *et al.*, 2002a; Meierjohann *et al.*, 2006a) (Abb. 5a).

Wakamatsu etablierte 1981 die Zelllinie PSM, bei der es sich um amelanotische Melanomzellen aus *Xiphophorus* handelt, die Xmrk überexprimieren (Wakamatsu, 1981). Die konstitutive Aktivität erschwert jedoch die Untersuchung der Xmrk-spezifischen Signalwege. Um eine induzierbare Version von Xmrk zu erhalten, wurde daher eine Chimäre konstruiert, bei der die extrazelluläre Domäne von Xmrk durch den orthologen Bereich des humanen EGF-Rezeptors ("HER") ersetzt wurde (Wittbrodt *et al.*, 1992).

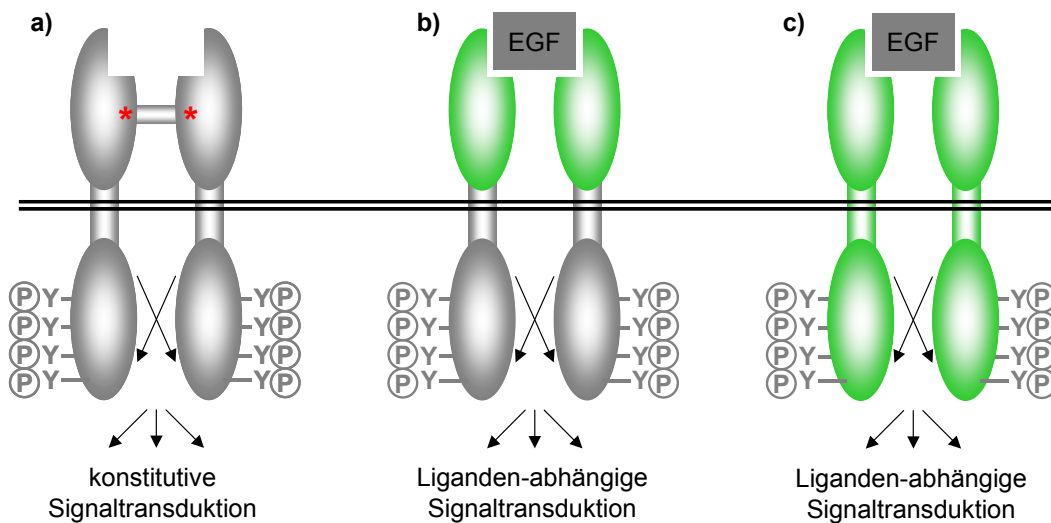


Abb. 5. HERmrk als Chimäre aus Xmrk und HER. **(a)** Mutationen in der extrazellulären Domäne führen zur Liganden-unabhängigen Dimerisierung von Xmrk und konstitutiver Signaltransduktion des Rezeptors. **(b)** HERmrk besteht aus dem extrazellulären Teil des humanen EGF-Rezeptors (HER) und dem intrazellulären Teil von Xmrk (mrk). Stimulierung des Rezeptors mit humanem EGF induziert die Signaltransduktion. **(c)** Bindung des Liganden EGF an den humanen EGF-Rezeptor (HER) resultiert in dessen Aktivierung und Signaltransduktion.

Während intrazelluläre Interaktionspartner und somit die Signaltransduktion der des ursprünglichen Rezeptors Xmrk entsprechen, kann die Dimerisierung und damit Kinase-Aktivität des chimären Rezeptors "HERmrk" durch Zugabe von humanem EGF stimuliert werden (Abb. 5b, c). Stabil mit HERmrk transfizierte Maus-Melanozyten (melan a Hm), die selbst keinen eigenen EGFR exprimieren, können zur Aufklärung der Xmrk-abhängigen Signaltransduktion genutzt werden (Wellbrock *et al.*, 2002b).

Xmrk-abhängige Signaltransduktion

Xmrk nutzt eine Reihe von Signalwegen, die teilweise mit denen des humanen EGF-Rezeptors überlappen, um einerseits die Proliferation und Migration von Zellen zu fördern und andererseits Apoptose und Differenzierung entgegenzuwirken (Meierjohann & Scharl, 2006) (Abb. 6).

Phosphorylierte Tyrosinreste am Carboxy-Terminus des Rezeptors dienen als Andockstellen für Adaptorproteine mit SH2-Domänen, darunter "growth factor receptor-bound protein 2" (Grb2) (Wellbrock & Scharl, 1999). Die Assoziation von Grb2 an Xmrk hat die Induktion des Ras/Raf/MAPK-Signalweges zur Folge.

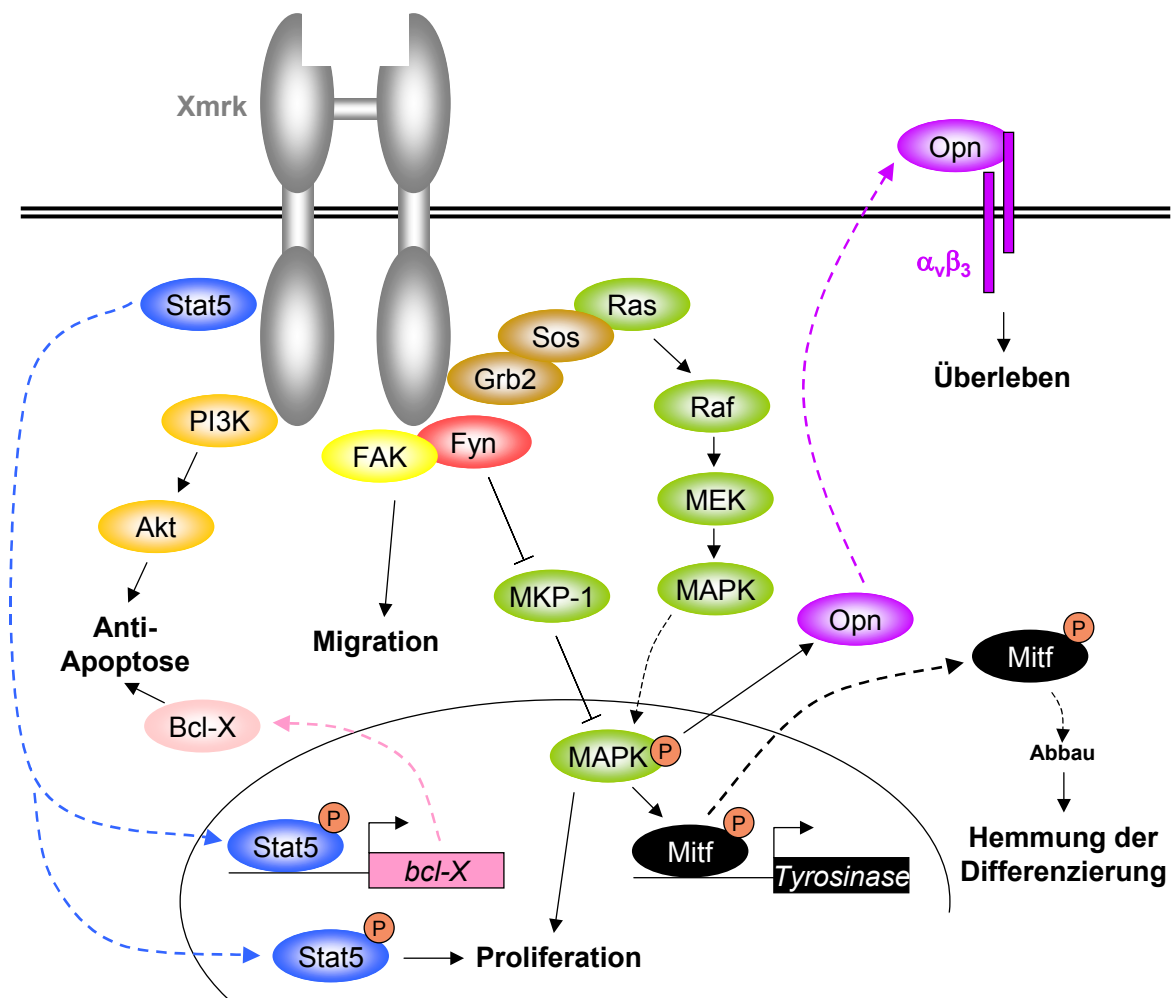


Abb. 6. Modell der Xmrk-abhängigen Signaltransduktion. (Beschreibung im Text)

Aktiviert MAPK erhöht die Proliferationsrate der Zellen, zusätzlich spielt sie eine Rolle bei der Hemmung der Differenzierung von Pigmentzellen. Sie induziert den Abbau des Pigmentzellen-spezifischen Transkriptionsfaktors "microphthalmia associated transcription factor" (Mitf-m), was u.a. zu geringerer Expression des an der Melaninsynthese beteiligten Enzyms Tyrosinase führt (Delfgaauw *et al.*, 2003).

Durch die Ras/Raf/MAPK-Kaskade werden zahlreiche Gene reguliert, unter ihnen *Osteopontin* (*Opn*). Bei dessen Genprodukt *Opn* handelt es sich um ein phosphoryliertes Glykoprotein, das in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird, wo es an Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet und somit einen „Crosstalk“ zwischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Integrin-Rezeptoren herstellt. Auf diesem autokrinen Weg fördert Osteopontin das Überleben der Melanozyten in der extrazellulären Matrix und trägt zum anti-apoptotischen Signalweg während der Melanomprogression bei (Geissinger *et al.*, 2002).

Der Effekt der MAPK wird zusätzlich verstärkt, indem die Src-Kinase Fyn an den C-Terminus von Xmrk bindet und die MAPK-Phosphatase 1 (MKP-1) inhibiert (Wellbrock *et al.*, 2002b). Fyn fungiert darüber hinaus als Adaptor zur Stabilisierung der Interaktion von Xmrk mit der p85-Untereinheit der PI3K. Der resultierende trimere Komplex wirkt durch Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) der Apoptose entgegen (Wellbrock *et al.*, 1999; Wellbrock & Scharl, 2000). Einen weiteren Beitrag dazu leistet der ebenfalls an Xmrk bindende Transkriptionsfaktor "signal transducer and activator of transcription 5" (Stat5), indem er die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-X erhöht (Morcinek *et al.*, 2002).

Xmrk kann außerdem mit der an der Ausbildung fokaler Kontakte beteiligten Tyrosinkinase "focal adhesion kinase" (FAK) interagieren. Dabei spielt Fyn ebenfalls eine Rolle; möglicherweise verstärkt es die Bindung zwischen dem Rezeptor und FAK und rekrutiert Proteine, die die Aktivität von FAK durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung modulieren. Die resultierende Reduktion der fokalen Kontakte wird von Veränderungen in der Zellform begleitet und führt zur erhöhten Motilität der Zellen (Meierjohann *et al.*, 2006b).

Bedeutung des *Xiphophorus*-Systems in der Melanomforschung

Neben *Xiphophorus* treten Melanome auch in anderen Tieren natürlich und spontan auf, z.B. in Hunden, Pferden, Minischweinen und Opossums (Kusewitt & Ley, 1996; Bardeesy *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). Bei Mäusen hingegen sind die Melanozyten statt in der Epidermis in den Haarfollikeln lokalisiert und so vor der spontanen Melanomgenese geschützt. Es wurden jedoch transgene Mäuse generiert, in denen es durch ein verändertes "Homing" der Melanozyten oder durch Einführung eines Onkogens und gleichzeitige Inaktivierung eines Tumorsuppressors zur malignen Transformation kommt (Merlino & Noonan, 2003; Chin *et al.*, 1997; Kannan *et al.*, 2003). Die Identifizierung von Faktoren, die die Melanomgenese auslösen, ist in diesen Mausmodellen allerdings aufgrund des undefinierten genetischen Hintergrundes problematisch.

Da im *Xiphophorus*-Modell vor einem gut definierten genetischen Hintergrund ein einzelnes Onkogen Auslöser für die natürliche und spontane Entwicklung von Melanomen ist, stellt dieses System ein wertvolles und bereits gut etabliertes Tiermodell in der Melanomforschung dar (Meierjohann & Scharl, 2006). Dieses Modell konnte bereits erfolgreich zur Aufklärung der Progression humaner Melanome eingesetzt werden. So nutzt Xmrk zur Vermittlung seines onkogenen Potenzials Signalwege, die häufig auch in humanen Melanomen dereguliert sind, nämlich die RAS/RAF/MAPK-Kaskade und den PI3K/Akt-Weg.

Darüber hinaus wurden im *Xiphophorus*-Melanom-Modell Moleküle identifiziert, die an der Xmrk-vermittelten Melanogenese beteiligt sind und zuvor noch nicht in Melanomen untersucht worden waren. Eines davon ist Stat5, das nach Aktivierung durch Xmrk anti-apoptotische Effekte auslöst (Morcinek *et al.*, 2002). Spätere Studien konnten diese Rolle des Transkriptionsfaktors in humanen Melanomen bestätigen und zusätzlich eine wichtige Bedeutung von STAT5 in der Resistenz humaner Melanome gegenüber der Interferon alpha (IFN α)-Therapie herausstellen (Wellbrock *et al.*, 2005).

Eine weitere Parallele zu humanen Melanomen ergab sich aus Untersuchungen zu Osteopontin, das durch Xmrk verstärkt synthetisiert und sezerniert wird und an invasiven und metastatischen Prozessen beteiligt ist (Geissinger *et al.*, 2002). Eine Korrelation zwischen der Expression von Osteopontin und der Invasivität von Melanomzellen konnte später auch für humane Melanome gezeigt werden (Zhou *et al.*, 2005).

Auf diesen Erkenntnissen basiert die Annahme, dass eine weitere Erforschung des durch Xmrk induzierten Signalnetzwerkes Aufschlüsse über die molekularen Prozesse in der Initiation und Progression humaner Melanome geben kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war, mit Hilfe von Genexpressionsanalysen sowie Protein-Protein-Interaktionsstudien Einblicke in die Xmrk-abhängige Signaltransduktion zu erhalten.

1.3. Analyse der Xmrk-abhängigen Signaltransduktion

Microarray-Technologie

Die Microarray-Technologie wurde erstmals 1994 beschrieben (Drmanac & Drmanac, 1994). Ausgelöst wurde ihre Entwicklung durch das Humane Genomprojekt in der Absicht, alle Gene zu katalogisieren, zu kartieren und zu sequenzieren und ihre Expression in individuellen Zellen zu definieren.

Microarray-Genanalysen können angewandt werden, um Schlüsselgene zu identifizieren, die in die Tumorgenese involviert sind (Kim *et al.*, 2002). Sie dienten in der Vergangenheit beispielsweise der Suche nach Unterschieden in der Genexpression von Tumorsuppressorgenen in humanen Melanomzelllinien, der Klassifizierung maligner Melanome oder der Identifizierung differenziell exprimierter Gene in hochaggressiven uvealen Melanomen verglichen mit Melanomen geringer Aggressivität (DeRisi *et al.*, 1996; Bittner *et al.*, 2000; Seftor *et al.*, 2002).

Die Xmrk-abhängige Signaltransduktion kann spezifisch induziert werden, indem der chimäre Rezeptor HERmrk in melan a Hm-Zellen durch humanes EGF aktiviert wird. Die Microarray-Technologie sollte den direkten Vergleich von Genexpressionsprofilen stimulierter Zellen mit denen unstimulierter Zellen erlauben und damit Aufschluss über die spezifisch durch Xmrk regulierten Gene geben.

Protein-Protein-Interaktionsstudien

Ein anderer Ansatz zur Analyse der Xmrk-abhängigen Signaltransduktion ist die Suche nach weiteren Proteinen, die neben den bereits bekannten Interaktionspartnern Stat5, Grb2, FAK, Fyn und PI3K mit Xmrk wechselwirken.

Eine klassische Methode zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen ist das Gal4p-basierte Zweihybrid-System in *Saccharomyces cerevisiae* (Fields & Song, 1989) (Abb. 7). Als Hauptvorteil des Zweihybrid-Systems gilt, dass Interaktionen *in vivo* bestimmt werden. Da der Assay für viele verschiedene Proteinpaare optimiert werden kann, lässt er sich leicht automatisieren. Diese Anwendung ermöglichte z.B. die Erstellung umfassender Interaktionsnetzwerke in *Saccharomyces cerevisiae*, *Helicobacter pylori* und *Caenorhabditis elegans* (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Rain *et al.*, 2001; Walhout *et al.*, 2000).

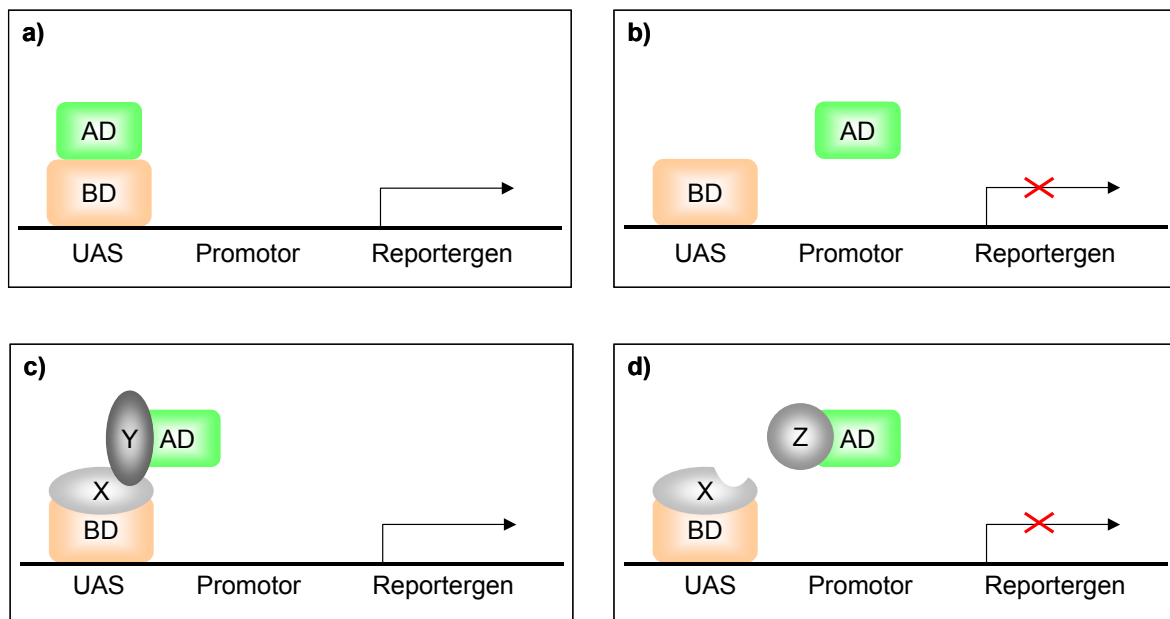


Abb. 7. Die Zwei-Hybrid-Technologie nach Fields & Song (1989). **(a)** Die DNA-Bindedomäne (BD) des Transkriptionsfaktors GAL4p interagiert mit stromaufwärts vom Transkriptionsstart gelegenen Erkennungssequenzen ("upstream activation sequences", UAS) innerhalb der DNA. Die Aktivierungsdomäne (AD) aktiviert die Transkription, wenn sie durch Vermittlung der BD an die UAS rekrutiert wird. **(b)** Werden die beiden Domänen experimentell getrennt exprimiert, wirkt Gal4p nicht transaktivierend. **(c)** Fusionierung zweier miteinander interagierender Proteine X (Köder oder "bait") und Y (Beute oder "prey") an die BD bzw. AD führt zur Wiederherstellung des funktionalen Transkriptionsfaktors und somit zur Expression eines Reportergens. **(d)** Interagieren die Hybridproteine nicht, wird das Reporter-gen nicht exprimiert.

Andererseits ist das Zwei-Hybrid-System in seiner Anwendbarkeit limitiert, wenn es sich bei den Interaktionspartnern um Membranproteine handelt (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). Obwohl bestimmte Membranprotein-Interaktionen erfolgreich detektiert werden konnten (Geisler *et al.*, 2003; Teutschbein *et al.*, im Druck), wurde postuliert, dass andere Methoden besser geeignet sind, um die Assoziation von integralen Membranproteinen mit zytoplasmatischen und/oder integralen Membranproteinen zu identifizieren, z.B. das Split-Ubiquitin-System (Johnsson & Varshavsky, 1994; Stagljar & Fields, 2002; Reichel & Johnsson, 2005) (Abb. 8).

Beispiele für die erfolgreiche Anwendung des Split-Ubiquitin-Systems mit Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase (rUra3) als Reporter reichen von Proteinen des Zellkerns bis hin zu Membranproteinen aus endoplasmatischem Reticulum, Chloroplasten, Peroxisomen oder Mitochondrien (Wittke *et al.*, 1999a; Wittke *et al.*, 2000; Gromöller & Lehming, 2000; Deslandes *et al.*, 2003; Eckert & Johnsson, 2003; Pasch *et al.*, 2005; Nikko & André, 2007).

Daher erscheint das Split-Ubiquitin-System als geeignete Methode sowohl für einen Screen nach Proteinen, die mit dem integralen Membranprotein Xmrk wechselwirken, als auch für eine detaillierte Analyse der Interaktion zwischen den membranassoziierten Proteinen FAK und Fyn.

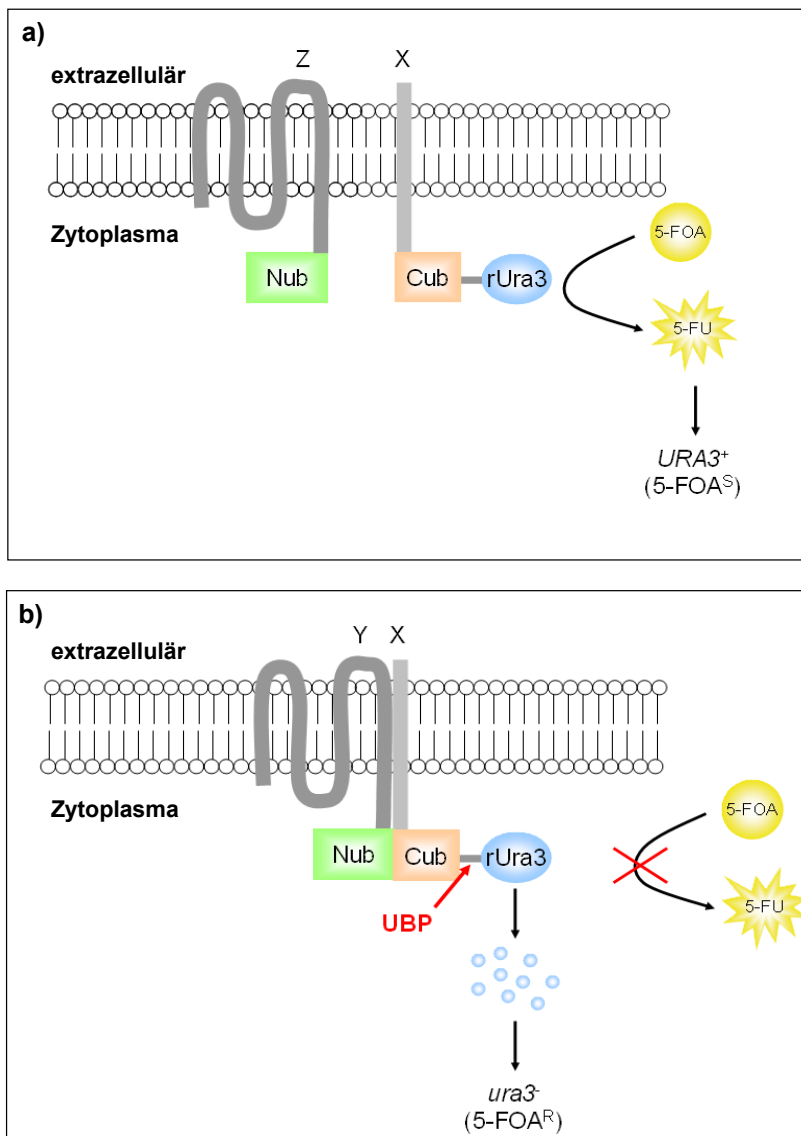


Abb. 8. Die Split-Ubiquitin-Technologie (Johnsson & Varshavsky, 1994; Reichel & Johnsson, 2005). **(a)** Artifizell getrennt exprimierte Domänen von Ubiquitin (N_{Ub} und C_{Ub}) werden von Ubiquitin-spezifischen Proteasen (UBP) nicht als Substrat erkannt. Das an C_{Ub} fusionierte Reporterprotein rUra3, eine instabile Version der Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase, setzt 5-Fluoro-Orotat (5-FOA) in die toxische Verbindung 5-Fluoro-Uracil (5-FU) um. Hefezellen, in denen die an N_{Ub} und C_{Ub} fusionierten Proteine X und Y nicht interagieren, sind sensitiv gegenüber 5-FOA (5-FOA^S) und können auf dem entsprechenden Medium nicht wachsen. **(b)** Interaktion der N_{Ub} - bzw. C_{Ub} -gekoppelten Proteine X und Y führt zur Rekonstitution von Ubiquitin, UBP-vermittelter Abspaltung und Abbau des Reporters rUra3, sodass 5-FOA nicht mehr zu 5-FU umgesetzt wird und die Hefezellen auf 5-FOA- und Uracil-haltigem Medium überleben können (5-FOA^R).

1.4. Zielstellung der Arbeit

Das *Xiphophorus*-Melanom-Modell dient der Erforschung des Signaltransduktions-Netzwerkes, das zur neoplastischen Transformation von Melanozyten führt. Im Gegensatz zu den meisten Tumorzellen reicht beim *Xiphophorus*-Melanom ein einziges mutiertes Gen zur Ausprägung des malignen Phänotyps aus. Nachdem der mutierte EGF-Rezeptor Xmrk als alleiniger Auslöser der Melanomentstehung in diesen Fischen identifiziert wurde, konzentrierte sich das Interesse auf die durch ihn induzierte Signaltransduktion. Abbildung 6 gibt einen Überblick über die bisher bekannten Signalwege; ein wesentlich komplexeres Netzwerk ist jedoch wahrscheinlich für alle mit der Melanomentstehung und –progression zusammenhängenden Prozesse nötig. Aufschluss über die Beteiligung weiterer Faktoren können Genexpressionsanalysen und Protein-Protein-Interaktionsstudien geben.

Um gezielt nach Signalwegen zu suchen, die durch Xmrk induziert werden, sollte die Genexpression in HERmrk-transfizierten Maus-Melanozyten vor und nach EGF-Stimulierung des Rezeptors mithilfe der Microarray-Technologie analysiert werden. Durch quantitative real-time PCR sowie durch Western Blotting sollte die differenzielle Expression dabei gefundener Kandidaten verifiziert und darüber hinaus ihr Status in humanen Melanomzelllinien untersucht werden. Die für die Induktion der Genexpression verantwortlichen Signalwege sollten durch Analyse der RNA-Level nach Hemmung diverser Komponenten dieser Signalwege mit Hilfe niedermolekularer Inhibitoren bzw. siRNA bestimmt werden.

Ein anderer Ansatz zur Identifizierung Xmrk-abhängiger Signalwege ist die Suche nach Interaktionspartnern des Rezeptors. Dazu sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Split-Ubiquitin-Technologie in *S. cerevisiae* für Xmrk als "bait" (Köder) etabliert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die auf Zweihybrid-Methoden basierende Analyse der Wechselwirkung zwischen den Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen FAK und Fyn, die bei der Xmrk-vermittelten Migration von Pigmentzellen eine Rolle spielen.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. Regulation der Genexpression durch Xmrk

Microarray-Analyse der differentiellen Genexpression

Die Expression von Xmrk resultiert in konstitutiven Signalen, die die Proliferation und Migration von Zellen fördern und der Apoptose und Differenzierung entgegenwirken (Meierjohann & Scharl, 2006). In Zellen, die den chimären Rezeptor HERmrk exprimieren, können diese Signalwege durch Stimulierung mit humanem EGF induziert werden. Der Vergleich der Genexpressionsmuster nach und vor der Rezeptoraktivierung gibt somit Aufschluss darüber, welche Signalwege spezifisch durch Xmrk induziert werden.

Um den zeitlichen Verlauf der Genregulation durch Xmrk darzustellen, wurden melan a Hm-Zellen, die 15 Minuten, 1h, 2h, 4h, 8h bzw. 24h stimuliert wurden, mit unstimulierten Zellen verglichen. Die Rezeptoraktivität wurde anhand von Western Blots überprüft, welche die Phosphorylierung von HERmrk und MAPK nach EGF-Zugabe zeigten. Mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) wurde außerdem eine erhöhte Expression von Osteopontin infolge der Rezeptorstimulierung nachgewiesen (Teutschbein *et al.*, Manuskript B.1).

Die Microarray-Analyse wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Martin Eilers am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Universität Marburg durchgeführt. Eine Mischung der RNA aus den zu sieben verschiedenen Zeitpunkten geernteten Zellen diente als Referenz, wurde amplifiziert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gelabelt. Die amplifizierte RNA der einzelnen Zeitpunkte wurde jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff, Cy5, markiert, anschließend erfolgte die Hybridisierung im sogenannten "Sandwich"-Verfahren. Hierbei wurde anstelle eines Deckgläschens ein zweiter Chip verwendet, so dass ein technisches Replikat entstand und Informationen über die Reproduzierbarkeit der einzelnen Spots gewonnen werden konnten. Während der Image-Analyse wurden für jeden Spot mittlere Signal- und Hintergrund-Intensitäten für beide Kanäle (Cy3 und Cy5) erhalten. Um die Intensitätsunterschiede der einzelnen Spots zu ermitteln, wurde das Verhältnis der zwei Kanäle unter Berücksichtigung der Hintergrundsignale berechnet. Hierzu wurden MA-Plots genutzt mit $M = \log_2 R/G$ und $A = \log_2 \sqrt{R/G}$ (Dudoit *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2001). R und G stehen für die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für Cy5 bzw. Cy3 nach Abzug des entsprechenden Hintergrunds. Da die Effizienz des Labels von Proben mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlich ist, wurden die Rohdaten standardisiert wie

von Yang und Kollegen beschrieben, um die Intensitäten für die zwei verwendeten Farbstoffe Cy3 und Cy5 auszugleichen (Yang *et al.*, 2001). In die Auswertung der differentiellen Genexpression wurden nur Arrays hoher Qualität, d.h. entsprechend hoher Reproduzierbarkeit und Wertigkeit, einbezogen. Die Reproduzierbarkeit lässt sich anhand der M-Werte der Replikate überprüfen, die Wertigkeit berechnet sich aus Sättigung und Homogenität des Signals sowie dessen Intensität im Vergleich zum Hintergrundsignal. Spots, bei denen die Differenz zwischen den Replikaten innerhalb eines Sandwiches 75% des M-Wertes überschritt, wurden von weiteren Studien ausgeschlossen, ebenso Spots mit einer Wertigkeit unter 0,1. Datensätze, bei denen die mittlere Intensität A weniger als 7,95 betrug, und solche, bei denen für den Zeitpunkt 0 kein Ergebnis vorlag, wurden ebenfalls aussortiert.

Von ursprünglich 21.168 cDNA-Spots auf dem Chip blieben nach dieser qualitativen Selektion 6.240 übrig. Eine quantitative Selektion von Genen, die an einem oder mehreren Zeitpunkten mindestens zweifach reguliert sind, resultierte in 1.273 Kandidaten. Die Gruppierung der Kandidaten entsprechend ihrer molekularen Funktion bzw. der biologischen Prozesse, in die sie involviert sind, und eine "expression analysis systematic explorer" (EASE)-Analyse dieser Kategorien ergab, dass die regulierten Gene in Gruppen wie z.B. Zelltod, Zell-Matrix-Adhäsion oder Translationsinitiationsfaktor-Aktivität angereichert waren (Teutschbein *et al.*, Manuskript B.1).

Für weitere Untersuchungen wurden 33 Gene ausgewählt, die mehr als vierfach reguliert waren und denen eine UniGene ID zugeordnet werden konnte (Tab. 1).

Name	Gensymbol	Unigene ID	Chip ID	durch Xmrk induzierte Expressionsänderung						molekulare Funktion	biologischer Prozess
				15min	1h	2h	4h	8h	24h		
vorwiegend herabregulierte Gene											
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	<i>Dnajc7</i>	Mm.258140	H3018D08	0.119	0.997	1.123	1.244	1.308	1.308	Chaperon	Proteinmetabolismus
RIKEN cDNA 5730557B15 gene, transcript variant 1	<i>5730557B15Rik</i>	Mm.102470	H4079F11	0.212	0.481	0.847	1.449	1.356	0.995	Proteinbindung	unbekannt
Phospholamban	<i>Pln</i>	Mm.34145	H4026F02	0.236	0.472	0.629	1.110	0.860	0.568	Ionenkanal	Zellkommunikation; Signaltransduktion
MKIAA3006 protein	<i>9030612M13Rik</i>	Mm.38813	H4076F11	0.245	0.432	0.791	1.234	0.952	0.654	unbekannt	Regulation der Transkription
SEC22 vesicle trafficking protein-like 1	<i>Sec22l1</i>	Mm.2551	H4073F09	0.247	0.525	0.997	1.053	0.767	0.667	Transporter	Transport vom endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat
MKIAA4072 protein	<i>Mbnl2</i>	Mm.238266	H4018D01	0.250	0.510	0.468	0.746	0.604	0.485	RNA-Bindung	Regulation des Nukleinsäuremetabolismus
Son of sevenless homolog 1	<i>Sos1</i>	Mm.60975	H4078C07	0.813	0.623	0.709	0.348	0.209	0.232	Guanylnukleotid-Austauschfaktor	Zellkommunikation; Signaltransduktion
MAD homolog 9	<i>Smad9</i>	Mm.244353	H4017B03	NA	0.418	0.560	0.451	0.396	0.048	unbekannt	Regulation der Transkription
WAP four-disulfide core domain 1	<i>Wfdc1</i>	Mm.87599	H3140F05	1.030	0.914	1.010	0.297	1.074	0.071	Proteaseinhibitor	Zellkommunikation; Signaltransduktion
Hemoglobin alpha, adult chain 1	<i>Hba-a1</i>	Mm.196110	H3125H11	1.856	1.487	1.544	NA	1.660	0.109	Proteinbindung, Transporter	Transport
Ring finger protein 11	<i>Rnf11</i>	Mm.172605	H3035B05	NA	0.699	0.543	0.525	0.307	0.169	Proteinbindung; Ubiquitin-spezifische Protease	Proteinmetabolismus
Dystroglycan 1	<i>Dag1</i>	Mm.7524	H3008B05	1.945	0.873	0.809	0.531	0.438	0.186	Proteinbindung, Zelladhäsion	Zellkommunikation; Signaltransduktion
RIKEN cDNA 2600011C06 gene	<i>2600011C06Rik</i>	Mm.46005	H3023A06	0.950	0.446	0.559	0.466	0.363	0.189	Nukleinsäure-Bindung	unbekannt
Protein kinase, lysine deficient 1	<i>Prkwnk1</i>	Mm.333349	H3049H10	0.812	0.697	0.704	0.523	0.332	0.190	Serin/Threonin-Proteinkinase	unbekannt
Ubiquitin-conjugating enzyme E2l	<i>Ube2l</i>	Mm.240044	H3026H06	0.787	0.709	0.664	0.523	0.445	0.193	Proteinbindung; Ubiquitin-konjugierendes Enzym	Proteinmetabolismus
CDNA clone IMAGE:6514950	NA	Mm.125975	H4018C03	0.308	0.366	0.757	0.578	0.358	0.225	unbekannt	unbekannt
neural-restrictive silencer factor	<i>Rest</i>	Mm.28840	H3153C03	NA	0.629	0.682	0.473	0.526	0.235	DNA-Bindung; Regulation der Transkription	Regulation der Transkription
HSP86 heat-shock protein	<i>Hspca</i>	Mm.1843	H3009C07	NA	0.589	0.586	0.493	0.526	0.246	Chaperon	Proteinmetabolismus
vorwiegend hochregulierte Gene											
Early growth response 1	<i>Egr1</i>	Mm.181959	H3092E09	7.600	14.221	4.630	3.430	1.741	1.057	DNA-Bindung, Transkriptionsfaktor	Regulation der Transkription
Cysteine rich angiogenic inducer 61	<i>Cyr61</i>	Mm.1231	H4065G04	5.856	6.453	1.147	0.669	0.678	0.497	Strukturprotein der extrazellulären Matrix	Zellkommunikation; Signaltransduktion
Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1, transcript variant 2	<i>Tacc1</i>	Mm.308452	H4004B07	5.238	1.663	1.141	1.127	1.264	1.272	unbekannt	Zellkommunikation; Signaltransduktion
Growth hormone inducible transmembrane protein	<i>Ghitm</i>	Mm.182912	H3136F05	5.216	1.483	1.201	0.954	1.272	1.375	unbekannt	unbekannt
Semaphorin 6D, transcript variant 5	<i>Sema6d</i>	Mm.330536	H4012A11	5.025	1.423	0.985	0.771	0.916	0.943	Rezeptorbindung	Zellkommunikation; Signaltransduktion
Lost on transformation protein 1	<i>Plagl1</i>	Mm.287857	H3118H02	4.857	1.597	1.403	0.955	0.418	0.964	Regulation der Transkription	Apoptose
Scotin gene, transcript variant 2	<i>Scotin</i>	Mm.196533	H3136D06	4.633	1.583	1.278	1.315	1.581	1.381	DNA-Bindung; Signaltransduktion	Apoptose
Dual specificity phosphatase 4	<i>Dusp4</i>	Mm.170276	H4031E01	4.438	2.799	2.683	1.656	1.418	1.937	Tyrosin/Serine/Threonin-Proteinphosphatase	Zellkommunikation; Signaltransduktion
14-3-3 protein, zeta polypeptide	<i>14-3-3 zeta</i>	Mm.3360	H4052H03	4.429	1.893	1.605	1.471	1.574	1.539	Rezeptorsignalkomplex-Gerüstprotein	Zellkommunikation; Signaltransduktion
Fos-like antigen 1	<i>Fosl1</i>	Mm.6215	H3008B11	2.338	2.537	4.112	3.449	2.955	2.184	DNA-Bindung; Transkriptionsfaktor	Regulation der Transkription
Epithelial membrane protein 1	<i>Emp1</i>	Mm.182785	H4067D11	2.459	1.916	2.914	7.160	7.727	5.095	unbekannt	Zellwachstum
Osteopontin	<i>Opn</i>	Mm.288474	H3082C12	1.649	1.264	2.124	2.918	6.409	3.546	Zelladhäsion	Zelltod; Zell-Matrix-Adhäsion
12 days embryo female mullerian duct includes surrounding region cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6820438B06 product:unclassifiable, full insert sequence	NA	Mm.204306	H4042F05	0.590	0.824	2.244	3.543	4.170	4.061	unbekannt	unbekannt
Insulin-like growth factor binding protein 3	<i>Igfbp3</i>	Mm.380693	H3154G07	1.992	1.179	1.281	2.856	4.093	2.021	Wachstumsfaktor-Bindung	Zellkommunikation; Signaltransduktion; Apoptose
Tumor-associated antigen L6	<i>Taal6</i>	Mm.856	H3098B01	2.127	1.634	2.157	3.285	4.017	3.333	unbekannt	Zellkommunikation; Signaltransduktion

Tab. 1. Ergebnisse der Microarray-Analyse für 33 stark regulierte Gene. Die fett gedruckte Werte kennzeichnen die mehr als vierfache Regulation.

Validierung der Microarray-Ergebnisse

Mittels qPCR sollten die Microarray-Ergebnisse für die 33 selektierten Gene validiert werden. Elf Gene wiesen eine mindestens zweifache Regulation an mindestens einem Zeitpunkt und einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie in der Microarray-Analyse auf und wurden daher für weitere Analysen ausgewählt (Tab. 2; [Teutschbein et al.](#), Manuskript B.1). Die qPCR-Ergebnisse für die übrigen Gene sind in Abbildung 9 dargestellt.

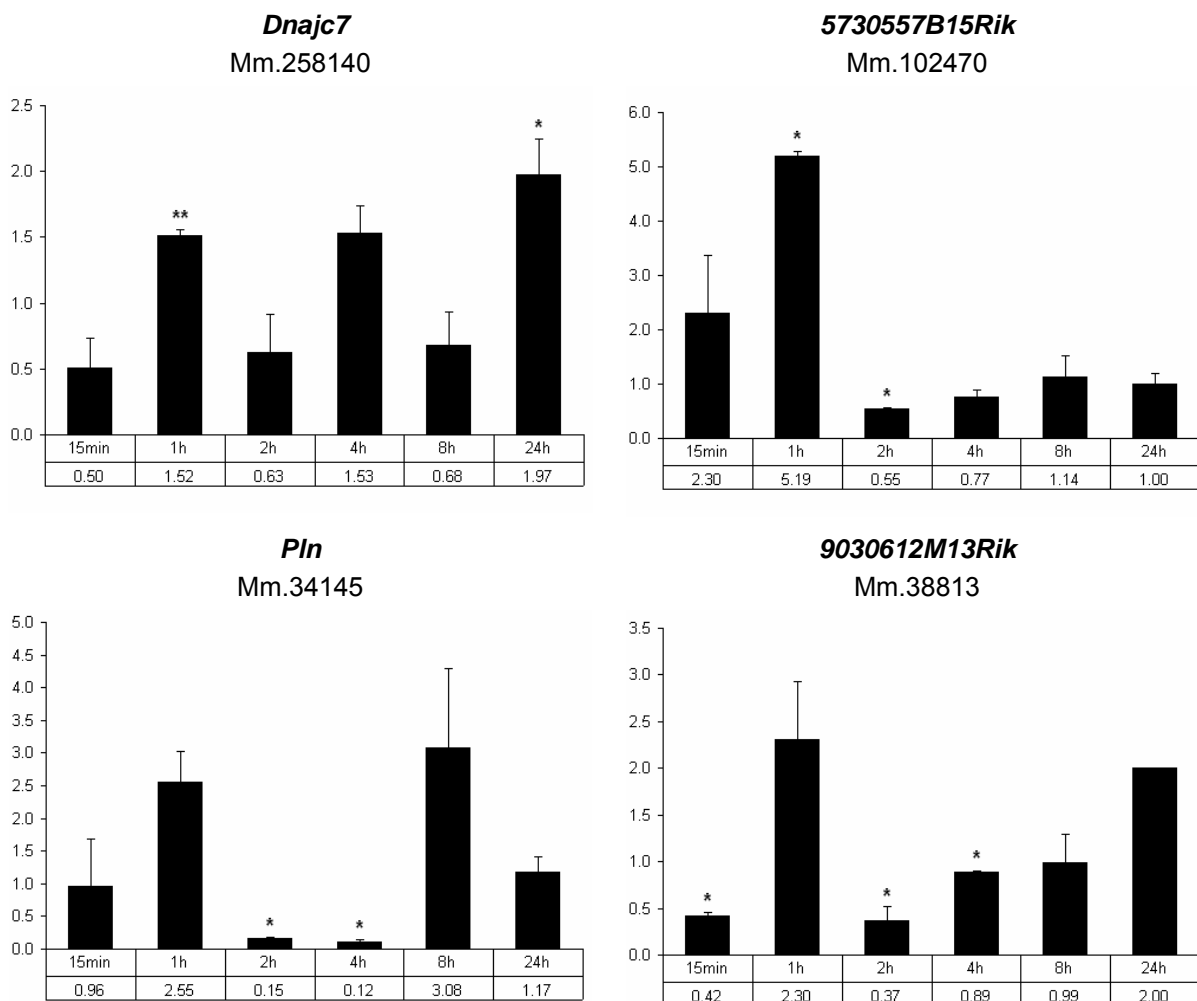


Abb. 9. Validierung der Microarray-Daten durch quantitative real-time PCR, durchgeführt wie in [Teutschbein et al.](#) (Manuskript B.1) beschrieben. Signifikante ($p < 0,05$) und hochsignifikante ($p < 0,001$) Ergebnisse sind mit einem bzw. zwei Sternen markiert (Student t-Test, gepaart, einseitig). Für *Mbnl2*, *Smad9*, *Tacc1*, *Ghitm*, *Scotin* und *14-3-3 zeta* liegen aus Mangel an geeigneten Oligonukleotiden keine Daten vor. Die Ergebnisse für *Sos1*, *Ube2i*, *Cyr61*, *Egr1*, *Dusp4*, *Igfbp3*, *Fosl1*, *Emp1*, *Opn*, Mm.204306 und *Taal6* sind in [Teutschbein et al.](#) (Manuskript B.1) dargestellt. Die vollen Namen der Gene sind in Tabelle 2 aufgeführt.

(Fortsetzung der Abbildung auf den folgenden Seiten)

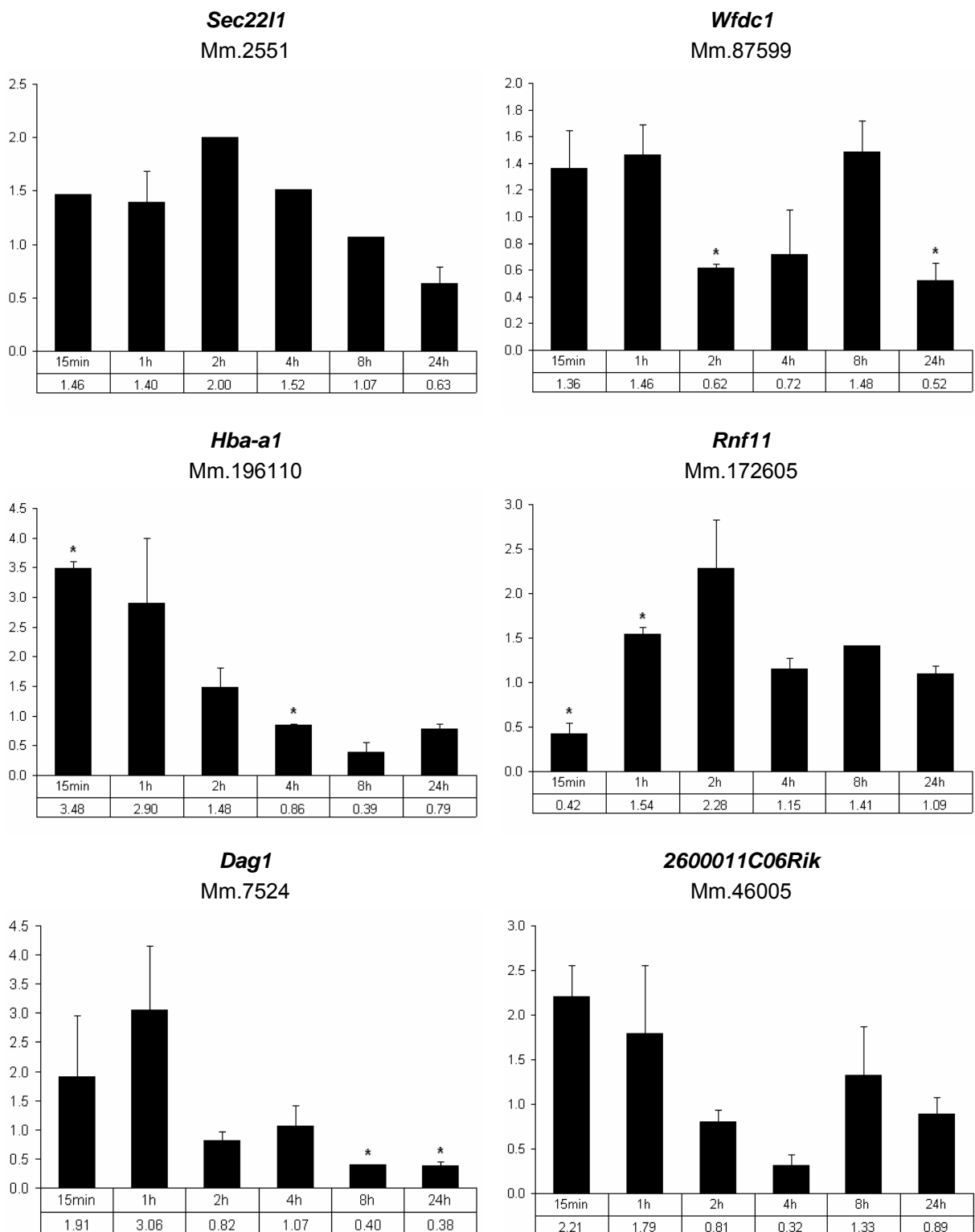


Abb. 9. (Fortsetzung)

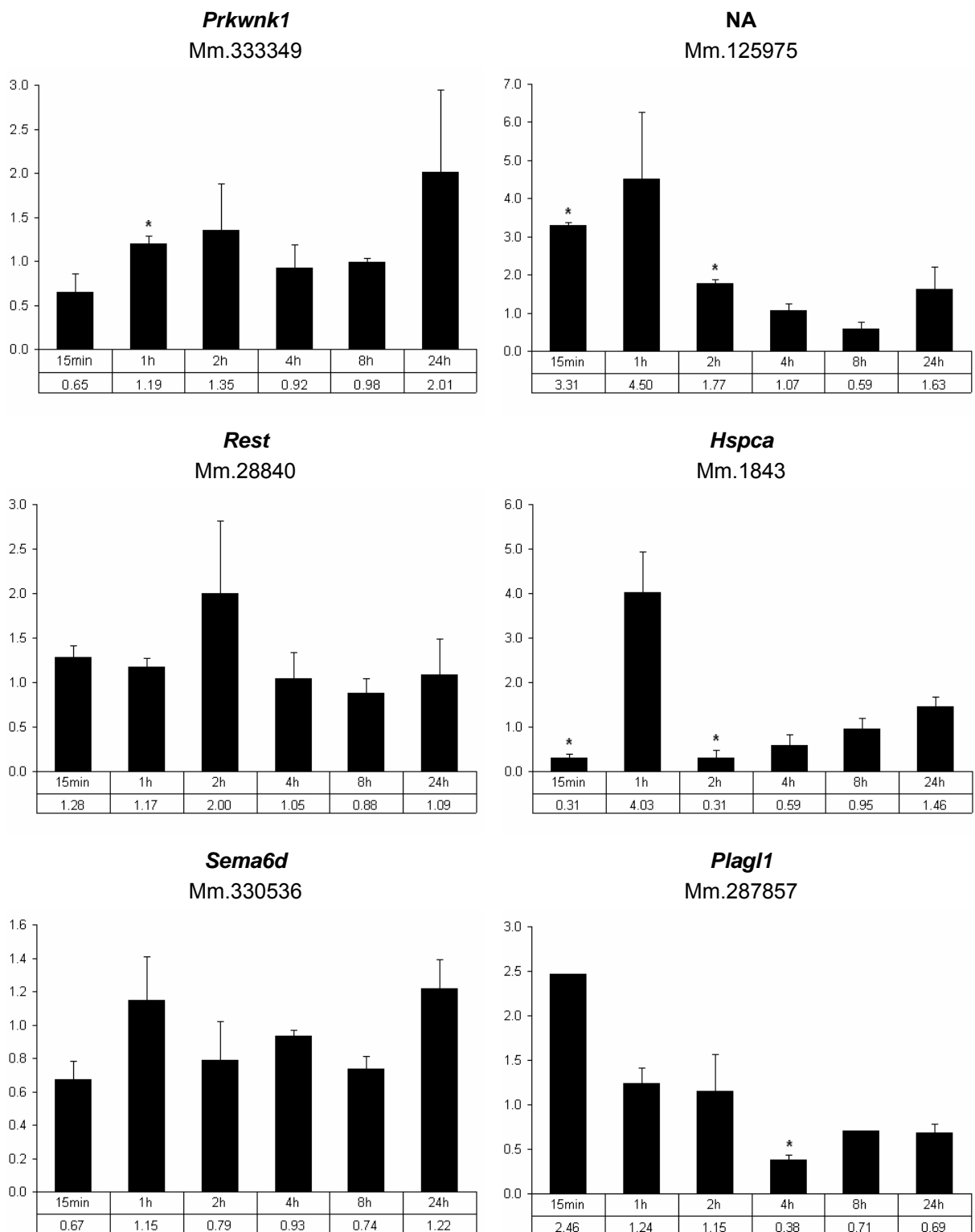


Abb. 9. (Fortsetzung)

Name	Symbol	Unigene ID	>2 reguliert in qPCR	weitere Analysen
vorwiegend herabregulierte Gene				
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	<i>Dnajc7</i>	Mm.258140	nein	
RIKEN cDNA 5730557B15 gene, transcript variant 1	<i>5730557B15Rik</i>	Mm.102470	ja	
Phospholamban (Pln)	<i>Pln</i>	Mm.34145	ja	
MKIAA3006 protein	<i>9030612M13Rik</i>	Mm.38813	ja	
SEC22 vesicle trafficking protein-like 1	<i>Sec22l1</i>	Mm.2551	nein	
MKIAA4072 protein	<i>Mbnl2</i>	Mm.238266	n.d.	
Son of sevenless homolog 1	<i>Sos1</i>	Mm.60975	ja	X
MAD homolog 9	<i>Smad9</i>	Mm.244353	n.d.	
WAP four-disulfide core domain 1	<i>Wfdc1</i>	Mm.87599	nein	
Hemoglobin alpha, adult chain 1	<i>Hba-a1</i>	Mm.196110	ja	
Ring finger protein 11	<i>Rnf11</i>	Mm.24846	ja	
Dystroglycan 1	<i>Dag1</i>	Mm.7524	ja	
RIKEN cDNA 2600011C06 gene	<i>2600011C06Rik</i>	Mm.46005	ja	
Protein kinase, lysine deficient 1	<i>Prkwnk1</i>	Mm.333349	ja	
Ubiquitin-conjugating enzyme E2I	<i>Ube2i</i>	Mm.240044	ja	X
CDNA clone IMAGE:6514950	NA	Mm.125975	ja	
neural-restrictive silencer factor	<i>Rest</i>	Mm.28840	ja	
HSP86 heat-shock protein	<i>Hspca</i>	Mm.1843	ja	
vorwiegend hochregulierte Gene				
Early growth response 1	<i>Egr1</i>	Mm.30534	ja	X
Cysteine rich protein 61	<i>Cyr61</i>	Mm.1231	ja	X
Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1, transcript variant 2	<i>Tacc1</i>	Mm.308452	n.d.	
Growth hormone inducible transmembrane protein	<i>Ghitm</i>	Mm.182912	n.d.	
Semaphorin 6D, transcript variant 5	<i>Sema6d</i>	Mm.330536	nein	
Lost on transformation protein 1	<i>Plagl1</i>	Mm.287857	ja	
Scotin gene, transcript variant 2	<i>Scotin</i>	Mm.196533	n.d.	
Dual specificity phosphatase 4	<i>Dusp4</i>	Mm.170276	ja	X
14-3-3 protein, zeta polypeptide	<i>14-3-3 zeta</i>	Mm.3360	n.d.	
Fos-like antigen 1	<i>Fosl1</i>	Mm.6215	ja	X
Epithelial membrane protein 1	<i>Emp1</i>	Mm.182785	ja	X
Osteopontin	<i>Opn</i>	Mm.288474	ja	X
12 days embryo female mullerian duct includes surrounding region cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6820438B06 product:unclassifiable, full insert sequence	NA	Mm.204306	ja	X
Insulin-like growth factor binding protein 3	<i>Igfbp3</i>	Mm.380693	ja	X
Tumor-associated antigen L6	<i>Taal6</i>	Mm.856	ja	X

Tab. 2. Zusammenfassung der qPCR-Ergebnisse.

Die Regulierung der Expression von sechs der elf Kandidaten wurde mittels Western Blots auch auf Proteinebene analysiert (Abb. 10). Diese sechs Kandidaten wurden aufgrund ihrer starken Regulation und ihrer Zugehörigkeit zu interessanten Funktionsgruppen wie Transkriptionsfaktoren (FOSL1 und EGR1), sezernierte Proteine (OPN und IGFBP3), Phosphatasen (DUSP4) und Tetraspanin-Membranproteine (TAAL6) ausgewählt.

Während FOSL1 in unstimulierten Zellen kaum exprimiert wurde, war nach 2h EGF-Stimulierung eine Proteinbande sichtbar, deren Intensität sich im weiteren Zeitverlauf bis 24h noch erhöhte. EGR1 war bereits vor der Stimulierung detektierbar, 1-24h nach EGF-Zugabe war jedoch deutlich mehr Protein vorhanden. OPN zeigte eine geringe Grundexpression in unstimulierten Zellen, die sich 8h nach EGF-Stimulierung deutlich erhöhte und nach 24h ihr Maximum erreichte. Für IGFBP3, DUSP4 und TAAL6 konnten mit den hier verwendeten Antikörpern keine spezifischen Banden detektiert werden.

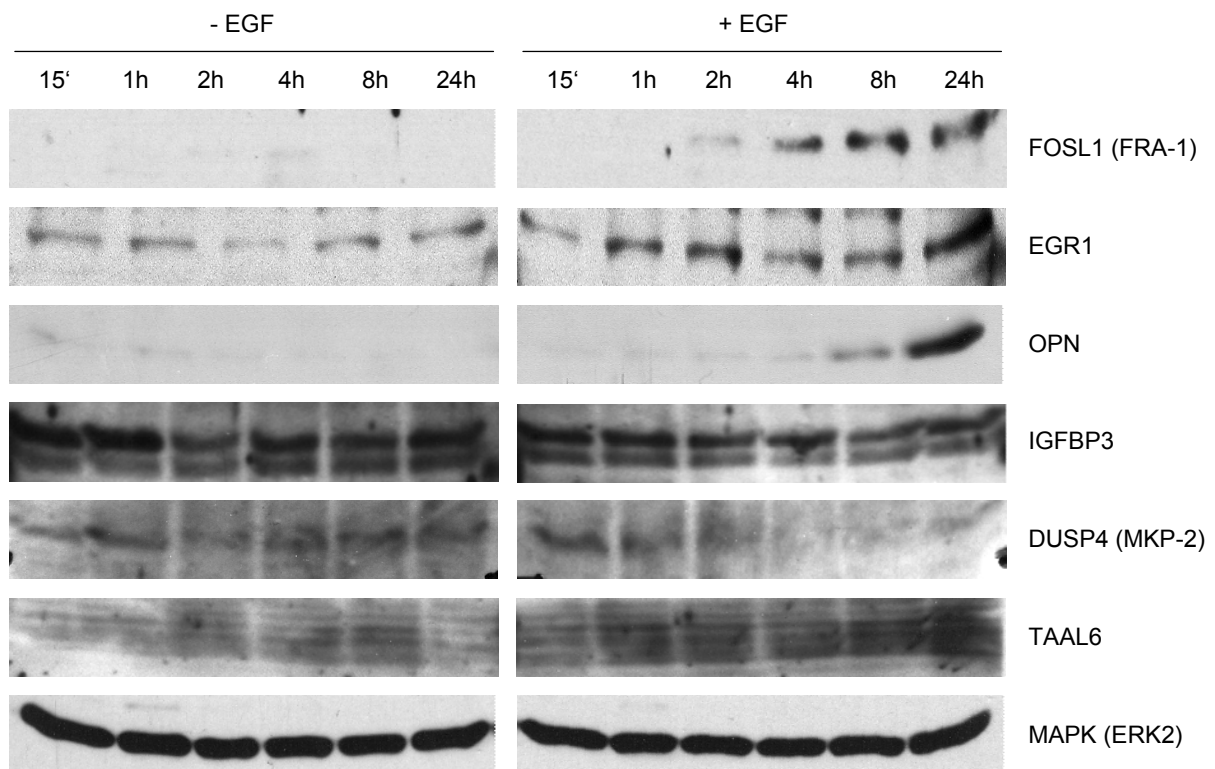


Abb. 10. Western Blot-Analyse der Expression von sechs Genkandidaten in melan a Hm-Zellen. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach EGF-Zugabe geerntet (*rechts*) und mit gleichzeitig geernteten unstimulierten Zellen (*links*) verglichen. Lyse und Western Blots wurden durchgeführt wie von Teutschbein et al. (Manuskript B.1) beschrieben. Die MAPK ERK2 diente als Ladekontrolle.

Identifizierung von Signalwegen

Xmrk nutzt zur Signaltransduktion u.a. den PI3K-Weg und die Ras/Raf/MAPK-Kaskade sowie Stat5 und Fyn (Meierjohann & Scharl, 2006). Um diejenigen Signalwege zu bestimmen, durch welche die Expression der elf ausgewählten Genkandidaten moduliert wird, wurden niedermolekulare Inhibitoren verwendet. Vor der EGF-Stimulierung wurde der Rezeptor selbst mit dem Inhibitor AG1478 (als Kontrolle), die MAPK-Kinase MEK mit UO126, Fyn (und andere Src-Kinasen) mit PP2 bzw. die PI3K mit LY294002 gehemmt. Die Genexpression von inhibierten verglichen mit nicht-inhibierten Zellen wurde mittels qPCR analysiert (Abb. 11).

Bei allen Genkandidaten wurde, wie erwartet, die Xmrk-abhängige Regulierung verringert, wenn der Rezeptor gehemmt wurde. Während die Regulation von *Emp1* und *Opn* sowohl MEK- als auch Fyn-abhängig war, wurde die Induktion von *Sos1*, *Ube2i*, *Dusp4*, *Fosl1*, dem bisher unbekanntem Gen mit der UniGene ID Mm.204306 und *Taal6* nur durch den Fyn-Inhibitor PP2 gehemmt. Interessanterweise deuten diese Ergebnisse auf eine zentrale Rolle der Src-Kinase Fyn in diesem Modellsystem hin. Zwar ist PP2 ein genereller Inhibitor für alle Kinasen der Src-Familie, aber Fyn ist das einzige Mitglied dieser Familie, das durch Xmrk aktiviert wird (Wellbrock *et al.*, 1995). Fyn hemmt die Expression der MAPK-Phosphatase MKP-1 und schützt dadurch die MAPK vor deren Inaktivierung (Wellbrock *et al.*, 2002b). Darüber hinaus stabilisiert Fyn den Komplex zwischen Xmrk und der p85-Untereinheit der PI3K (Wellbrock & Scharl, 2000). Die Expression von neun der elf analysierten Gene wurde durch PP2 reguliert, sechs Gene davon waren nicht von der Hemmung der MEK oder PI3K betroffen. Daher scheinen zusätzliche, MAPK- und PI3K-unabhängige Signalwege zu existieren, durch die Fyn die Expression von Zielgenen beeinflussen kann (Teutschbein *et al.*, Manuskript B.1).

Fyn-unabhängig, aber MEK- und PI3K-abhängig war die Regulation von *Cyr61*. Die Expression von *Igfbp3* wurde durch jeden einzelnen der Inhibitoren verringert. Im Gegensatz dazu hatte keiner der niedermolekularen Inhibitoren einen hemmenden Effekt auf die erhöhte *Egr1*-Expression. Stattdessen wurde sogar ein leichter Anstieg der Expression nach Inhibierung von MEK oder Fyn beobachtet. Daher wurde überprüft, ob Stat5 an der Induktion der *Egr1*-Expression beteiligt ist, indem melan a Hm-Zellen vor der EGF-Stimulierung mit *Stat5*-spezifischer siRNA transfiziert wurden. Die dadurch auf 43% gesenkte Expression von *Stat5* resultierte in einer signifikanten Herabregulierung von *Egr1* auf 64% (Teutschbein *et al.*, Manuskript B.1).

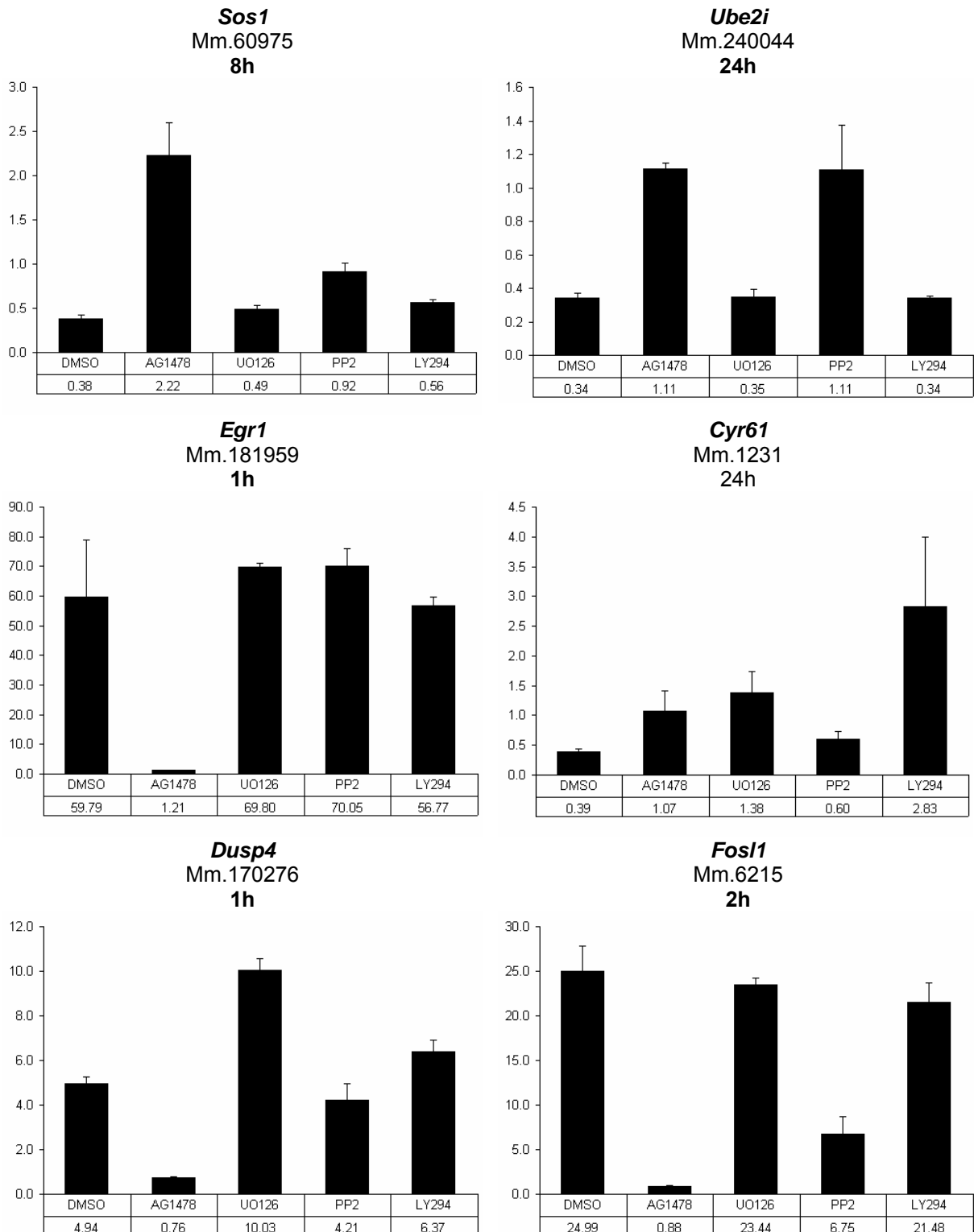


Abb. 11. Die Inhibitoren AG1478, UO126, PP2 und LY294 wurden wie in Teutschbein et al. (Manuskript B.1) angewendet, um HERmrk, MEK, Fyn bzw. PI3K zu hemmen. Auswirkungen der Inhibitoren auf die Genexpression wurden mittels qPCR untersucht.

(Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite)

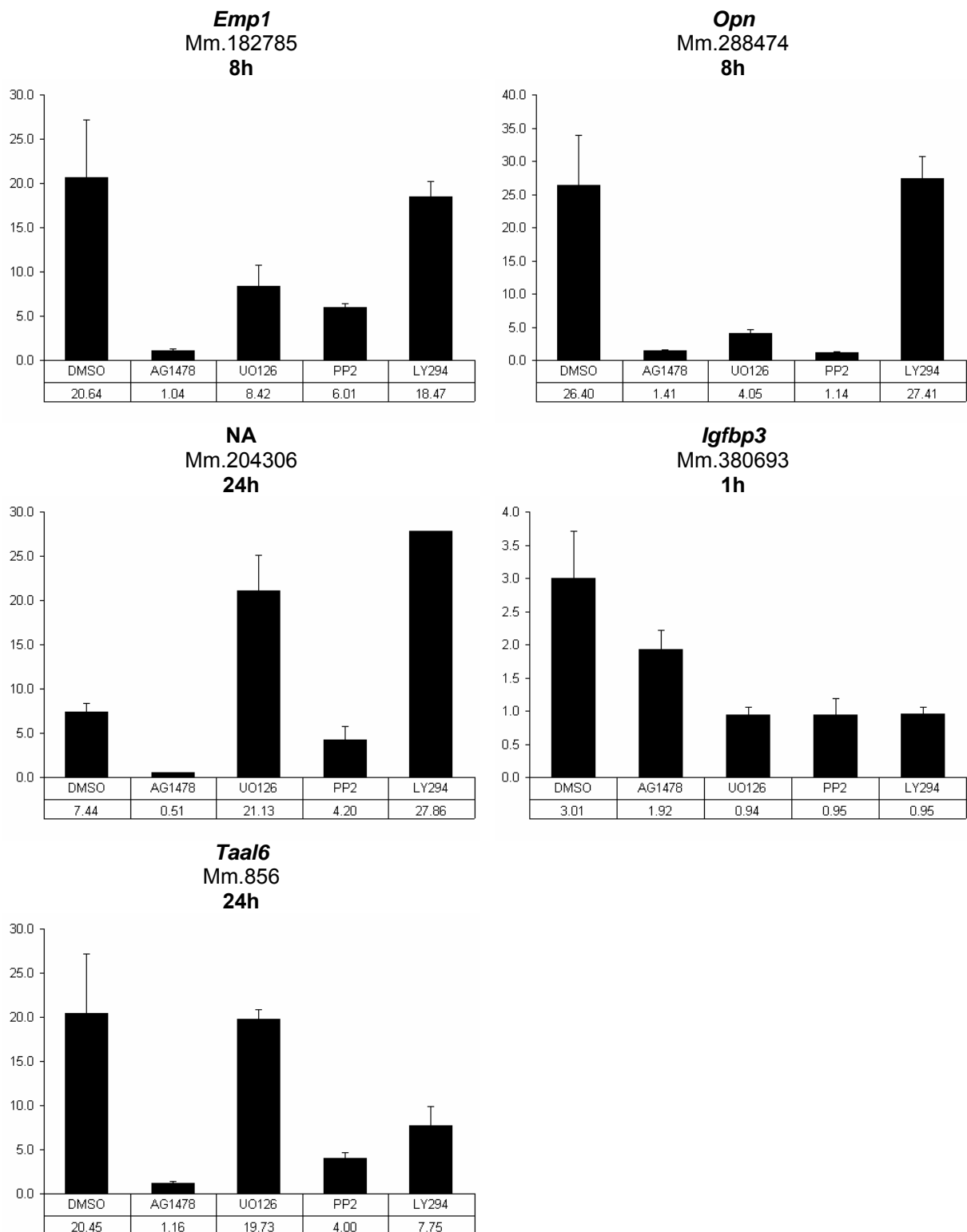


Abb. 11. (Fortsetzung)

Genexpression in humanen Melanomzelllinien

Mittels qPCR sollte als nächstes die Expression der elf Gene in humanen Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten (NHEM) analysiert werden. Dafür wurden zwei Gruppen von Zelllinien ausgewählt: einerseits Mel Juso und Mel Wei, die aus primären kutanen Melanomen gewonnen wurden, andererseits Mel Im, SK Mel 3 und SK Mel 28, die von Metastasen maligner Melanome stammen. Zusätzlich wurden die hochmetastasierenden Zelllinien A375M und LT5.1 mit den aus den gleichen Patienten gewonnenen weniger metastatischen Varianten A375 und DX-3 verglichen.

Für *FOSL1*, *OPN*, *IGFBP3*, *DUSP4* und *TAAL6* konnte eine erhöhte Expression in fast allen Melanomzelllinien verglichen mit normalen Melanozyten gezeigt werden, was auf eine potenzielle Rolle dieser Gene in der Entwicklung humaner Melanome hindeutet. Die *EGR1*-Expression war dagegen in drei Zelllinien geringer als in NHEM, in zwei Zelllinien erhöht und in vier Zelllinien unverändert (Teutschbein et al., Manuskript B.1).

Die Ergebnisse der qPCR für die übrigen Gene sind in Abbildung 12 dargestellt.

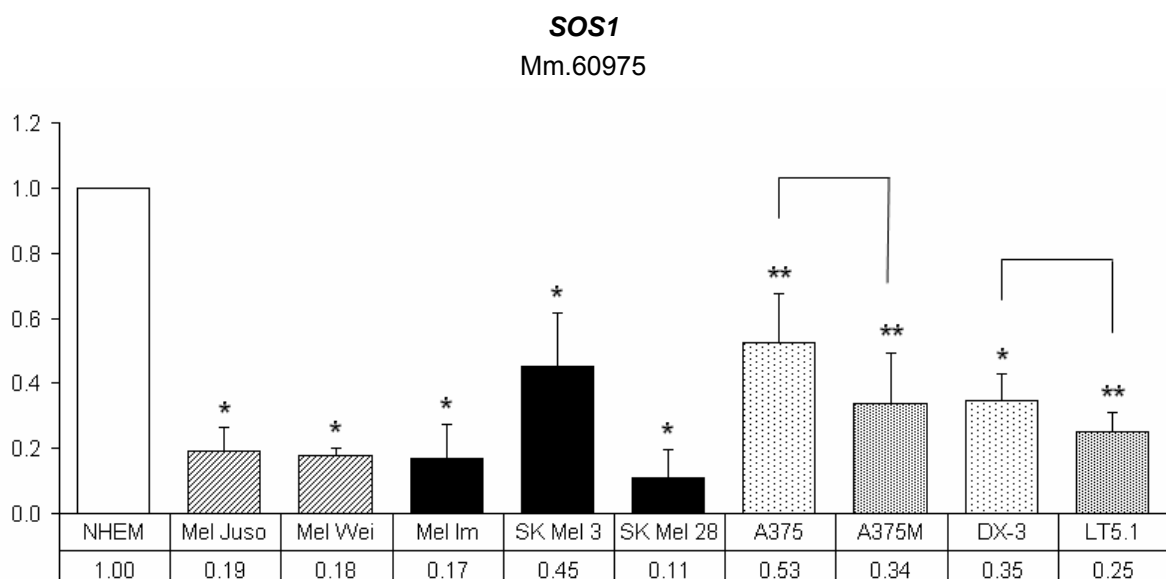


Abb. 12. Mittels qPCR wurden die Expressionslevel der Genkandidaten in humanen Melanomzelllinien mit normalen Melanozyten (NHEM) verglichen wie in Teutschbein et al. (Manuskript B.1) beschrieben. Signifikante ($p < 0,05$) und hochsignifikante ($p < 0,001$) Ergebnisse sind mit einem bzw. zwei Sternchen markiert (Student t-Test, gepaart, einseitig). Für den Kandidaten mit der UniGene ID Mm.204306 liegen keine Ergebnisse in humanen Zellen vor, da diesem kein Gennamen und kein Orthologes in *Homo sapiens* zugeordnet werden konnte. Die Ergebnisse für *EGR1*, *DUSP4*, *IGFBP3*, *FOSL1*, *OPN* und *TAAL6* sind in Teutschbein et al. (Manuskript B.1) dargestellt.

(Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite)

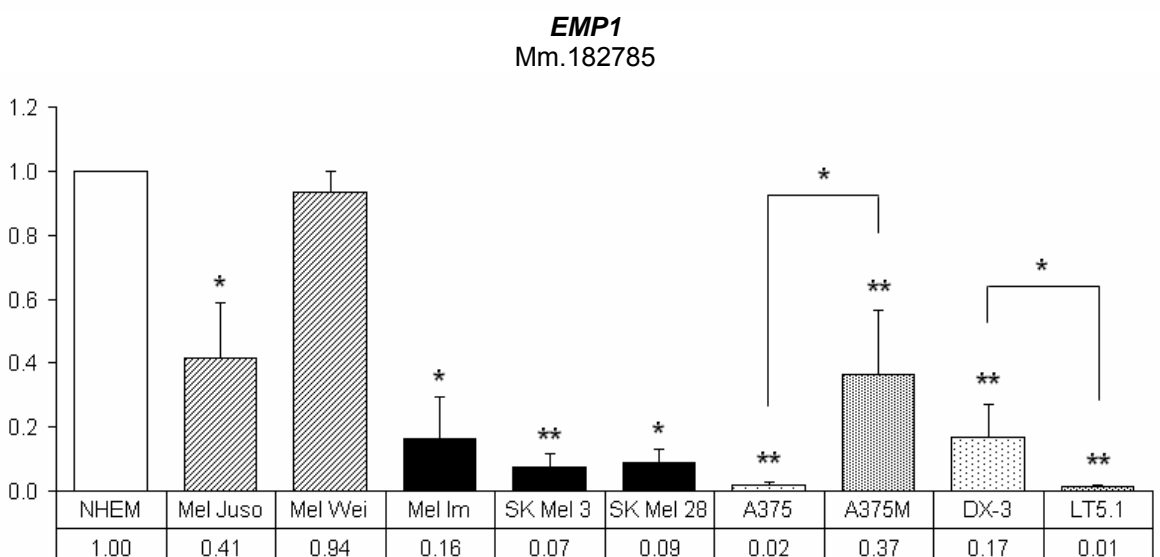
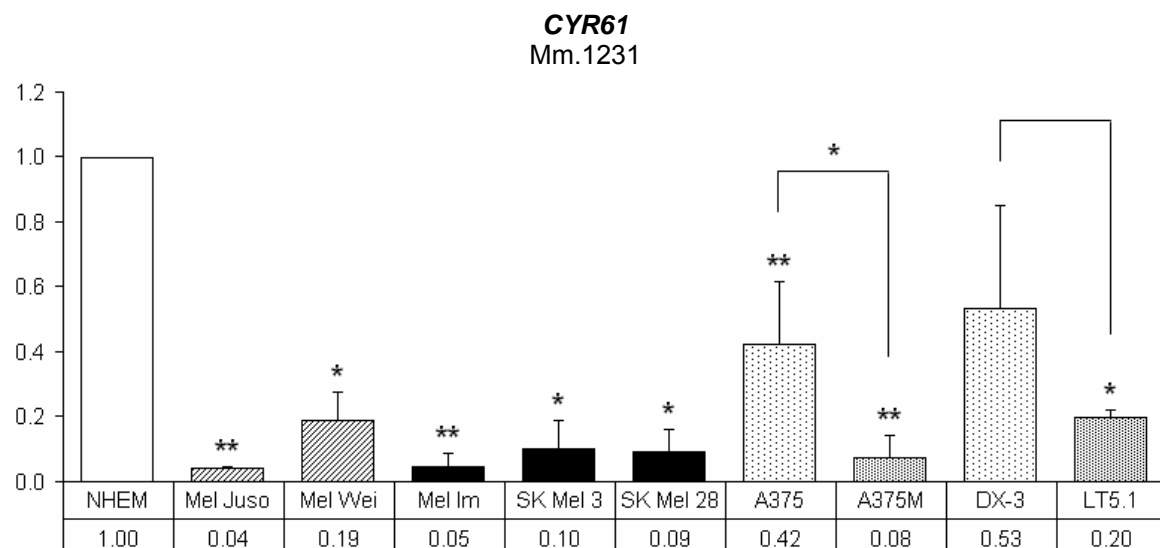
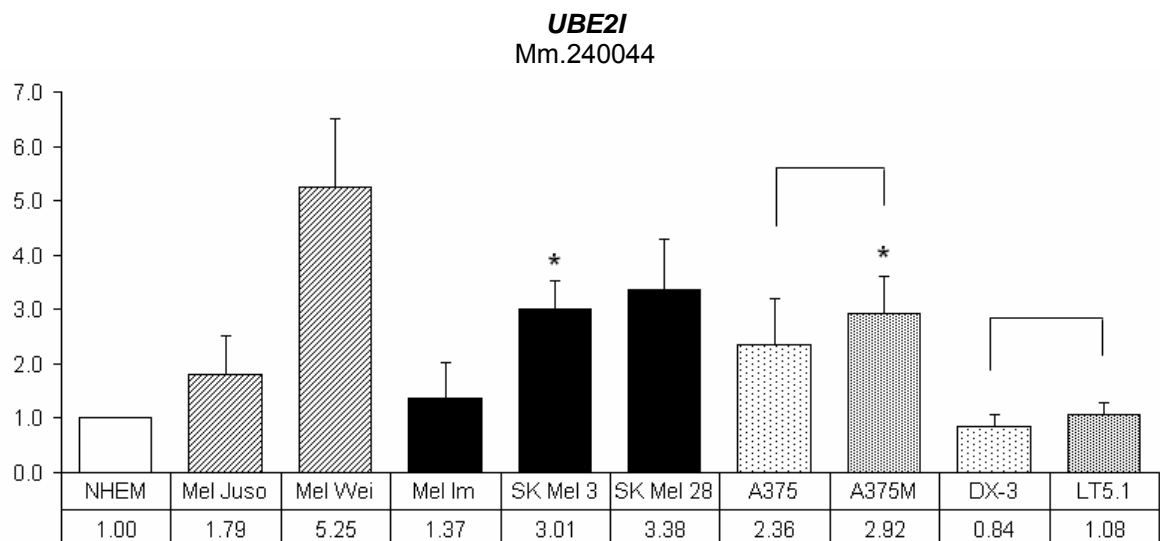


Abb. 12. (Fortsetzung)

Alle Melanomzelllinien wiesen eine signifikant niedrigere *SOS1*- und *CYR61*-Expression als normale Melanozyten auf. Ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Malignität und dem *SOS1*-Level konnte jedoch nicht festgestellt werden. *CYR61* dagegen wurde in den hochmetastatischen Zelllinien A375M und LT5.1 deutlich geringer exprimiert als in A375 und DX-3. Andererseits unterschieden sich die Level in den Zellen aus Metastasen maligner Melanome nicht von denen der primären Melanome. Die Expression von *UBE2I* war in sieben der neun Zelllinien erhöht, allerdings waren auch hier keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen sichtbar. *EMP1* war in acht von den neun analysierten Melanomzelllinien herunterreguliert, in den Linien metastatischen Ursprungs stärker als in denen aus primären Melanomen. Ein Zusammenhang zwischen Metastasierungspotenzial und *EMP1*-Expression ließ sich aus dem Vergleich von A375M und LT5.1 mit A375 und DX-3 jedoch nicht ableiten.

Dass sich i.d.R. keine Korrelation zwischen der Stärke der Genexpression und dem Ursprung der Zelllinien feststellen ließ, könnte möglicherweise daran liegen, dass die Aktivität der hier untersuchten Kandidaten sowohl in den frühen als auch in den fortgeschrittenen Stadien der Melanomgenese eine Rolle spielen.

Die Expression von *FOSL1*, *IGFBP3*, *DUSP4*, *EGR1*, *OPN* und *TAAL6* wurde mit Hilfe von Western Blots auch auf Proteinebene analysiert. Alle Kandidaten wurden in mindestens zwei Dritteln der humanen Melanomzelllinien exprimiert, aber nicht in den NHEM-Zellen (Teutschbein et al., Manuskript B.1).

Bedeutung der Genkandidaten als potenzielle Melanom-Proteine

SOS1

SOS1 ist ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor, der als Antwort auf EGF-Stimulierung über das Adapterprotein GRB2 an den aktivierten EGF-Rezeptor bindet und infolgedessen RAS durch den Austausch von GDP gegen GTP aktiviert (Chardin *et al.*, 1993). Durch diesen Einfluss auf die RAS/RAF/MAPK-Kaskade, die bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen eine zentrale Rolle spielt, muss die Aktivität von *SOS1* strikt reguliert werden. Dies kann zum einen durch einen negativen Feedback-Mechanismus geschehen, indem *SOS1* durch aktive MAPK so phosphoryliert wird, dass der trimere Komplex *SOS1*-GRB2-EGFR nicht mehr gebildet werden kann (Porfiri & McCormick, 1996). Eine andere Möglichkeit ist die Regulierung der Lokalisation von *SOS1*, z.B. durch den Insulinrezeptor (IR) im Zusammenspiel mit Filamin a (FLNa). Der IR vermittelt nach Stimulierung mit Insulin die Translokation von *SOS1* aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran, während konstitutive Bindung von FLNa an den IR die Translokation vermindert (He *et al.*,

2003). Über die Regulation von SOS1 auf Transkriptionsebene gibt es jedoch im Zusammenhang mit Tumoren, speziell Melanomen, keine Publikationen.

Im HERmrk-Melanozyten-System wurde in der vorliegenden Arbeit für *Sos1* eine frühe Induktion der Expression (15min – 1h) beobachtet, während die RNA-Level im weiteren zeitlichen Verlauf auf bis zu ein Fünftel (4h) reduziert waren. Für diesen Effekt wären zwei Erklärungen denkbar: (i) *Sos1* aktiviert Signalwege, die seine eigene Expression inhibieren (negativer Feedback), oder (ii) *Sos1*-unabhängige Signalwege, die als spätere Antwort auf Aktivierung des Rezeptors aktiviert werden, führen zur Hemmung der *Sos1*-Expression. Für die zweite Möglichkeit sprechen die Resultate der Analyse der Signalwege, die zur deregulierten *Sos1*-Expression führen. Hier zeigte sich nämlich, dass die späte Herabregulation (8h) durch den Fyn-Inhibitor aufgehoben werden kann, während die Expression durch Hemmung des Rezeptors mit AG1478 sogar mehr als zweifach erhöht wurde. Möglicherweise wird durch die Rezeptorhemmung ein Signalweg inhibiert, der die *Sos1*-Expression kontrolliert.

In humanen Melanomzellen wurden für *SOS1* durchweg signifikant niedrigere RNA-Level als in normalen Melanozyten gefunden. Das erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich zu der Tatsache, dass *Sos1* ein Faktor in der konstitutiv durch Xmrk aktivierten RAS/RAF/MAPK-Kaskade ist. Andererseits sind es die durch Xmrk angeschalteten Signalwege, die die *Sos1*-Aktivität negativ regulieren, wie oben diskutiert. Ob die deregulierte *Sos1*-Expression somit nur ein "Nebeneffekt" der konstitutiven Signaltransduktion ist oder eine definierte Rolle in onkogenen Signalwegen spielt, lässt sich durch die bisherigen Ergebnisse nicht aussagen und muss weiter untersucht werden.

UBE2I

UBE2I, auch "ubiquitin conjugating enzyme 9" (UBC9) oder "small ubiquitin-like modifier 1" (SUMO-1)-Proteinligase genannt, ist an der kovalenten Bindung von SUMO oder Ubiquitin an zelluläre Proteine beteiligt. Sumoylierung erhöht die Stabilität von Proteinen oder moduliert ihre subzelluläre Lokalisation (Müller *et al.*, 2001), während Ubiquitinylierung je nach Art der Verknüpfung unterschiedliche Funktionen haben kann. Anheftung von Ubiquitin-Polymeren über die Lysinreste K29 oder K48 führt zum proteasomalen Abbau des entsprechenden Proteins, während Monoubiquitinylierung und Polyubiquitinylierung über K6 oder K63 in diverse nicht-proteolytische Prozesse wie z.B. Endozytose, Aktivierung von Kinasen oder das "Silencing" von Genen involviert sind (Pickart & Fushman, 2004).

In Melanomzellen ist ein geringer Anteil des Transkriptionsfaktors MITF konstitutiv sumoyliert, was zur Reduktion der MITF-Aktivität an bestimmten Promotoren führt. Welche genaue Rolle dies bei der Melanomentwicklung spielt, ist allerdings noch

offen (Murakami & Arnheiter, 2005). Eine andere Studie zeigte, dass MITF durch UBE2I vorwiegend ubiquitinyliert und nicht sumoyliert wird (Xu *et al.*, 2000). MITF aktiviert in Melanozyten die Transkription von Genen, die essentielle Enzyme für die Melanin-Biosynthese kodieren. UBE2I markiert MITF durch kovalentes Anheften von Ubiquitin für dessen proteasomalen Abbau und wirkt somit der Differenzierung von Melanozyten entgegen. Die Dedifferenzierung von Pigmentzellen durch den Abbau von MITF als Antwort auf Xmrk-abhängige Signale wurde bereits zuvor beschrieben (Delfgaauw *et al.*, 2003). Die Degradation von MITF beruhte in jenem Fall auf der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch aktivierte MAPK und Export des phosphorylierten Proteins in das Zytoplasma, während in der vorliegenden Arbeit für die erhöhte Ube2i-Expression in stimulierten melan a Hm-Zellen eine Fyn-, aber keine MEK-Abhängigkeit nachgewiesen werden konnte.

Erhöhte UBE2I-Level wurden auch in sechs der neun analysierten humanen Melanomzelllinien festgestellt. Diese Daten bestätigen die Resultate anderer Studien, in denen UBE2I in diversen Tumoren, darunter auch Melanomen, überexprimiert gefunden und mit anti-apoptotischen Prozessen assoziiert wurde (Mo *et al.*, 2005; Moschos & Mo, 2006; Moschos *et al.*, 2007). UBE2I wurde daher bereits als Target für die Krebstherapie diskutiert (Mo & Moschos, 2005).

CYR61

CYR61 ist ein Cystein-reiches Protein, das durch seinen modularen Aufbau aus vier Domänen verschiedene biologische Aktivitäten und Funktionen ausüben kann. Indem es Prozesse wie Proliferation, Adhäsion, Migration, Differenzierung, Apoptose, Wachstumsarrest und die Produktion der extrazellulären Matrix reguliert, spielt CYR61 eine Rolle in Entwicklung, Chondrogenese, Angiogenese, Tumorgenese, und Wundheilung (Chen & Du, 2007). Erhöhte CYR61-Level wurden mit fortgeschrittenen Brust-Adenokarzinomen, Pankreastumoren und Gliomen assoziiert (Xie *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004). Auf der anderen Seite wurde eine Herabregulierung der Genexpression in Prostatakrebs, Rhabdomyosarkomen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) beobachtet (Pilarsky *et al.*, 1998; Tong *et al.*, 2001; Croci *et al.*, 2004). Die Expression von CYR61 in Neuroblastomen und Karzinomen der Prostata zeigt eine negative Korrelation mit der Malignität (Pilarsky *et al.*, 1998), darüber hinaus wurde CYR61 in NSCLC eine Funktion als Tumorsuppressor zugesprochen (Tong *et al.*, 2001; Chien *et al.*, 2004). Die Rolle von CYR61 scheint demnach in verschiedenen Tumorarten unterschiedlich zu sein und stark vom zellulären Kontext abzuhängen (Chen & Du, 2007). Für Melanome wurde einerseits gezeigt, dass die Expression von CYR61 als Angiogenesefaktor in malignen Melanomen durch Hypoxie induzierbar ist und mit dem Tumorstadium korreliert (Kunz *et al.*, 2003). Auch in uvealen Melanomen wurden erhöhte CYR61-Level im Vergleich zu normalen uvealen Melanozyten gefunden (Walker *et al.*, 2002).

Andererseits unterdrückt ELM1, ein Mitglied der gleichen Proteinfamilie, *in-vivo* das Tumorwachstum und die Metastasierung muriner Melanomzellen (Hashimoto *et al.*, 1998).

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse der Analyse der RNA-Level in humanen Melanomzelllinien deuten ebenfalls auf eine Rolle von CYR61 als Tumorsuppressor hin, da die Expression in allen Zelllinien stark herabreguliert war und die hochmetastatischen Zellen der Linien A375M und LT5.1 eine deutlich stärkere Herabregulation aufwiesen als ihre weniger metastatischen Vorläufer A375 und DX-3. Im HERmrk-Melanozyten-System war die *Cyr61*-Expression zu frühen Zeitpunkten (15min, 1h) erhöht und erst später (8h) auf etwa die Hälfte reduziert, wobei sowohl die MAPK als auch die PI3K an der Regulation beteiligt waren. Durch Hemmung der PI3K stieg die Expression nicht nur von 0,39-fach auf das normale Level (ca. 1) an, sondern auf über zweifach. Möglicherweise wird durch die PI3K ein anderer Faktor reguliert, der seinerseits die *Cyr61*-Expression kontrolliert. Weitere Analysen sind erforderlich, um den genauen Mechanismus der Xmrk-vermittelten *Cyr61*-Regulation und die Rolle dieses Proteins während der Melanomprogression zu entschlüsseln.

EMP1

EMP1 ist Mitglied einer Familie membranständiger Glykoproteine, die bei Zell-Zell-Interaktionen und bei der Zellproliferation eine Rolle spielen (Ben-Porath & Benvenisty, 1996; Ben-Porath *et al.*, 1999). Erhöhte EMP1-Expression wurde in Brustkrebszellen, die HER2 überexprimieren, und in Glioblastomen, die den tumorigenen Rezeptor EGFRvIII exprimieren, gefunden (Mackay *et al.*, 2003; Ramnarain *et al.*, 2006). In Leiomyomen dagegen ist die Expression von Proteinen, die in die Zellintegrität involviert sind, darunter auch EMP1, reduziert (Arslan *et al.*, 2005). Eine Assoziation von EMP1 mit Melanomen ist bisher nicht publiziert worden.

In melan a Hm-Zellen wurde in dieser Arbeit nach Aktivierung des Rezeptors ein starker Anstieg der *Emp1*-Expression beobachtet, der über die aktive MAPK im Zusammenspiel mit Fyn vermittelt wurde. Im Widerspruch dazu stehen die Resultate der Analyse humaner Melanomzelllinien, in denen *EMP1* im Vergleich zu normalen Melanozyten größtenteils stark herabreguliert war. Wie es zu so unterschiedlichen Ergebnissen kommt und welche Rolle die deregulierte Expression von *EMP1* in der Melanomenese spielt, muss in weiteren Analysen geklärt werden.

FOSL1, EGR1, OPN, IGFBP3, DUSP4, TAAL6

Die Bedeutung von FOSL1, EGR1, OPN, IGFBP3, DUSP4 und TAAL6 in der Tumorgenese und als potenziell wichtige Melanom-Proteine wurde bereits diskutiert (Teutschbein et al., Manuskript B.1).

Während die Rolle von EGR1 in der Melanomenese noch unklar ist, stellt OPN einen bekannten Melanommarker dar, der in dieser Studie als interne Kontrolle diente (Zhou *et al.*, 2005; Barak *et al.*, 2007). FOSL1 wurde in einer früheren Studie mit Migration, Invasion und Metastasierung von Melanomen in Zusammenhang gebracht (Tower *et al.*, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete deutliche Induktion der *Fos/1*-Expression im HERmrk-Melanozyten-System nach Rezeptoraktivierung und die im Vergleich zu normalen Melanozyten erhöhte Expression von *FOSL1* in humanen Melanomzelllinien deuten ebenfalls auf eine Rolle dieses Kandidaten in der Melanomprogression hin. IGFBP3 stellt mit einer starken Expression in melan a Hm-Zellen nach HERmrk-Aktivierung und in humanen Melanomzelllinien einen weiteren vielversprechenden Faktor in der Melanomenese dar. Dieser Kandidat wurde bisher nur in einer Publikation mit der Progression humaner Melanome assoziiert (Xi *et al.*, 2006).

Mit DUSP4 und TAAL6 wurden in dieser Arbeit völlig neue, für Melanome bisher unbekannte Proteine identifiziert, die für die Melanominduktion und –progression von Bedeutung sein könnten. In zukünftigen Studien soll die potenziell onkogene Wirkung dieser Kandidaten näher untersucht werden.

2.2. Etablierung des Split-Ubiquitin-Systems zur Identifizierung von Xmrk-Interaktionspartnern

Neben der Analyse differenzieller Genexpression ist die Suche nach Interaktionspartnern des Rezeptors ein weiterer Ansatz zur Aufklärung der Xmrk-abhängigen Signaltransduktion. Dazu sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Split-Ubiquitin-Technologie in *Saccharomyces cerevisiae* für Xmrk als "bait" (Köder) etabliert werden.

Klonierungen, Transformationen und Interaktionsstudien wurden durchgeführt wie in [Teutschbein et al.](#) (Manuskript B.2) für analoge Experimente beschrieben.

Zunächst wurde das Plasmid Xmrk-C_{UB}-rURA3 kloniert, anschließend in den Hefestamm JD53 transformiert und auf Funktionalität des Reporters rURA3, d.h. auf Aktivität des durch *URA3* kodierten Enzyms und auf damit einhergehende Sensitivität gegenüber dem toxischen Substrat 5-FOA getestet. Das Plasmid STE14-C_{UB}-rURA3, welches die Methyltransferase STE14 aus *S. cerevisiae* kodiert, diente dabei als Kontrolle ([Wittke et al., 1999a](#)). Im Gegensatz zum Kontrollplasmid zeigten die mit Xmrk-C_{UB}-rURA3 transformierten Hefezellen weder URA3-Aktivität noch 5-FOA-Sensitivität (Abb. 13).





	Xmrk	STE14
(a) MM + Leu, Lys, Trp		
(b) MM + Leu, Lys, Trp, Ura, 5-FOA		

Abb. 13. Untersuchung des Köder-Plasmids Xmrk-C_{UB}-rURA3 auf Funktionalität des Reporters rUra3. Diese umfasst (a) URA3-Aktivität, gekennzeichnet durch Wachstum auf Uracil-freiem Medium, und (b) 5-FOA-Sensitivität. STE14-C_{UB}-rURA3 diente als Kontrolle.

Für dieses Resultat, das die Verwendung des Konstruktes für die geplanten Interaktionsstudien unmöglich macht, wären folgende Erklärungen denkbar: (i) Xmrk-C_{UB}-rURA3 wird, z.B. aufgrund der Hefe-spezifischen "Codon Usage", nicht exprimiert. (ii) Das Fusionsprotein wird exprimiert, ist aber instabil, sodass der Reporter abgebaut wird. (iii) Das Konstrukt ist toxisch für Hefezellen. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass die Zellen auf 5-FOA-haltigem Medium in der Lage sind zu wachsen. (iv) Das Hybridprotein Xmrk-C_{UB}-rURA3 wird exprimiert, faltet sich aber nicht korrekt, sodass das Protein Aggregate bildet oder die Substratbindungsstelle von rURA3 blockiert wird oder rURA3 katalytisch nicht aktiv

werden kann. Die Fehlfaltung von Proteinen durch Fusion mit anderen Proteinen oder das Fehlen geeigneter Faltungshelfer in *Saccharomyces cerevisiae* ist einer der Hauptnachteile Hefe-Zweihybrid-basierter Technologien (Van Crielinge & Beyaert, 1999; Legrain *et al.*, 2001). Solche "problematischen" Proteine können in manchen Fällen durch Trunkierungen dem Hefe-Zweihybrid-System zugänglich gemacht werden (Causier & Davies, 2002). Daher wurde im Folgenden eine N-terminal verkürzte Version von Xmrk (Xmrk Δ 1-577) in den "bait"-Vektor kloniert. Anhaltspunkt hierfür war ein natürlich vorkommender mutierter EGF-Rezeptor, bei dem ebenfalls ein großer Bereich der extrazellulären Domäne nahe des N-Terminus deletiert ist und der Liganden-unabhängig dimerisiert, autophosphoryliert und folglich Signaltransduktionswege auslöst (Moscatello *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997)

Xmrk Δ 1-577-C_{UB}-rURA3 als "bait"

Die mit Xmrk Δ 1-577-C_{UB}-rURA3 transformierten Hefezellen wurden ebenfalls dem Test auf URA3-Funktionalität unterzogen (Abb. 14). Das Wachstumsverhalten entsprach dem der Kontrolle, so dass das Plasmid Xmrk Δ 1-577-C_{UB}-rURA3 für weitere Experimente verwendet wurde.





	Xmrk Δ 1-577	STE14
(a) MM + Leu, Lys, Trp		
(b) MM + Leu, Lys, Trp, Ura, 5-FOA		

Abb. 14. Untersuchung des Köder-Plasmids Xmrk Δ 1-577-C_{UB}-rURA3 auf Funktionalität des Reporters rUra3. Diese umfasst (a) URA3-Aktivität, gekennzeichnet durch Wachstum auf Uracil-freiem Medium, und (b) 5-FOA-Sensitivität. STE14-C_{UB}-rURA3 diente als Kontrolle.

Zur weiteren Etablierung des Systems wurden als "preys" (Beute) die kodierenden Sequenzen für *Xiphophorus Fyn* (XFyn) sowie für Maus-FAK und trunkierte FAK-Versionen in den N_{UB}-Vektor kloniert. N_{UB}-UBC6 diente als Kontrolle (Wittke *et al.*, 1999b). Xmrk Δ 1-577-C_{UB}-rURA3 wurde mit je einem dieser Plasmide in JD53-Zellen kotransformiert, welche auf ihr Wachstum auf 5-FOA-haltigem Selektionsmedium untersucht wurden (Abb. 15).

N_{UB} \ C_{UB}	Xmrk Δ 1-577	STE14
Xfyn		
FAK		
Δ 1-375		
Δ 403-1052		
Δ 691-1052		
UBC6		

Abb. 15. 5-FOA-Assay mit Xmrk Δ 1-577 als "bait". Xmrk Δ 1-577- C_{UB} -rURA3 bzw. STE14- C_{UB} -rURA3 (als Kontrolle) wurde paarweise mit XFyn, FAK, trunkierten FAK-Versionen oder UBC6 (als Kontrolle) im N_{UB} -Vektor in Y190 kotransformiert. Wachstum der Hefezellen auf Selektionsmedium mit 1mg/ml 5-FOA nach bis zu 5 Tagen Inkubation bei 30°C zeigt eine Interaktion der entsprechenden Proteine an.

Obwohl bekannt ist, dass Xmrk sowohl mit FAK als auch XFyn interagieren kann (Meierjohann *et al.*, 2006b), wurde mit Xmrk Δ 1-577 als "bait" keine Interaktion detektiert. Vermutlich ist dafür eine Fehlfaltung des Fusionsproteins verantwortlich, durch welche (i) die Interaktion von Xmrk Δ 1-577 mit anderen Proteinen sterisch gehemmt wird oder (ii) die Erkennungs- und Spaltungsstelle für die Ubiquitin-spezifischen Proteasen blockiert und somit die Abspaltung des Reporters verhindert wird. Dass das Prinzip des rURA3-basierten Split-Ubiquitin-Systems als solches funktioniert, zeigte sich durch das Wachstum der mit N_{UB} -UBC6 und STE14- C_{UB} -rURA3 kotransformierten Zellen. UBC6 und STE14 sind Hefe-Proteine des endoplasmatischen Reticulums, für die eine Assoziation bereits beobachtet worden ist (Wittke *et al.*, 1999b; Johnsson *et al.*, persönliche Mitteilung).

HERmrk als "bait"

Die Assoziation von Xmrk mit den bekannten Interaktionspartnern erfolgt über den intrazellulären Teil des Rezeptors, der auch Bestandteil des oben beschriebenen chimären Rezeptors HERmrk ist. Daher wurde HERmrk in den "bait"-Vektor kloniert und die Eignung dieses Konstrukts für Interaktionsstudien wie oben beschrieben überprüft (Abb. 16). Da HERmrk infolge von EGF-Stimulierung aktiviert wird, wurde das Selektionsmedium mit humanem EGF verschiedener Konzentrationen versetzt. Dies wurde bereits in den Kontrollexperimenten durchgeführt, um einen Einfluss des EGF auf die Reporteraktivität auszuschließen.











	HERmrk				STE14
	ohne EGF	10ng/ μ l EGF	100ng/ μ l EGF	500ng/ μ l EGF	
(a) MM + Leu, Lys, Trp					
(b) MM + Leu, Lys, Trp, Ura, 5-FOA					

Abb. 16. Untersuchung des Konstrukts HERmrk-C_{UB}-rURA3 im Vergleich zur Kontrolle STE14-C_{UB}-rURA3 auf Reporteraktivität. Das Wachstum der Hefezellen wurde auf (a) Uracil-freiem sowie (b) 5-FOA-haltigem Medium überprüft. Um die Liganden-abhängige Dimerisierung von HERmrk zu ermöglichen, wurde das Selektionsmedium mit humanem EGF versetzt.

Die mit HERmrk-C_{UB}-rURA3 transformierten Hefezellen verhielten sich gegensätzlich zu den Kontrollzellen und zeigten wie das Xmrk-Konstrukt keine URA3-Aktivität, sodass auch dieses Konstrukt leider nicht für weitere Interaktionsstudien verwendet werden konnte. Wie bereits für das Xmrk-Konstrukt diskutiert, wären auch hier die Fehlfaltung oder Instabilität des Fusionsproteins als Ursachen denkbar.

Interaktionsstudien mit dem klassischen Zweihybrid-System

Nachdem sich das Split-Ubiquitin-System als ungeeignet für die Suche nach Interaktionspartnern von Xmrk erwiesen hatte, wurde auf die klassische Methode der Hefe-Zweihybrid-Technologie ("Yeast two-hybrid system", Y2H) zurückgegriffen (Fields & Song, 1989). Diese Methode ist, da die Detektion der Interaktion über einen Transkriptionsfaktor im Nukleus erfolgt, für Membran- und membranassoziierte Proteine zwar nur begrenzt geeignet (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001), dennoch konnten bestimmte Membranprotein-Interaktionen bereits erfolgreich dargestellt werden (Geisler *et al.*, 2003; Teutschbein *et al.*, im Druck).

Die kodierenden Sequenzen für Xmrk, Xmrk Δ 1-577 und XFyn wurden jeweils in den "bait"-Vektor pGBT9-MCS1 (BD) und in den "prey"-Vektor pGAD424-MCS1 (AD) kloniert. Paarweise mit diesen Plasmiden kotransformierte Hefezellen vom Stamm Y190 wurden auf Interaktion der Fusionsproteine getestet (Abb. 17). Als Reporter diente dabei die durch *lacZ* kodierte β -Galaktosidase. Nach Transfer der Hefezellen auf Filterpapier und deren Aufschluss durch flüssigen Stickstoff wurde das chromogene Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid (XGal) zugegeben, das im Falle einer Protein-Protein-Interaktion durch β -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird.

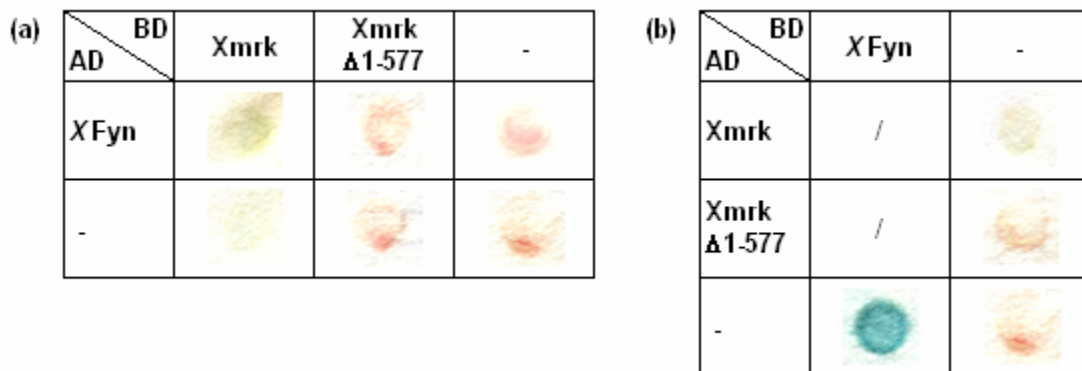


Abb. 17. β -Galaktosidase-Filterassay zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Xmrk und XFyn bzw. FAK mit (a) Xmrk als "bait", (b) Xmrk als "prey". Eine Blaufärbung der Hefezellen lässt auf eine Interaktion der Proteine (oder Falschpositive) schließen, bei fehlender Protein-Protein-Interaktion (oder Falschnegativen) bleiben die Zellen weiß bis rosa. Zum Ausschluss falschpositiver Wechselwirkungen wurden die zu untersuchenden "bait"-Plasmide jeweils mit einem leeren "prey"-Vektor kotransformiert und umgekehrt. Trat bereits bei einer solchen Negativkontrolle eine Blaufärbung ein, wurde das entsprechende Plasmid nicht für weitere Interaktionsstudien genutzt; die betreffenden Felder sind mit einem Schrägstrich markiert.

Mit Hilfe des klassischen Zweihybrid-Systems ließen sich keine Wechselwirkungen zwischen Xmrk als "bait" und dem bekannten Interaktionspartner XFyn als "prey" detektieren (Abb. 17a). Auch hier könnte die Fehlfaltung oder Instabilität der Fusionsproteine in der Hefezelle die Ursache sein. Möglich wäre auch eine sterische Hinderung des Transkriptionsfaktors GAL4p durch interagierende Proteine oder – als eines der Hauptprobleme beim klassischen Y2H-System – die falsche subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine (Van Criekinge & Beyaert, 1999; Legrain *et al.*, 2001; Vollert & Uetz, 2006).

Eine Fehlfaltung der Fusionsproteine kann in manchen Fällen umgangen werden, indem "bait" und "prey" protein im sogenannten "switch domain"-Experiment vertauscht an die BD und AD fusioniert werden (Van Criekinge & Beyaert, 1999). Eine Interaktion zwischen Xmrk und Xfyn ließ sich jedoch auch dann nicht feststellen, da das Fusionsprotein aus XFyn und BD bereits in Kombination mit dem leeren "prey"-Vektor ein positives Signal gab (Abb. 17b). Solche "falschpositiven" Signale im Y2H-System können dadurch erklärt werden, dass das BD-Fusionsprotein selbst die Transkription des Reportergens aktivieren kann, indem es eine eigene AD enthält – was im Falle von XFyn allerdings sehr unwahrscheinlich ist – oder an Proteine mit einer AD bindet (Bartel *et al.*, 1993).

2.3. Charakterisierung der FAK – FYN Interaktion

FYN gehört zur Familie der SRC-Kinasen, welche häufig an der Entstehung solider Tumoren beteiligt sind (Johnson & Gallick, 2007). Zu den Substraten von SRC-Kinasen zählen unter anderem Proteine, die an fokalen Kontakten zu finden sind, wie z.B. Cortactin, p130^{Cas}, Paxillin und die Tyrosinkinase "focal adhesion kinase" (FAK) (Schlaepfer *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2002; Schaller, 2001).

FAK ist ein wichtiger Link zwischen den Signalwegen von Wachstumsfaktorrezeptoren und Integrinen und bildet transiente Komplexe mit SRC-Kinasen (Schlaepfer *et al.*, 1999; Sieg *et al.*, 2000). Die SRC-FAK-Komplexe stellen die zentrale Signal-Plattform für SRC dar und können zahlreiche tumorigene Ereignisse einleiten. In den meisten Publikationen, die das Zusammenspiel von SRC-Kinasen mit FAK in der Tumortransformation beschreiben, wurde SRC selbst untersucht (Schlaepfer *et al.*, 2004; Hsia *et al.*, 2003, Brunton *et al.*, 2005). Eine kooperative Rolle von FYN und FAK für die Progression von Tumorzellen wurde dagegen bisher kaum erforscht und nur für murine Melanomzellen und für Melan a Hm-Zellen beschrieben (Huang *et al.*, 2003; Meierjohann *et al.*, 2006b).

In *Xiphophorus*-Melanomen spielt die Src-Kinase Fyn eine entscheidende Rolle bei der Xmrk-vermittelten Tumorentstehung, indem sie zur Proliferation, Migration und Dedifferenzierung beiträgt (Meierjohann & Scharf, 2006). Durch Bindung von Fyn an FAK und Xmrk wird die Aktivität von FAK moduliert (Meierjohann *et al.*, 2006b). Um herauszufinden, warum Fyn im *Xiphophorus*-Modell eine solche herausragende Rolle spielt, sollte die Interaktion zwischen FAK und *Xiphophorus*-Fyn durch Hefe-Zweihybrid-Studien analysiert und mit der Interaktion zwischen FAK und Maus-FYN verglichen werden (Teutschbein *et al.*, Manuskript B.2).

Dazu wurden zunächst die kodierenden Sequenzen für *Xiphophorus*- bzw. Maus-FYN in den "bait"-Vektor kloniert und die entsprechenden Plasmide XFyn-C_{UB}-rURA3 bzw. MFYN-C_{UB}-rURA3 in den Hefestamm JD53 transformiert. Die Zellen wurden anschließend auf Funktionalität des Reporters rURA3 untersucht, wie oben beschrieben (Abb. 18).







	XFyn	MFYN	STE14
(a) MM + Leu, Lys, Trp			
(b) MM + Leu, Lys, Trp, Ura, 5-FOA			

Abb. 18. Untersuchung der "bait"-Plasmide XFyn-C_{UB}-rUra3 und MFYN-C_{UB}-rUra3 auf Funktionalität des Reporters rURA3. Diese umfasst (a) URA3-Aktivität, gekennzeichnet durch Wachstum auf Uracil-freiem Medium, und (b) 5-FOA-Sensitivität. STE14-C_{UB}-rURA3 diente als Kontrolle.

Beide Konstrukte wiesen URA3-Aktivität und 5-FOA-Sensitivität auf und wurden für Interaktionsstudien verwendet. Wie in Teutschbein et al. (Manuskript B.2) beschrieben, wurden die Wechselwirkungen von XFyn bzw. MFYN mit FAK und FAK-Mutanten mittels Split-Ubiquitin- und klassischer Hefe-Zweihybrid-Technologie analysiert.

Mit Wildtyp-FAK und einer C-terminal trunkierten FAK-Mutante, die neben dem N-Terminus noch die zentrale Kinasedomäne enthielt ($\Delta 691-1052$), interagierten weder *Xiphophorus*- noch Maus-FYN. Diese Beobachtung passt zu bereits publizierten Daten, die zeigen, dass die N-terminale Domäne mit der Kinase-Domäne des selben FAK-Moleküls interagieren und so dessen Aktivität hemmen kann (Cooper *et al.*, 2003; Dunty *et al.*, 2004). Durch diese interne Interaktion, die durch Wechselwirkung mit einem Wachstumsfaktorrezeptor oder mit einem Integrincluster-Proteinkomplex aufgehoben werden kann, wird vermutlich die Binderegion für SRC-Kinasen sterisch blockiert (Teutschbein et al., Manuskript B.2).

Sowohl *Xiphophorus*- als auch Maus-FYN interagierten mit FAK-Mutanten, die entweder N-terminal ($\Delta 1-375$) oder C-terminal ($\Delta 403-1052$) trunkiert waren und jeweils den Tyrosinrest Y397 enthielten. Wurde Y397 in der N-terminal trunkierten Mutante durch Phenylalanin ersetzt, fand die Interaktion mit FYN nicht mehr statt. Dagegen war bei Austausch des Tyrosins gegen Glutamat, welches einen phosphorylierten Tyrosinrest imitiert, die Interaktion möglich. Dieses Ergebnis bestätigt, dass – zumindest in der N-terminal trunkierten Variante – Phospho-Y397 für die Interaktion von FAK mit Fyn nötig ist. Die Phosphorylierung von Y397 findet in eukaryotischen Zellen als Folge der Interaktion der C-terminalen Domäne von FAK mit Integrin-Clustern statt. Homologe zu allen beteiligten Proteinen sind in Hefe ebenfalls vorhanden, so dass diese Phosphorylierung auch hier gewährleistet zu sein scheint. Für die C-terminal trunkierte Variante ist eine Phosphorylierung an Y397 unwahrscheinlich, daher wird hier vermutet, dass die Interaktion zwischen der Prolinreichen Domäne des FAK und der SH3-Domäne von Fyn stattfindet (Teutschbein et al., Manuskript B.2).

Mit diversen *in-vitro* Techniken wurde die Phospho-Y397-abhängige Interaktion von FAK mit FYN bereits früher gezeigt (Cary *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 1999; Arold *et al.*, 2001). In der hier vorliegenden Arbeit wurde diese Interaktion erstmals in der lebenden Zelle nachgewiesen und überdies gezeigt, dass *Xiphophorus*-Fyn die gleichen Bindungseigenschaften gegenüber FAK aufweist wie Maus-FYN und somit strukturelle Gründe für die prominente Bedeutung von Fyn in *Xiphophorus*-Melanomen unwahrscheinlich sind. Darüber hinaus konnte mittels Koimmunpräzipitation die konstitutive Interaktion von FAK und FYN in humanen Melanomzelllinien demonstriert werden, was darauf hindeutet, dass diese beiden Proteine möglicherweise auch in der humanen Melanomenese eine kooperative Rolle spielen (Teutschbein *et al.*, Manuskript B.2).

3. Fazit und Ausblick

Die Rezeptortyrosinkinase Xmrk ist der alleinige Auslöser der Melanomentwicklung in *Xiphophorus*-Hybriden. Xmrk nutzt dabei sowohl Signalkaskaden, die bereits für den humanen EGF-Rezeptor in verschiedenen Zelltypen beschrieben worden sind, als auch Pigmentzellen-spezifische Wege. In dieser Arbeit sollten zum einen durch die Analyse der Xmrk-abhängigen Genexpression, zum anderen durch Protein-Protein-Interaktionsstudien neue Effektoren von Xmrk identifiziert und charakterisiert werden. Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurden 1.273 Gene ermittelt, die in Antwort auf Rezeptoraktivierung differenziell exprimiert wurden. Elf davon wurden aufgrund ihrer starken Regulation und ihrer Zugehörigkeit zu Gruppen interessanter molekularer Funktionen näher untersucht (Abb. 19, Tab. 3). Dazu gehörten u.a. OPN als bekannter Melanommarker (Zhou *et al.*, 2005; Barak *et al.*, 2007), FOSL1, für das bereits eine Rolle in Zusammenhang mit Melanommigration, Invasion und Metastasierung diskutiert wurde (Tower *et al.*, 2003), und IGFBP3, das bisher nur in einer Publikation mit der Progression humaner Melanome assoziiert wurde (Xi *et al.*, 2006). Als besonders vielversprechende neue Kandidaten, die für die Melanominduktion und -progression von Bedeutung sein könnten, wurden DUSP4 und TAAL6 identifiziert (Teutschbein *et al.*, Manuskript B.1). Ihre genaue Rolle in der Melanomentwicklung ist noch nicht bekannt und soll in zukünftigen funktionellen Analysen aufgeklärt werden. Gegenstand weiterer umfangreicher Untersuchungen wird ihre Eignung als diagnostische und prognostische Melanommarker sein.



Abb. 19. Qualitative und quantitative Selektion von Spots im Zuge der Auswertung der Microarray-Daten.

Gen-symbol	Unigene ID	Regulation in melan a Hm-Zellen			Regulation in humanen Melanomzelllinien		Assoziation bekannt mit	
		qPCR	Western Blot	Signalwege	qPCR	Western Blot	humanen Melanomen	anderen Tumoren
<i>Sos1</i>	Mm.60975	früh hoch spät herab	n.d.	Fyn	herab	n.d.	nein	nein
<i>Ube2i</i>	Mm.240044	früh hoch spät herab	n.d.	Fyn	überwiegend hoch	n.d.	ja	ja
<i>Egr1</i>	Mm.30534	hoch	hoch	Stat5	teils, teils	überwiegend hoch	ja, aber kontrovers	ja, aber kontrovers
<i>Cyr61</i>	Mm.1231	früh hoch spät herab	n.d.	MEK, PI3K	herab	n.d.	ja, aber kontrovers	ja, aber kontrovers
<i>Dusp4</i>	Mm.170276	hoch	?	Fyn	hoch	hoch	nein	ja
<i>Fosl1</i>	Mm.6215	hoch	hoch	Fyn	überwiegend hoch	überwiegend hoch	ja	ja
<i>Emp1</i>	Mm.182785	hoch	n.d.	MEK, Fyn	herab	n.d.	nein	ja
<i>Opn</i>	Mm.288474	hoch	hoch	MEK, Fyn	überwiegend hoch	überwiegend hoch	ja	ja
NA	Mm.204306	hoch	n.d.	Fyn	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Igfbp3</i>	Mm.380693	früh hoch spät herab	?	MEK, Fyn, PI3K	hoch	überwiegend hoch	ja	ja
<i>Taal6</i>	Mm.856	hoch	?	Fyn	überwiegend hoch	überwiegend hoch	nein	ja

Tab. 3. Übersicht über die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse. Für elf selektierte, differenziell exprimierte Gene wurden die Expressionslevel in melan a Hm-Zellen sowie in humanen Melanomzelllinien mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) und Western Blots bestimmt.

n.d. = nicht durchgeführt

Die Microarray-Analyse hat viele weitere Daten geliefert, die im Rahmen dieser Arbeit nach einer sehr stringenten qualitativen und quantitativen Selektion nicht berücksichtigt wurden (Abb. 19). Für mehr als zwei Drittel der auf dem Chip befindlichen 21.168 Spots genügte die erhaltenen M-Werte, Intensitäten und Wertigkeiten nicht den hohen qualitativen Anforderungen. Durch Wiederholung des Microarray-Experiments ließe sich dieser hohe Anteil möglicherweise reduzieren. Außerdem wurden die erhaltenen Daten nur für diejenigen Genkandidaten mittels qPCR validiert, die an mindestens einem Zeitpunkt mindestens vierfach reguliert waren. Wird diese Schwelle von vierfach auf zweifach gesenkt, steigt die Anzahl der regulierten Gene von 33 auf 1.273. Hinzu kommt, dass nur etwa drei Vierteln der Spots auf dem Chip eine UniGene-ID zugeordnet werden konnte. Da oftmals mehrere Spots dasselbe Gen darstellen, sinkt diese Anzahl nochmals etwa um die Hälfte. Das Mausgenom besteht aus schätzungsweise 30.000 Genen (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002), von denen demnach weniger als ein Drittel durch den Chip erfasst werden. Unter den fehlenden Genen waren dabei auch Melanozyten-typische Faktoren wie *Tyrosinase* oder *Mitf*. Die Microarray-Technologie stellt somit zwar eine geeignete Methode dar, um neue Kandidaten in der Xmrk-induzierten Melanomentwicklung zu identifizieren. Sie kann allerdings aufgrund technischer Einschränkungen kein vollständiges Bild der durch Xmrk regulierten Signalwege geben. Bei Analysen der Expression auf mRNA-Ebene ist

außerdem zu berücksichtigen, dass mRNA-Level nicht notwendigerweise die entsprechenden Proteinlevel reflektieren.

Die quantitative Analyse der Proteinexpression wird durch differenzielle Proteomik möglich. Als zur differentiellen Transkriptomik komplementäre Methode liefert sie Ergebnisse, die in der Regel zwar nicht signifikant mit den Daten der Genexpressionsanalyse überlappen, diese aber ergänzen (Link *et al.*, 2006). So wurden in einem Vorversuch zur Etablierung der "Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation" (iTRAQ)-Technologie für den Vergleich EGF-stimulierter melan a Hm-Zellen mit unstimulierten Zellen 54 regulierte Proteine identifiziert (Beck, 2007). Für ein reguliertes Protein (Galectin-1) wurde ein korrespondierendes, in der Microarray-Analyse differenziell reguliertes Gen gefunden.

In einem Vergleich der Proteome von gesundem Gewebe mit benignen Läsionen und malignen Melanomen aus *Xiphophorus* mittels klassischer 2D-Gelelektrophorese bzw. "differential in-gel electrophoresis" (DIGE) und anschließender massenspektrometrischer Proteinidentifikation wurden kürzlich 65 differenziell exprimierte Proteine bestimmt, von denen zwei Kandidaten (Enolase 1 und "F-actin capping protein") auch in der Microarray-Analyse von melan a Hm-Zellen differenziell reguliert waren (Denker *et al.*, eingereicht).

Die Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese wird u.a. durch die mangelhafte Detektion von Signalmolekülen und anderen Proteinen geringer Abundanz, die Schätzungen zufolge mehr als die Hälfte des Proteoms ausmachen, limitiert (Link *et al.*, 2006). Weiterhin werden Proteine mit extremen isoelektrischen Punkten und/oder molekularen Massen sowie Proteine, die mit der Membranfraktion assoziiert sind, in der 2D-Gelelektrophorese schlecht repräsentiert (Lim & Elenitoba-Johnson, 2004). Demnach lässt sich auch durch differenzielle Proteomik nicht die Gesamtheit der möglicherweise für die Xmrk-Signaltransduktion wichtigen Proteine auffinden.

Einen dritten Ansatz zur Aufklärung Xmrk-induzierter Signalwege stellt die Identifizierung von Interaktionspartnern des Rezeptors dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Split-Ubiquitin-Technologie in *Saccharomyces cerevisiae* für Xmrk als "bait" etabliert werden. Weder dieses modifizierte noch das klassische Hefe-Zweihybrid-System waren jedoch für Xmrk geeignet. Beide Methoden wurden bereits mit Erfolg für andere Proteine angewendet (Ito *et al.*, 2001; Rain *et al.*, 2001; Teutschbein *et al.*, 2007; Eckert & Johnsson, 2003; Pasch *et al.*, 2005; Nikko & André, 2007), scheinen jedoch an der fehlenden oder instabilen Expression von Xmrk oder an einer sterisch ungünstigen Faltung des Proteins in Hefezellen zu scheitern.

Möglicherweise könnte Xmrk dennoch Interaktionsstudien zugänglich gemacht werden, indem nur der C-terminale Teil von Xmrk als "bait" im Split-Ubiquitin-System eingesetzt wird oder indem alternative Zweihybrid-basierte Methoden oder

Koimmunpräzipitation mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung und massenspektrometrischer Identifizierung der Proteine angewendet werden.

Für die Analyse der Interaktion zwischen FAK und FYN, die im Zusammenspiel mit Xmrk in die Migration von Pigmentzellen involviert sind, konnte das Split-Ubiquitin-System in dieser Arbeit erfolgreich eingesetzt werden. Die Klonierung einer cDNA-Bank in den "prey"-Vektor würde ein Screening nach neuen Interaktionspartnern von FYN ermöglichen. Das wäre sowohl in Zusammenhang mit der Xmrk/FAK/FYN-vermittelten Migration als auch hinsichtlich der anscheinend zentralen Rolle von FYN in der Regulation der Genexpression durch Xmrk von Interesse.

Als gut etabliertes Tiermodell in der Melanomforschung konnte das *Xiphophorus*-Melanom-Modell in der Vergangenheit bereits erfolgreich zur Identifizierung von Molekülen und Aufklärung von Prozessen, die auch in der humanen Melanomentstehung von Bedeutung sind, eingesetzt werden (Meierjohann & Scharl, 2006). Wie in dieser Arbeit durch Identifizierung der potenziellen neuen Melanommoleküle DUSP4 und TAAL6 sowie am Beispiel der FAK-FYN-Interaktion gezeigt, können verschiedene Ansätze – die Analyse der differentiellen Genexpression, differentielle Proteinexpressionsanalysen und Protein-Protein-Interaktionsstudien – dazu beitragen, das von Xmrk ausgelöste Signaltransduktionsnetzwerk und damit auch Ereignisse während der humanen Melanomprogression besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

- Anders F, Schartl M, Barnekow A, Anders A. (1984) *Xiphophorus* as an *in vivo* model for studies on normal and defective control of oncogenes. *Adv Cancer Res* 42:191-275.
- Anderson J, Burns HD, Enriquez-Harris P, Wilkie AO, Heath JK. (1998) Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Hum Mol Genet* 7:1475-83.
- Arold ST, Ulmer TS, Mulhern TD, Werner JM, Ladbury JE, Campbell ID, *et al.* (2001) The role of the Src homology 3-Src homology 2 interface in the regulation of Src kinases. *J Biol Chem* 276:17199-205.
- Arslan AA, Gold LI, Mittal K, Suen TC, Belitskaya-Levy I, Tang MS, *et al.* (2005) Gene expression studies provide clues to the pathogenesis of uterine leiomyoma: new evidence and a systematic review. *Hum Reprod* 20:852-63.
- Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Takahashi M. (1995) Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol* 15:1613-9.
- Barak V, Frenkel S, Kalickman I, Maniotis AJ, Folberg R, Pe'er J. (2007) Serum markers to detect metastatic uveal melanoma. *Anticancer Res.* 27:1897-900.
- Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, Pinkel D, DePinho RA, Chin L. (2001) Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Mol Cell Biol* 21:2144-53.
- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14:920-4.
- Beck F. (2007) Quantitative proteome analysis of Xmrk transfected mouse cell line (Melan a HM). (Bachelor Thesis)
- Becker JC, Kirkwood JM, Agarwala SS, Dummer R, Schrama D, Hauschild A. (2006) Molecularly targeted therapy for melanoma: current reality and future options. *Cancer* 107:2317-27.
- Béjar J, Hong Y, Schartl M. (2003) Mitf expression is sufficient to direct differentiation of medaka blastula derived stem cells to melanocytes. *Development* 130:6545-53.
- Ben-Porath I, Benvenisty N. (1996) Characterization of a tumor-associated gene, a member of a novel family of genes encoding membrane glycoproteins. *Gene* 183:69-75.
- Ben-Porath I, Yanuka O, Benvenisty N. (1999) The tmp gene, encoding a membrane protein, is a c-Myc target with a tumorigenic activity. *Mol Cell Biol* 19:3529-39.
- Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, *et al.* (1986) A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 320:415-21.

- Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, *et al.* (2000) Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406:536-40.
- Bongarzone I, Vignani E, Alberti L, Mondellini P, Uggeri M, Pasini B, *et al.* (1999) The Glu632-Leu633 deletion in cysteine rich domain of Ret induces constitutive dimerization and alters the processing of the receptor protein. *Oncogene* 18:4833-8.
- Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ, Serrels B, Metcalf CA 3rd, Sawyer TK, *et al.* (2005) Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res* 65:1335-42.
- Cary LA, Chang JF, Guan JL. (1996) Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Science* 109:1787-94.
- Causier B, Davies B. (2002) Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol* 50:855-70.
- Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH, *et al.* (1993) Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260:1338-43.
- Chen Y, Du XY. (2007) Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61. *J Cell Biochem* 100:1337-45.
- Chien W, Kumagai T, Miller CW, Desmond JC, Frank JM, Said JW, *et al.* (2004) Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells. *J Biol Chem* 279:53087-96.
- Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, *et al.* (1997) Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility *in vivo*. *Genes Dev* 11:2822-34.
- Cooper LA, Shen TL, Guan JL. (2003) Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol* 23:8030-41.
- Croci S, Landuzzi L, Astolfi A, Nicoletti G, Rosolen A, Sartori F, *et al.* (2004) Inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression decreases the survival and myogenic differentiation of human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res* 64:1730-6.
- Delfgaauw J, Duschl J, Wellbrock C, Froschauer C, Scharl M, Altschmied J. (2003) MITF-M plays an essential role in transcriptional activation and signal transduction in *Xiphophorus* melanoma. *Gene* 320:117-26.
- Denker K, Meierjohann S, Schütz C, Teutschbein J, Scharl M, Sickmann A. Quantitative differential proteome analysis in an animal model for human melanoma. (eingereicht)

- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, *et al.* (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14:457-60.
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, *et al.* (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8024-9.
- Dimitrijevic N, Winkler C, Wellbrock C, Gómez A, Duschl J, Altschmied J, *et al.* (1998) Activation of the Xmrk proto-oncogene of *Xiphophorus* by overexpression and mutational alterations. *Oncogene* 16:1681-90.
- Dohmen RJ, Stappen R, McGrath JP, Forrová H, Kolarov J, Goffeau A, *et al.* (1995) An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 270:18099-109.
- Drmanac S, Drmanac R. (1994) Processing of cDNA and genomic kilobase-size clones for massive screening, mapping and sequencing by hybridization. *Biotechniques* 17:328-329, 332-336.
- Dudoit S, Yang YH, Callow MJ, Speed TP. (2002) Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* 12:111-139.
- Dunty JM, Gabarra-Niecko V, King ML, Ceccarelli DF, Eck MJ, Schaller MD. (2004) FERM domain interaction promotes FAK signaling. *Mol Cell Biol* 24:5353-68.
- Eckert JH, Johnsson N. (2003) Pex10p links the ubiquitin conjugating enzyme Pex4p to the protein import machinery of the peroxisome. *J Cell Sci* 116:3623-34.
- Fields S, Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-6.
- Galvin BD, Hart KC, Meyer AN, Webster MK, Donoghue DJ. (1996) Constitutive receptor activation by Crouzon syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor (FGFR)2 and FGFR2/Neu chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7894-9.
- Geisler M, Kolukisaoglu HU, Bouchard R, Billion K, Berger J, Saal B, *et al.* (2003) TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Mol Biol Cell* 14:4238-49
- Geissinger E, Weisser C, Fischer P, Scharl M, Wellbrock C. (2002) Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen. *Cancer Res* 62:4820-8.
- Goding CR. (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14:1712-28.
- Gómez A, Wellbrock C, Gutbrod H, Dimitrijevic N, Scharl M. (2001) Ligand-independent dimerization and activation of the oncogenic Xmrk receptor by two mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem* 276:3333-40.

- Gordon M. (1927) The genetics of viviparous top-minnow *Platyopocilus*; the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics* 12:253-83.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445:851-7
- Gromöller A, Lehming N. (2000) Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *EMBO J* 19:6845-52.
- Halaban R. (1996) Growth factors and melanomas. *Semin Oncol* 23:673-81.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-16.
- Hashimoto Y, Shindo-Okada N, Tani M, Nagamachi Y, Takeuchi K, Shiroishi T, *et al.* (1998) Expression of the Elm1 gene, a novel gene of the CCN (connective tissue growth factor, Cyr61/Cef10, and neuroblastoma overexpressed gene) family, suppresses *in vivo* tumor growth and metastasis of K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med* 187:289-96.
- He HJ, Kole S, Kwon YK, Crow MT, Bernier M. (2003) Interaction of filamin A with the insulin receptor alters insulin-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 278:27096-104.
- High WA, Robinson WA. (2007) Genetic mutations involved in melanoma: a summary of our current understanding. *Adv Dermatol* 23:61-79.
- Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Strelow DN, Nelson JA, Ilic D, *et al.* (2003) Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol* 160:753-67.
- Huang C, Liu J, Haudenschild CC, Zhan X. (1998) The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem* 273:25770-6.
- Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, *et al.* (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 272:2927-35.
- Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R. (2003) Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *J Biol Chem* 278:48367-76.
- Huang J, Hamasaki H, Nakamoto T, Honda H, Hirai H, Saito M, *et al.* (2002) Differential regulation of cell migration, actin stress fiber organization, and cell transformation by functional domains of Crk-associated substrate. *J Biol Chem* 277:27265-72.
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4569-74.
- Ivry GB, Ogle CA, Shim EK. (2006) Role of sun exposure in melanoma. *Dermatol Surg* 32:481-92.

- Johnson FM, Gallick GE. (2007) SRC family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 7:651-9.
- Johnsson N, Varshavsky A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10340-4.
- Kaiser B, Munder T, Saluz HP, Künkel W, Eck R. (1999) Identification of a gene encoding the pyruvate decarboxylase gene regulator CaPdc2p from *Candida albicans*. *Yeast* 15:585-91.
- Kannan K, Sharpless NE, Xu J, O'Hagan RC, Bosenberg M, Chin L. (2003) Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1221-5.
- Kazianis S, Morizot DC, Coletta LD, Johnston DA, Woolcock B, Vielkind JR, *et al.* (1999) Comparative structure and characterization of a CDKN2 gene in a *Xiphophorus* fish melanoma model. *Oncogene* 18:5088-99.
- Kim CJ, Reintgen DS, Yeatman TJ. (2002) The promise of microarray technology in melanoma care. *Cancer Control* 9:49-53.
- Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. (2007) Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol* 20:102-7.
- Kosswig C. (1928) Über Kreuzungen zwischen den Teleostiern *Xiphophorus helleri* und *Platypoecilus maculatus*. *Z Indukt Abstammungs-Vererbungslehre* 47:150-158.
- Kunz M, Moeller S, Koczan D, Lorenz P, Wenger RH, Glocker MO, *et al.* (2003) Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *J Biol Chem* 278:45651-60.
- Kurebayashi J. (2001) Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 8:45-51.
- Kusewitt DF, Ley RD. (1996) Animal models of melanoma. *Cancer Surv* 26:35-70.
- Legrain P, Wojcik J, Gauthier JM. (2001) Protein-protein interaction maps: a lead towards cellular functions. *Trends Genet* 17:346-52.
- Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. (2004) Proteomics in pathology research. *Lab Invest* 84:1227-44.
- Lin MT, Chang CC, Chen ST, Chang HL, Su JL, Chau YP, *et al.* (2004) Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation. *J Biol Chem* 279:24015-23.
- Link V, Carvalho L, Castanon I, Stockinger P, Shevchenko A, Heisenberg CP. (2006) Identification of regulators of germ layer morphogenesis using proteomics in zebrafish. *J Cell Sci* 119:2073-83.
- Mackay A, Jones C, Dexter T, Silva RL, Bulmer K, Jones A, *et al.* (2003) cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Oncogene* 22:2680-8.
- Meierjohann S, Mueller T, Scharl M, Buehner M. (2006a) A structural model of the extracellular domain of the oncogenic EGFR variant Xmrk. *Zebrafish* 3:359-69.

- Meierjohann S, Scharl M. (2006) From Mendelian to molecular genetics: the *Xiphophorus* melanoma model. *Trends Genet* 22:654-61.
- Meierjohann S, Wende E, Kraiss A, Wellbrock C, Scharl M. (2006b) The oncogenic epidermal growth factor receptor variant *Xiphophorus* melanoma receptor kinase induces motility in melanocytes by modulation of focal adhesions. *Cancer Res* 66:3145-52.
- Merlino G, Noonan FP. (2003) Modeling gene-environment interactions in malignant melanoma. *Trends Mol Med* 9:102-8.
- Mo YY, Moschos SJ. (2005) Targeting Ubc9 for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 9:1203-16.
- Mo YY, Yu Y, Theodosiou E, Rachel Ee PL, Beck WT. (2005) A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene* 24:2677-83.
- Morcinek JC, Weisser C, Geissinger E, Scharl M, Wellbrock C. (2002) Activation of STAT5 triggers proliferation and contributes to anti-apoptotic signalling mediated by the oncogenic Xmrk kinase. *Oncogene* 21:1668-78.
- Moscatello DK, Montgomery RB, Sundareshan P, McDanel H, Wong MY, Wong AJ. (1996) Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene* 13:85-96.
- Moschos SJ, Mo YY. (2006) Role of SUMO/Ubc9 in DNA damage repair and tumorigenesis. *J Mol Histol* 37:309-19.
- Moschos SJ, Smith AP, Mandic M, Athanassiou C, Watson-Hurst K, Jukic DM, *et al.* (2007) SAGE and antibody array analysis of melanoma-infiltrated lymph nodes: identification of Ubc9 as an important molecule in advanced-stage melanomas. *Oncogene* 26:4216-25.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-62.
- Müller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S. (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:202-10.
- Murakami H, Arnheiter H. (2005) Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner. *Pigment Cell Res* 18:265-77.
- Nikko E, André B. (2007) Split-ubiquitin two-hybrid assay to analyze protein-protein interactions at the endosome: application to *Saccharomyces cerevisiae* Bro1 interacting with ESCRT complexes, the Doa4 ubiquitin hydrolase, and the Rsp5 ubiquitin ligase. *Eukaryot Cell* 6:1266-77.
- Omholt K, Kröckel D, Ringborg U, Hansson J. (2006) Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 16:197-200.
- Pasch JC, Nickelsen J, Schünemann D. (2005) The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:440-7.
- Pickart CM, Fushman D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8:610-6.

- Pilarsky CP, Schmidt U, Eissrich C, Stade J, Froschermaier SE, Haase M, *et al.* (1998) Expression of the extracellular matrix signaling molecule Cyr61 is downregulated in prostate cancer. *Prostate* 36:85-91.
- Porfiri E, McCormick F. (1996) Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by phosphorylation of the ras exchange factor hSOS1. *J Biol Chem.* 271:5871-7.
- Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, *et al.* (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409:211-5.
- Ramnarain DB, Park S, Lee DY, Hatanpaa KJ, Scoggin SO, Otu H, *et al.* (2006) Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res* 66:867-74.
- Reichel C, Johnsson N. (2005) The split-ubiquitin sensor: measuring interactions and conformational alterations of proteins *in vivo*. *Methods Enzymol* 399:757-76.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-11.
- Robertson SC, Meyer AN, Hart KC, Galvin BD, Webster MK, Donoghue DJ. (1998) Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4567-72.
- Robertson SC, Tynan JA, Donoghue DJ. (2000) RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet* 16:265-71.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Parsons JT. (1999) Complex formation with focal adhesion kinase: a mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Mol Biol Cell* 10:3489-505.
- Schaller MD. (2001) Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20:6459-72.
- Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. (1999) Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 71:435-78.
- Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. (2004) Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1692:77-102.
- Schlessinger J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-25.
- Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Pe'er J, Maniotis AJ, Trent JM, *et al.* (2002) Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 19:233-46.
- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, *et al.* (2000) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2:249-56.
- Smith SH, Goldschmidt MH, McManus PM. (2002) A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol* 39:651-78.

- Songyang Z, Carraway KL 3rd, Eck MJ, Harrison SC, Feldman RA, Mohammadi M, *et al.* (1995) Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373:536-9.
- Sosman JA, Puzanov I. (2006) Molecular targets in melanoma from angiogenesis to apoptosis. *Clin Cancer Res* 12:2376s-2383s.
- Stagljar I, Fields S. (2002) Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. *Trends Biochem Sci* 27:559-63.
- Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, *et al.* (2004) Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 64:7002-10.
- Sternberg MJ, Gullick WJ. (1989) Neu receptor dimerization. *Nature* 339:587.
- Teutschbein J, Samans B, Krause M, Eilers M, Scharl M, Meierjohann S. Gene expression analysis after receptor tyrosine kinase induction reveals novel melanoma proteins. (Manuskript B.1; eingereicht)
- Teutschbein J, Scharl M, Meierjohann S. Interaction of *Xiphophorus* and murine FYN with Focal Adhesion Kinase. (Manuskript B.2)
- Teutschbein J, Schumann G, Möllmann U, Grabley S, Cole ST, Munder T. (2007) A protein linkage map of the ESAT-6 secretion system 1 (ESX-1) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Res* (doi:10.1016/j.micres.2006.11.016).
- Thomas JW, Ellis B, Boerner RJ, Knight WB, White GC 2nd, Schaller MD. (1998) SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem* 273:577-83.
- Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. (2005) Cutaneous melanoma. *Lancet* 365:687-701.
- Tong X, Xie D, O'Kelly J, Miller CW, Muller-Tidow C, Koeffler HP. (2001) Cyr61, a member of CCN family, is a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. *J Biol Chem* 276:47709-14.
- Tower GB, Coon CI, Belguise K, Chalbos D, Brinckerhoff CE. (2003) Fra-1 targets the AP-1 site/2G single nucleotide polymorphism (ETS site) in the MMP-1 promoter. *Eur J Biochem* 270:4216-25.
- Tsai MS, Bogart DF, Li P, Mehmi I, Lupu R. (2002) Expression and regulation of Cyr61 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 21:964-73.
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, *et al.* (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403:623-7.
- Van Criekinge W, Beyaert R. (1999) Yeast two-hybrid: state of the art. *Biol Proced Online* 2:1-38.
- Vogelstein B, Kinzler KW. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:789-99.

- Vollert CS, Uetz P. (2006) The Two-hybrid System. Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine (ERGPM), Springer Verlag 20:1945-9.
- Wakamatsu Y. (1981) Establishment of a cell line from the platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res* 41:679-80.
- Walhout AJ, Sordella R, Lu X, Hartley JL, Temple GF, Brasch MA, *et al.* (2000) Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* 287:116-22.
- Walker TM, Van Ginkel PR, Gee RL, Ahmadi H, Subramanian L, Ksander BR, *et al.* (2002) Expression of angiogenic factors Cyr61 and tissue factor in uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 120:1719-25.
- Webster MK, D'Avis PY, Robertson SC, Donoghue DJ. (1996) Profound ligand-independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop mutation responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia type II. *Mol Cell Biol* 16:4081-7.
- Webster MK, Donoghue DJ. (1996) Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J* 15:520-7.
- Wellbrock C, Fischer P, Schartl M. (1999) PI3-kinase is involved in mitogenic signaling by the oncogenic receptor tyrosine kinase *Xiphophorus* melanoma receptor kinase in fish melanoma. *Exp Cell Res* 251:340-9.
- Wellbrock C, Gómez A, Schartl M. (2002a) Melanoma development and pigment cell transformation in *Xiphophorus*. *Microsc Res Tech* 58:456-63.
- Wellbrock C, Lammers R, Ullrich A, Schartl M. (1995) Association between the melanoma-inducing receptor tyrosine kinase Xmrk and SRC family tyrosine kinases in *Xiphophorus*. *Oncogene* 10:2135-43.
- Wellbrock C, Schartl M. (1999) Multiple binding sites in the growth factor receptor Xmrk mediate binding to p59fyn, GRB2 and Shc. *Eur J Biochem* 260:275-83.
- Wellbrock C, Schartl M. (2000) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a complex of p59fyn and the receptor tyrosine kinase Xmrk is involved in malignant transformation of pigment cells. *Eur J Biochem* 267:3513-22.
- Wellbrock C, Weisser C, Geissinger E, Troppmair J, Schartl M. (2002b) Activation of p59Fyn leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 277:6443-54.
- Wellbrock C, Weisser C, Hassel JC, Fischer P, Becker J, Vetter CS, *et al.* (2005) STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells. *Curr Biol* 15:1629-39.
- Wittbrodt J, Adam D, Malitschek B, Maueler W, Raulf F, Telling A, *et al.* (1989) Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in *Xiphophorus*. *Nature* 341:415-21.

- Wittbrodt J, Lammers R, Malitschek B, Ullrich A, Scharf M. (1992) The Xmrk receptor tyrosine kinase is activated in *Xiphophorus* malignant melanoma. *EMBO J* 11:4239-46.
- Wittke S, Dünwald M, Albertsen M, Johnsson N. (1999b) Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13:2223-32.
- Wittke S, Dünwald M, Johnsson N. (2000) Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Mol Biol Cell* 11:3859-71.
- Wittke S, Lewke N, Müller S, Johnsson N. (1999a) Probing the molecular environment of membrane proteins *in vivo*. *Mol Biol Cell* 10:2519-30.
- Wu H, Goel V, Haluska FG. (2003) PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 22:3113-22.
- Xi Y, Nakajima G, Hamil T, Fodstad O, Riker A, Ju J. (2006) Association of insulin-like growth factor binding protein-3 expression with melanoma progression. *Mol Cancer Ther* 5:3078-84.
- Xie D, Miller CW, O'Kelly J, Nakachi K, Sakashita A, Said JW, *et al.* (2001) Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. *J Biol Chem* 276:14187-94.
- Xu W, Gong L, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Yeh ET, *et al.* (2000) Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp Cell Res* 255:135-43.
- Yamamoto T, Hihara H, Nishida T, Kawai S, Toyoshima K. (1983) A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas. *Cell* 34:225-32.
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Speed TP. (2001) Normalization for cDNA microarray data. In: Bittner ML, Chen Y, Dorsel AN, Dougherty ER, editors. *Microarrays: Optical Technologies and Informatics*. San Jose: SPIE; 4266:141-52.
- Zhou Y, Dai DL, Martinka M, Su M, Zhang Y, Campos EI, *et al.* (2005) Osteopontin expression correlates with melanoma invasion. *J Invest Dermatol* 124:1044-52.

Anhang A – Zusätzliche Ergebnisse

Die Stammzellhypothese besagt, dass maligne Tumoren aus Stammzellen mit hohem proliferativen und aus stärker differenzierten Zellen bestehen. Die Krebsstammzellen haben dabei die exklusive Kapazität, sich sowohl selbst zu erneuern, d.h. Nachkommen mit ähnlichen Eigenschaften hervorzubringen, als auch zu den heterogenen Zellen zu differenzieren, die den Hauptteil des Tumors ausmachen (Reya *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2007).

Melanome entstehen durch die Transformation von Melanozyten, welche ihrerseits von unpigmentierten Vorläuferzellen der Neuralleiste, den Melanoblasten, abstammen. Entsprechend der Stammzellhypothese wurde postuliert, dass an der Progression zum malignen Melanom wahrscheinlich genetische Prozesse beteiligt sind, die auch in der Stammzellbiologie eine Rolle spielen (Klein *et al.*, 2007). Um zu untersuchen, ob derartige Signalwege bei der Xmrk-vermittelten Melanomprogression von Bedeutung sind, wurde die Expression von Genen analysiert, die in die Differenzierung von Stammzellen der Neuralleiste zu Melanozyten involviert sind.

Der Hauptregulator für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Melanozyten ist der Transkriptionsfaktor MITF, der die Expression von Enzymen für die Pigmentproduktion, nämlich Tyrosinase, "Tyrosinase-related protein 1" (TYRP1) und Dopachrom-Tautomerase (DCT) steuert (Goding, 2000; Béjar *et al.*, 2003). Weitere Marker der Melanozytendifferenzierung sind der Endothelin-Rezeptor B (EDNRB), die Rezeptortyrosinkinasen "colony stimulating factor 1 receptor" (CSF1R) und Kit sowie der Transkriptionsfaktor T-Box 2 (TBX2). Die Transkriptionsfaktoren SOX10 und AP2 sind Marker für die Neuralleiste, die in unpigmentierten Melanozytenvorläufern exprimiert, im Verlauf der Differenzierung aber herabreguliert werden (zusammengefasst in Béjar *et al.*, 2003). Die Expression dieser Kandidaten in Antwort auf Xmrk-Aktivierung, d.h. durch EGF-Stimulierung von melan a Hm-Zellen, wurde mittels qPCR analysiert (Abb. A1).

Alle aufgeführten Daten sind nur als vorläufige Ergebnisse zu betrachten, da sie bisher nicht durch mehrere biologische Replikate bestätigt wurden.

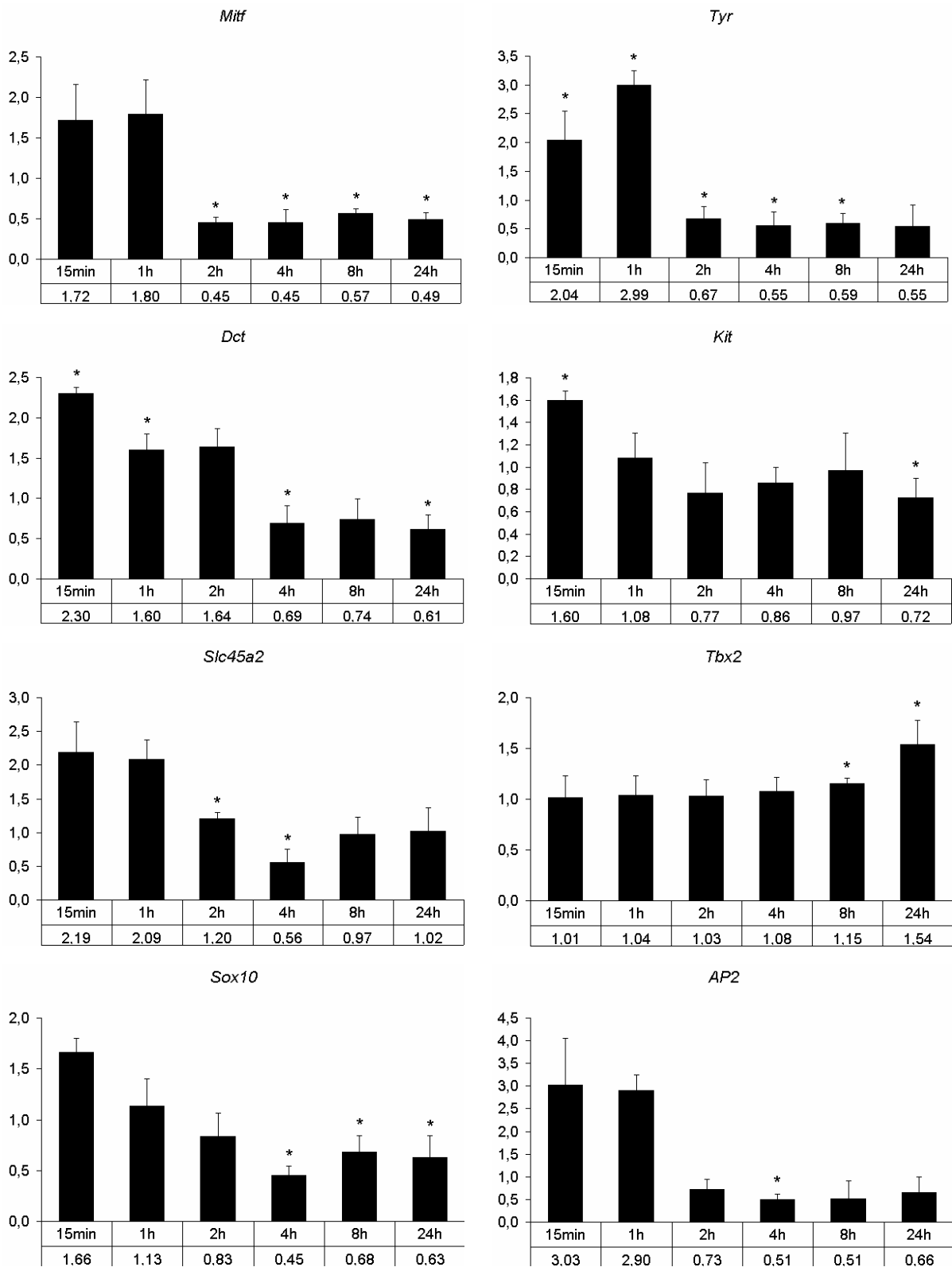


Abb. A1. Analyse der Genexpression von Neuralleisten- und Differenzierungsmarkern mittels quantitativer real-time PCR, durchgeführt wie in Teutschbein et al. (Manuskript B.1) beschrieben. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind mit einem Stern markiert (Student t-Test, gepaart, einseitig). Für *Tyrp1*, *Ednrb* und *Csf1r* liegen aus Mangel an geeigneten Oligonukleotiden keine Daten vor.

Für *Tyrp1*, *Ednrb* und *Csf1r* liegen aus Mangel an geeigneten Oligos keine Ergebnisse vor. Die *Tbx2*-Expression zeigt bis 8h nach Xmrk-Aktivierung keine Änderung und ist erst nach 24h leicht erhöht. Die übrigen Gene weisen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Genexpression auf wie der Masterregulator *Mitf*. Ihre Expression ist zu frühen Zeitpunkten (15min und 1h) bis zu dreifach erhöht, während sie später bis um die Hälfte geringer als bei unstimulierten Zellen ist.

Bereits früher wurde eine Hemmung der Differenzierung von Pigmentzellen durch Xmrk beobachtet. Es wurde gezeigt, dass die durch den Rezeptor aktivierte MAPK den Abbau von MITF induziert (Delfgaauw et al., 2003). Die Herabregulierung von *Mitf* und anderen Differenzierungsmarkern auf RNA-Ebene könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass durch Xmrk Prozesse ausgelöst werden, die die Dedifferenzierung von Pigmentzellen zur Folge haben. Untersuchungen auf Proteinebene sowie funktionelle Studien sind nötig, um diese Annahme zu verifizieren. Wie sich die Ergebnisse für den frühen Differenzierungsmarker *Tbx2* und für die Neuralleistenmarker *Sox10* und *AP2* in dieses Modell einordnen lassen, ist momentan unklar und muss ebenfalls Gegenstand weiterer Analysen sein.

Anhang B – Originalpublikationen

B.1

Teutschbein J, Samans B, Krause M, Eilers M, Scharl M, Meierjohann S. Gene expression analysis after receptor tyrosine kinase induction reveals novel melanoma proteins. (eingereicht)

Gene expression analysis after receptor tyrosine kinase induction reveals novel melanoma proteins

Authors

Janka Teutschbein,^{1,3} Birgit Samans,² Michael Krause,² Martin Eilers,² Manfred Scharl,¹ and Svenja Meierjohann¹

¹Department of Physiological Chemistry I, Biocenter, University of Würzburg, Würzburg, Germany

²Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), University of Marburg, Marburg, Germany

³present address: Department of Molecular and Applied Microbiology, Leibniz-Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans-Knoell-Institute, Jena, Germany

Running Title

Gene expression in receptor tyrosine kinase-induced melanomagenesis

Key Words

melanocytes, melanoma, oncogene, EGFR, receptor tyrosine kinase

Footnotes

Corresponding author: Svenja Meierjohann, Department of Physiological Chemistry I, Biocenter, University of Wuerzburg, Am Hubland, 97074 Wuerzburg, Germany. Phone: 49-931-8884153; Fax: 49-931-8884150; E-mail: svenja.meierjohann@biozentrum.uni-wuerzburg.de.

Abstract

Melanoma is a common, aggressive tumor with increasing incidence. At present, there is no efficient therapy for patients with advanced disease. To develop accurate prognostic markers and effective targeted therapies, the genetic changes leading to malignant transformation of melanocytes need to be understood. In the fish melanoma model system *Xiphophorus*, the oncogenic receptor tyrosine kinase Xmrk (*Xiphophorus* melanoma receptor kinase) is the sole trigger of melanoma initiation and progression. Many cellular events downstream of Xmrk have been shown to play a role in human melanomagenesis, too. The fact that Xmrk expression alone induces a full-blown tumor makes the elucidation of its downstream targets an important tool in understanding events necessary for melanoma formation.

Here, we have analyzed Xmrk-induced gene expression using a microarray approach. The genes with the strongest up-regulation in response to the activated receptor were fos-like antigen 1 (*Fosl1*), early growth response 1 (*Egr1*), osteopontin (*Opn*), insulin-like growth factor binding protein 3 (*Igfbp3*), dual-specificity phosphatase 4 (*Dusp4*), and tumor-associated antigen L6 (*Taal6*). By applying small molecule inhibitors and siRNA the pathways regulating expression of these genes were identified. Additionally, we found that *FOSL1*, *OPN*, *IGFBP3*, *DUSP4*, and *TAAL6* also exhibited increased expression levels in human melanoma cell lines compared to normal human epidermal melanocytes. These molecules constitute new interesting molecular players in the process of melanoma formation and progression whose exact role will be examined in the future.

Introduction

Melanoma development is a complex process based on many epigenetic and genetic factors. The most frequent genetic changes in human melanoma are activating mutations in either *B-RAF* or *N-RAS*. Aberrant activation of the MAPK pathway is therefore a common feature of most melanoma cells. Frequently, this is combined with inactivating mutations in phosphatase and tensin homologue (*PTEN*) or cyclin-dependent kinase inhibitor 2 a (*CDKN2A*) (1).

The search for other characteristics shared between human melanoma from different individuals has revealed the importance of several proteins influencing melanoma cell cycle progression, apoptosis, cell adhesion, and angiogenesis. Examples are cyclin-dependent kinase 4 (*CDK4*), *AKT*, β -Catenin, melanoma inhibitory activity protein (*MIA*), and Ephrin-A1 (*EFNA1*) (1, 2). Still, the search for further melanoma-relevant genes is a promising concept with potential therapeutic value, and several recent studies applying high-throughput gene expression profiling have associated previously unknown candidate genes with melanoma progression (3-6). However, it is discussed that accuracy, reproducibility, and comparability among different studies are low due to the variability of human tumor biopsies and the cultivation-dependent changes in melanoma-derived cell lines (7).

Contrarily, animal models represent genetic systems with well defined genetic background where tumorigenesis is initiated by known molecular events. Mice overexpressing hepatocyte growth factor (*Hgf*) are used as model animals for UV-induced melanoma, while spontaneous melanomas develop in mice with combined oncogene expression and tumor suppressor inactivation (8-10).

In the *Xiphophorus* fish melanoma model, a single oncogene is responsible for spontaneously developing melanoma (11). Here, expression of the oncogenic epidermal growth factor receptor (*Egfr*) family homologue *Xiphophorus* melanoma receptor kinase

(Xmrk) drives tumorigenesis. Simple crossbreeding between two *Xiphophorus* species initiates these events (12-14). The receptor's tumorigenic potential is based on two facts. On the one hand, Xmrk is strongly overexpressed in pigment cells, on the other hand, intramolecular disulfide bridges in the extracellular domains lead to ligand-independent dimerization and constitutive autophosphorylation of the receptor (15-17).

Xmrk uses several signaling cascades already known for mammalian EGFR and in addition differently evolved and pigment-cell specific pathways induce all events necessary for tumorigenesis (11). The phosphoinositide-3 kinase (PI3K) pathway and the RAS-RAF-MAPK cascade are both crucial in human melanoma and are also employed by Xmrk. Other molecules that had not been studied in melanoma before, e.g. the signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) and osteopontin (OPN), were first identified as essential mediators of Xmrk signaling and were subsequently shown to be relevant in human melanomagenesis as well (18-21). These findings prompted us to search for novel genes which are regulated by Xmrk and potentially may play a role in human melanoma progression.

For analyzing Xmrk signaling in mammalian pigment cells, we are using the murine melanocytes cell line melan a stably expressing a chimera consisting of the extracellular part of human EGFR ("HER") and the cytoplasmic part of Xmrk ("mrk") (melan a "HERmrk" or shortly "Hm"). These cells lack intrinsic EGFR, and their stimulation with human EGF results in specific induction of Xmrk-dependent signaling pathways and tumorigenic transformation. Here, we analyzed gene expression profiles of stimulated versus unstimulated cells using a microarray approach.

The genes with the strongest up-regulation in response to activated HERmrk were fos-like antigen 1 (*Fosl1*), early growth response 1 (*Egr1*), *Opn*, insulin-like growth factor binding protein 3 (*Igfbp3*), dual-specificity phosphatase 4 (*Dusp4*), and tumor-associated

antigen L6 (*Taal6*). We investigated the pathways regulating expression of these genes and confirmed their deregulated expression in human melanoma cell lines. Thus, our study contributes to the identification of melanoma proteins using the Xmrk melanoma model.

Materials and Methods

Cell culture. Mouse melanocytes transfected with HERmrk [melan a Hm cells, clone TPAVI (22)] were cultured as described previously (23). Human melanoma cell lines Mel Im, Mel Wei, Mel Juso, and SK Mel 3 (kind gifts by A. Bosserhoff) as well as A375, A375M, DX-3, LT5.1, and SK Mel 28 were maintained in DMEM supplemented with penicillin (400 U/mL), streptomycin (50 µg/mL), L-glutamine (300 µg/mL) and 10% FCS. Normal human epidermal melanocytes (NHEM) derived from foreskin were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany) and grown in melanocytes growth medium MGM (PromoCell) under a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cells were used between passages 3 and 6.

RNA isolation for microarray analysis. Melan a Hm cells were starved for 72 h with DMEM containing 2.5% dialyzed FCS. After stimulation with 100 ng/mL human EGF (hEGF) (tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) for indicated times, RNA was extracted from the cells using the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. Only RNA samples with an A₂₆₀/A₂₈₀ ratio > 1.8 and with no degradation detectable by agarose gel electrophoresis were used for microarray hybridization.

Microarray probe preparation and hybridization. Transcriptional profiling was done on a microarray containing 21,168 DNA spots from the mouse cDNA library NIA 15k and 7.4k Mouse cDNA Clone Set (National Institute on Aging, Bethesda, MD). Total RNA was purified with RNeasy spin columns (Qiagen). After mRNA amplification with MessageAmp II aRNA Kit (Ambion, Austin, TX USA), Cy3- and Cy5-labeled cDNA probes were generated using the CyScribe cDNA Post-Labeling Kit (GE Healthcare, Amersham Place, Little Chalfont England). The labeled probes were purified with QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), combined in hybridization buffer (0.2% SDS, 4.5x SSC) and hybridized on the microarray for 16 h at 55°C. Finally, the chips were washed

at a stringency of 0.1x SSC / 0.1% SDS, dried by centrifugation, scanned and quantified using Scan Array Express (Perkin Elmer, Waltham, MA USA).

Data analysis. Each experiment was performed as sandwich hybridization, i.e. instead of a coverslip, a second microarray slide was used. This provides a replicated measurement for each hybridization that can be used for quality control and that reduces technical variability. For each spot, median signal and background intensities for both channels were obtained. To account for spot differences, the background-corrected ratio of the two channels was calculated and log₂ transformed. To balance the fluorescence intensities for Cy3 and Cy5 as well as to allow for comparison of expression levels across experiments, the raw data were standardized. We used the printtip-lowess normalization to correct for inherent bias on each chip (24). Expression data and gene annotations were stored in Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) (accession: E-MEXP-1311), which complies with MIAME (minimal information about a microarray experiment) guidelines. The R environment software (<http://www.r-project.org/>) was used for data analysis. To find differently expressed genes, changes in mRNA expression levels in stimulated versus unstimulated cells were calculated for each gene. The normalized data were filtered due to strict quality criteria and analyzed using Microsoft Excel. For experimental comparisons, genes showing at least a twofold change were identified.

RNA isolation for real-time PCR. Melan a Hm cells were starved for 48 h with DMEM containing 1% dialyzed FCS and subsequently stimulated with 100 ng/mL hEGF for indicated times. RNA extraction from stimulated melan a Hm cells and human cell lines was done using Total RNA Isolation Reagent (ABgene, Epsom, UK) as recommended by the manufacturer. For the identification of pathways regulating expression of candidate genes, the small molecule inhibitors AG1478 (20 µmol/L), PP2 (20 µmol/L), LY294002 (10 µmol/L), or UO126 (10 µmol/L), respectively, were applied one hour prior to hEGF stimulation. Cells

without inhibitor treatment received the equivalent amount of DMSO. The STAT5 pathway was inhibited by transfecting 10 nmol of murine *Stat5a*-specific siRNA (5'-AACGCCACCAUCACGGACAUU-3') (Dharmacon, Lafayette, CO) with 4 μ l TransPass R2 reagent (New England Biolabs, Ipswich, MA) in 1 mL DMEM into melan a Hm cells in a well of a 6-well plate according to manufacturer's instructions. Scrambled siRNA (5'-AAGUCCAUGGUGACAGGAGAC-3') worked as a control. After twelve hours, transfection medium was replaced by DMEM/10% FCS. Eight hours later, cells were starved overnight with DMEM containing 1% dialyzed FCS. Stimulation and RNA isolation were performed as described above.

cDNA synthesis and real-time PCR. For validation of array results, identification of responsible signaling pathways and analysis of gene expression in human cell lines, real-time PCR was performed. cDNA was prepared from total RNA using the RevertAid kit with random hexamer primers (Fermentas, Burlington, Canada). PCR primers were designed using Primer3 software, with a melting temperature of 57°C to 63°C and a resulting product of 190 bp to 230 bp. PCR was carried out using the iCycler IQ (Bio-Rad, Hercules, CA). Values for each gene were normalized to expression levels of actin. Primer sequences are available on request.

Cell lysis and Western blotting. Cells were trypsinized, rinsed twice with PBS and lysed in 50 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 200 μ mol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 100 mmol/L NaF. 50 μ g of protein lysate was separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting onto nitrocellulose. Membranes were blocked for 60 minutes with TBS [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9) and 150 mmol/L NaCl], 0.1% Tween-20, and 5% bovine serum albumin (BSA) and were incubated overnight at 4°C with the first antibody. Monoclonal anti-phosphotyrosine (PY20)

was from BD Biosciences (San Jose, CA). Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) antibody was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Polyclonal antibodies against FRA-1 (N-17), EGR1 (C-19), OPN (P-18 and K-20), IGFBP3 (H-98), MKP-2 (H-67), and ERK2 (C-14) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The secondary antibodies were conjugated with horseradish peroxidase and were directed against mouse (Pierce, Rockford, IL), rabbit (Bio-Rad) or goat (Abcam, Cambridge, UK). TAAL6 mouse IgM antibody (10H6) was a kind gift from S. Roffler. Secondary antibody against mouse IgM was purchased from Rockland (Gilbertsville, PA).

Results

Temporal gene expression profile of Xmrk. To obtain a detailed picture of the time course of Xmrk-dependent gene regulation, we compared unstimulated melan a HERmrk cells to those stimulated for 15 minutes, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h or 24 h with hEGF.

Successful receptor activation was checked by two separate assays. Firstly, Western blot analysis was performed (Fig. S1A). Autophosphorylation of HERmrk was observed at each time-point after hEGF treatment, with a maximum at 1-2 h. Accordingly, phosphorylation of the downstream component MAPK was strongly increased after HERmrk stimulation, but here the peak was already reached after 15 minutes. Secondly, we performed real-time PCR to monitor expression of the known Xmrk target gene *Opn* that is induced in response to MAPK signaling (19). *Opn* was induced 2 h after adding hEGF, reached its maximum at 8 h and remained up-regulated until 24 h (Fig. S1B), confirming an efficient EGF stimulation.

Subsequent microarray analysis revealed the regulation of 1,273 genes at one or more time-points after HERmrk stimulation. A gene was considered to be regulated when changed twofold and more. The complete list of expression data and gene annotations is available at <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> (accession: E-MEXP-1311).

Regulated genes were categorized with respect to their molecular functions and biological processes according to the Gene Ontology (GO) terminology. Using the expression analysis systematic explorer (EASE) software (25), overrepresentation of the 1,273 regulated genes compared to the total number of genes assayed (21,168 spots on the chip) was calculated. Categories with an EASE score <0.05 , i.e. categories featuring enrichment of differentially expressed genes, are listed in Table 1. Among the biological processes, protein metabolism and protein modification were particularly enriched, indicating a high metabolic

activity as expected from growth factor stimulated cells, and an enhancement of signal transduction proteins. The most overrepresented molecular function was nucleic acid binding, encompassing transcription factors and factors regulating nucleic acid stability.

For further analysis, we picked eleven genes with assigned UniGene ID and more than fourfold regulation at one or more time points. The time-dependent course of expression is depicted in a color map (Fig. 1). Genes regulated at early time points were for example the secreted protein *Cyr61* and the transcription factor *Egr1*, while the epithelial membrane protein 1 (*Emp1*), and the tetraspanin protein *Taal6* were regulated at late stimulation times.

To validate the microarray results for highly regulated genes, we used quantitative real-time PCR (Fig. 2). The time course already observed in the microarray experiment was largely confirmed by real-time PCR analysis. *Sos1*, *Ube2i*, *Cyr61* and *Egr1* were mainly up-regulated after short stimulation times and decreased at later times. Although the highest transcript level for *Egr1* was detected after 1 h (174 fold), a moderate increase of transcript was also detected at all other time points (3.1–7.9-fold). The expression of *Dusp4* was highest after 1 h, but an up-regulation in comparison to the unstimulated control was visible until 24 h. In case of *Igfbp3*, the situation looked a bit different compared to the microarray experiment. While in the latter the gene was found up-regulated after 15 min and again from 4 to 24 h, the transcription induction was only visible at early times, but not at later time points when analyzed by real-time PCR. For *Fos11*, the expression was highest after 2 h (200-fold) and decreased later, but was still above the unstimulated control (3.9-fold at 24 h), similar to the situation observed in the microarray experiment. Expression levels of *Emp1* were strongly increasing from 2 to 8 h and decreased to 4-fold at 24 h. In case of the late-responding genes *Opn*, the unnamed gene product (UniGene ID Mm.204306) and *Taal6* transcript were steadily increased with the highest levels at 24 h. Altogether, in all cases except *Igfbp3*, transcript

induction as well as its time course was confirmed by real-time PCR. For *Igfbp3*, the time course of induction was slightly shifted.

Identification of signaling pathways. Previous analyses have revealed that Xmrk signals via STAT5, the PI3K pathway, the RAS-RAF-MAPK cascade, and the small SRC kinase FYN (13). Other SRC kinases present in melanocytes, such as SRC and YES, are not docking proteins for Xmrk (26). To identify the pathways responsible for modulation of the chosen eleven genes, we blocked known Xmrk-induced pathways using small molecule inhibitors. For inhibiting the receptor itself, we used the EGFR inhibitor AG1478. The MAPK kinase MEK was inhibited by UO126, FYN was inhibited by the SRC kinase inhibitor PP2, and PI3K was inhibited by LY294002. Target gene expression in presence or absence of the inhibitors was analyzed by real-time PCR (Table 2). As one might expect, the effects of hEGF on all genes were abrogated when HERmrk was inhibited by AG1478. While regulation of *Emp1* and *Opn* was both MEK- and FYN-dependent, induction of *Sos1*, *Ube2l*, *Fosl1*, *Dusp4*, the unnamed protein (Mm.204306) and *Taal6* was restrained only by inhibiting SRC-family kinases with PP2. *Cyr61* transcription was dependent on MEK and PI3K. Expression of *Igfbp3* was decreased after application of each of the inhibitors. On the contrary, none of the small molecule inhibitors could decrease *Egr1* transcription and we even observed a slight increase in *Egr1* expression after inhibition of MEK or FYN (data not shown). Therefore, we analyzed whether the Xmrk downstream component STAT5 induces *Egr1* transcription by transfecting melan a HERmrk cells with *Stat5a*-specific siRNA prior to hEGF treatment. Knockdown of *Stat5* expression to 43% resulted in significant down-regulation of EGR1 to 64% ($p < 0.05$) (Fig. 3).

Expression of candidate genes in human melanoma cell lines. For further analysis, we focused on six upregulated genes from four different functional groups: the transcription factors *Fosl1* and *Egr1*, the secreted proteins *Opn* and *Igfbp3*, the phosphatase *Dusp4*, and the

membrane protein *Taal6*. We were interested in their expression levels in human melanoma cell lines compared to normal human epidermal melanocytes (NHEM). For this analysis we chose two groups of cell lines: Mel Juso and Mel Wei were derived from primary cutaneous melanomas, whereas Mel Im, SK Mel 3, and SK Mel 28 were from metastases of malignant melanomas. Additionally, we compared the highly metastasizing cell lines A375M and LT5.1 with the corresponding less metastatic variants A375 and DX-3, respectively. In addition, the melanoma cell lines contain either activating N-RAS mutations (DX-3, LT5.1 and Mel Juso) or activating B-RAF mutations (A375, A375M, Mel Wei, Mel Im, SK Mel 3 and SK Mel 28)..

Real-time PCR revealed a significantly higher expression of *FOSL1*, *OPN*, *IGFBP3*, *DUSP4* and *TAAL6* in most of the melanoma cell lines compared to normal melanocytes (Fig. 4A). The sole exception was seen for *EGR1*, where only A375M cells displayed a significant upregulation. On protein level, NHEM displayed almost no expression of the respective proteins, whereas FOSL1, IGFBP3 and DUSP4 were strongly expressed in most of the cell lines (Fig. 4B). EGR1, OPN and TAAL6 were expressed in at least two third of the investigated cell lines, but not in NHEM cells. In each case, there was no visible correlation between protein levels and the progression state of melanoma that gave rise to the cell line (primary versus metastatic).

Discussion

The EGFR orthologue Xmrk is sufficient to trigger all biochemical events leading to malignant transformation of melanocytes. In this study, we identified novel candidate genes downstream of the oncogenic receptor and thus we were able to amend the existing model of Xmrk-induced signal transduction in pigment cells.

Interestingly, our data revealed an important role of the family of SRC kinases in regulating Xmrk-induced melanoma pathways. From previous studies it is known that FYN is the only SRC family kinase that is activated by Xmrk (26). Its inhibition by PP2 resulted in abrogation of expression level changes for nine out of the eleven genes analyzed, among them *Dusp4*, *Fos11*, *Opn*, and *Taal6*. FYN reduces MAPK phosphatase 1 (MKP-1) expression and thus prevents inactivation of MAPK but also stabilizes the complex between Xmrk and the p85 subunit of PI3K (22, 27). However, six of the nine genes whose expression was deregulated by PP2 were not affected when inhibiting MEK or PI3K. Hence, our results suggest that additional, MAPK- and PI3K-independent pathways are activated by FYN, thereby regulating expression of these target genes.

Among the gene candidates investigated, *Egr1*, *Dusp4*, *Igfbp3*, *Fos11*, *Opn*, and *Taal6* were investigated more closely due to either their robust up-regulation or because they belong to interesting functional groups such as transcription factors (*Fos11* and *Egr1*), secreted proteins (*Opn* and *Igfbp3*), phosphatases (*Dusp4*), and tetraspanin membrane proteins (*Taal6*).

OPN served as an internal control in our study. It is a secreted glycoprotein with a well-described role in both Xmrk-induced and human melanomagenesis where it binds to integrins and thereby initiates metastatic processes (19, 21). Its expression is increased via activated MAPK and, consistently, up-regulation of *Opn* by active HERmrk is decreased after

inhibition of MEK and FYN in our study. We found the gene overexpressed in most of the human melanoma cell lines, which is in accordance with our own previous studies.

FOSL1, also called fos-related antigen 1 (FRA-1), is a member of the FOS gene family encoding leucine zipper proteins that can dimerize with proteins of the JUN family and thereby form the transcription factor complex activating protein 1 (AP-1). AP-1 specifically regulates transcription of genes containing tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) responsive elements (TRE) in their promoters, thus controlling cell proliferation and transformation (28). In melanoma cells, FOSL1 binds the AP-1 complex and is considered an inhibitor of the active complex (29). Nevertheless, it can contribute to the high constitutive expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) that can enhance melanoma migration, invasion, and metastasis formation (30). In the HERmrk-melanocyte system, *Fosll* expression was induced via a FYN-dependent pathway with a maximum at 2 h after receptor activation. Specific up-regulation of *Fosll* was previously observed in response to EGFR activation. Both EGF stimulation of HeLa cells and expression of oncogenic EGFRvIII in glioblastoma cells induce *FOSL1* (31, 32). FOSL1 modulates the malignant features of glioma cells and was suggested as a new target for therapeutic interventions against malignant gliomas (33). An oral DNA vaccine directed against *Fosll* has been demonstrated to effectively suppress tumor growth, angiogenesis and metastasis in mice injected with breast carcinoma cells (34). Whether such a DNA vaccine is also applicable for glioblastoma and melanoma therapy remains to be analyzed.

Egr1 is an early growth response gene belonging to the zinc finger transcription factors. In our analysis, *Egr1* expression was strongly up-regulated with a maximum at 1 h after hEGF stimulation of HERmrk, but also robust induction at later time points when compared to the unstimulated control. This is consistent with recent studies, where EGF stimulation induced early EGR1 transcription in HeLa cells and the number of EGFR

molecules correlated to the expression of EGR1 in bladder tumors (31, 35). In the human melanoma cell lines we investigated, *EGR1* was only expressed in some cases. RNA levels were reduced in three cell lines, elevated in two cell lines, and did not remarkably change in four cell lines. This situation is also reflected by contradictory publications about the transcription factor's role in tumor progression. On the one hand, EGR1 was suggested to be a tumor suppressor since it was found to be only scarcely expressed in a variety of human tumor lines compared to their normal counterparts and is able to stimulate apoptosis (36). On the other hand, EGR1 confers resistance to apoptotic signals and is overexpressed in prostate tumors (37, 38). Suppression of EGR1 by specific RNA-cleaving phosphodiester-linked DNA-based enzymes (DNAzymes) inhibits tumor growth and angiogenesis (39). Furthermore, Gaggioli et al. observed increased fibronectin levels by exogenously expressed *EGR1* and concluded an association of EGR1 activity with the metastatic potential of melanoma cells (40). In the same study, *EGR1* expression was induced in response to hepatocyte growth factor (HGF) and reduced when blocking the MAPK pathway. On the contrary, in our system *Egr1* was up-regulated via a STAT5a-dependent pathway and Xmrk-dependent overexpression of *Egr1* seemed to be even higher when we inhibited the MAPK pathway or SRC kinases, suggesting a feedback mechanism of *Egr1* regulation. Thus, multiple pathways appear to regulate *Egr1* expression, depending on the stimulus and the molecular background of the cells. Effects of EGR1 on expression of target genes also seem to be dependent on the cellular environment. For example, EGR1 may act in an activating or repressive manner in breast carcinoma or melanoma cells, respectively, when binding to the promoter of heparanase (HPSE) which plays an important role in tumor metastasis, angiogenesis and inflammation (41). Altogether, the exact role of EGR1 in melanomagenic pathways remains to be determined.

IGFBP3 is a promising factor potentially important for melanoma, as it is robustly induced in pigment cells in response to HERmrk stimulation and strongly expressed in almost all melanoma cell lines tested, but not in NHEM cells. Both the PI3K pathway and the RAS/RAF/MAPK cascade as well as FYN seem to play a role in *Igfbp3* regulation, since each of the small molecule inhibitors abrogated the HERmrk-induced overexpression. There is one published report linking IGFBP3 to melanoma metastasis (42). In that study, expression of *IGFBP3* was higher in metastatic compared to primary melanoma samples, and knockdown of the transcript with siRNA significantly reduced cell motility, migration, and invasion of the melanoma cell line WM266-4.

DUSP4, also known as MAPK phosphatase 2 (MKP-2), dephosphorylates target proteins like ERK1/2, the stress-induced kinase p38, and c-jun kinase 1 (JNK1), though JNK1 seems to be the preferred substrate *in vivo* (43). JNK1 is involved in genotoxic stress-induced apoptosis and its inactivation by DUSP4 thus protects against apoptosis in HEK293 cells (44). In melan a HERmrk cells, *Dusp4* expression was consistently up-regulated from 1 h to 24 h after receptor activation and might therefore be a novel contributor to protection from apoptosis in pigment cells. In the Xmrk model, known anti-apoptotic pathways involve PI3K activity and the transcription factor STAT5a. On the contrary, *Dusp4* expression was dependent on the SRC-family kinase FYN. DUSP4 belongs to a large group of dual-specific phosphatases that were shown to be induced in EGF-treated HeLa cells (31). In addition, it has been assigned a tumorigenic role in breast cell carcinomas (45). Its involvement in melanoma progression is unknown as yet, although an up-regulation of *DUSP4* expression in melanoma versus benign tissue and melanoma versus skin was observed previously (6). We found a significant overexpression of this candidate in all tested human melanoma cell lines.

TAAL6 or transmembrane 4 superfamily member 1 (TM4SF1) belongs to the tetraspanin family. Most of these members are cell surface proteins with four hydrophobic

domains and mediate signal transduction events that play a role in the regulation of cell development, activation, growth and motility (46). *TAAL6* expression was found in various cancers, among them lung and breast cancer (47), but up to now no connection with melanoma progression has been reported. We identified *Taal6* as a novel candidate gene in Xmrk-induced melanomagenesis with strong up-regulation at 24 h after receptor activation. Furthermore, we observed significant expression of the antigen in six out of nine human melanoma cell lines compared to normal melanocytes. Particularly high expression was found in the highly metastasizing cell line A375M compared to A375, which might support a role of TAAL6 in metastasis as already described for lung cancer. In human lung cancer cell lines and lung carcinoma cells, *TAAL6* expression correlated with the *in-vitro* invasiveness (48). Furthermore, TAAL6 is involved in the migration of human keratinocytes (49). We also found that *Taal6* up-regulation is dependent on FYN activity. Our own studies have shown that FYN is implicated in Xmrk-induced migration of melanoma cells, so TAAL6 may possibly be a downstream factor in this process (23). Radioactive antibodies against TAAL6 are currently used for the treatment of breast cancer in experimental, pre-clinical or clinical trials. Partial or rarely complete responses to this treatment in combination with traditional external beam radiotherapy and/or chemotherapy have been reported (50). The applicability of TAAL6 antibodies in melanoma treatment remains to be investigated.

In summary, we identified two promising novel candidates that might be important for melanoma development and progression, DUSP4 and TAAL6, and confirmed the involvement of FOSL1, OPN, and IGFBP3 in melanoma. Their exact function and a potential suitability as melanoma-determining factors will be addressed in future studies.

Acknowledgments

We thank Jochen Wilhelm for providing us an R package for microarray data analysis. We thank Anja Bosserhoff for providing melanoma cell lines and useful information on these cell lines.

This work was supported by Transregio 17 (“Ras-dependent pathways in human cancer”), and the graduate college 639 “Molecular and structural basics of tumor instability”, Deutsche Forschungsgesellschaft.

References

1. Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 2003;3:559-70.
2. Bosserhoff AK. Novel biomarkers in malignant melanoma. *Clin Chim Acta*. 2006;367:28-35
3. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406:536-40.
4. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res*. 2004;64:5270-82.
5. Nambiar S, Mirmohammadsadeh A, Doroudi R, Gustrau A, Marini A, Roeder G, et al. Signaling networks in cutaneous melanoma metastasis identified by complementary DNA microarrays. *Arch Dermatol* 2005;141:165-73.
6. Talantov D, Mazumder A, Yu JX, Briggs T, Jiang Y, Backus J, et al. Novel genes associated with malignant melanoma but not with benign melanocytic lesions. *Clin Cancer Res* 2005;11:7234-42.
7. Györfy B, Lage H. A web-based data warehouse on gene expression in human malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 2007;127:394-9.
8. Merlino G, Noonan FP. Modeling gene-environment interactions in malignant melanoma. *Trends Mol Med* 2003;9:102-8.
9. Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, Pinkel D, DePinho RA, Chin L. Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Mol Cell Biol* 2001; 21:2144-53.
10. Wong AK, Chin L. An inducible melanoma model implicates a role for RAS in tumor maintenance and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:121-9.

11. Meierjohann S, Schartl M. From Mendelian to molecular genetics: the *Xiphophorus* melanoma model. *Trends Genet* 2006;22:654-61.
12. Gordon M. The genetics of viviparous top-minnow *Platypoecilus*; the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics* 1927;12:253-83.
13. Kosswig C. Über Kreuzungen zwischen den Teleostiern *Xiphophorus helleri* und *Platypoecilus maculatus*. *Z Indukt Abstammungs-Vererbungsl* 1928;47:150–158.
14. Wittbrodt J, Adam D, Malitschek B, Maueler W, Raulf F, Telling A, et al. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in *Xiphophorus*. *Nature* 1989;341:415-21.
15. Dimitrijevic N, Winkler C, Wellbrock C, Gómez A, Duschl J, Altschmied J, et al. Activation of the Xmrk proto-oncogene of *Xiphophorus* by overexpression and mutational alterations. *Oncogene* 1998;16:1681-90.
16. Gómez A, Wellbrock C, Gutbrod H, Dimitrijevic N, Schartl M. Ligand-independent dimerization and activation of the oncogenic Xmrk receptor by two mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem* 2001;276:3333-40.
17. Meierjohann S, Mueller T, Schartl M, Buehner M. A Structural Model of the Extracellular Domain of the Oncogenic EGFR Variant Xmrk. *Zebrafish* 2006;3:359-69.
18. Morcinek JC, Weisser C, Geissinger E, Schartl M, Wellbrock C. Activation of STAT5 triggers proliferation and contributes to anti-apoptotic signalling mediated by the oncogenic Xmrk kinase. *Oncogene* 2002;21:1668-78.
19. Geissinger E, Weisser C, Fischer P, Schartl M, Wellbrock C. Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen. *Cancer Res* 2002;62:4820-8.
20. Wellbrock C, Weisser C, Hassel JC, Fischer P, Becker J, Vetter CS, et al. STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells. *Curr Biol* 2005;15:1629-39.

21. Zhou Y, Dai DL, Martinka M, Su M, Zhang Y, Campos EI, et al. Osteopontin expression correlates with melanoma invasion. *J Invest Dermatol* 2005;124:1044-52.
22. Wellbrock C, Weisser C, Geissinger E, Troppmair J, Schartl M. Activation of p59^{Fyn} leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2002;277:6443-54.
23. Meierjohann S, Wende E, Kraiss A, Wellbrock C, Schartl M. The oncogenic epidermal growth factor receptor variant *Xiphophorus* melanoma receptor kinase induces motility in melanocytes by modulation of focal adhesions. *Cancer Res* 2006;66:3145-52.
24. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Speed TP. Normalization for cDNA microarray data. In: Bittner ML, Chen Y, Dorsel AN, Dougherty ER, editors. *Microarrays: Optical Technologies and Informatics*. San Jose: SPIE; 2001;4266:141–52.
25. Hosack DA, Dennis G Jr, Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 2003;4:R70.
26. Wellbrock C, Lammers R, Ullrich A, Schartl M. Association between the melanoma-inducing receptor tyrosine kinase Xmrk and SRC family tyrosine kinases in *Xiphophorus*. *Oncogene* 1995;10:2135-43.
27. Wellbrock C, Schartl M. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a complex of p59^{fyn} and the receptor tyrosine kinase Xmrk is involved in malignant transformation of pigment cells. *Eur J Biochem* 2000;267:3513-22.
28. Vogt PK. Fortuitous convergences: the beginnings of JUN. *Nat Rev Cancer* 2002;2:465-9.
29. Hoffmann E, Thiefes A, Buhrow D, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Resch K, et al. MEK-1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-κB-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors. *J Biol Chem* 2005;280:9706-18.

30. Tower GB, Coon CI, Belguise K, Chalbos D, Brinckerhoff CE. Fra-1 targets the AP-1 site/2G single nucleotide polymorphism (ETS site) in the MMP-1 promoter. *Eur J Biochem* 2003;270:4216-25.
31. Amit I, Citri A, Shay T, Lu Y, Katz M, Zhang F, et al. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nature Genet* 2007;39:503-12.
32. Ramnarain DB, Park S, Lee DY, Hatanpaa KJ, Scoggin SO, Otu H, et al. Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res* 2006;66:867-74.
33. Debinski W, Gibo DM. Fos-related antigen 1 modulates malignant features of glioma cells. *Mol Cancer Res* 2005;3:237-49.
34. Reisfeld RA, Niethammer AG, Luo Y, Xiang R. DNA vaccines suppress tumor growth and metastases by the induction of anti-angiogenesis. *Immunol Rev* 2004;199:181-90.
35. Nutt JE, Foster PA, Mellon JK, Lunec J. hEGRI is induced by EGF, inhibited by gefitinib in bladder cell lines and related to EGF receptor levels in bladder tumours. *Br J Cancer* 2007;96:762-8.
36. Liu C, Rangnekar VM, Adamson E, Mercola D. Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Ther* 1998;5:3-28.
37. Virolle T, Kronen-Herzig A, Baron V, de Gregorio G, Adamson ED, Mercola D. Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. *J Biol Chem* 2003;278:11802-10.
38. Abdulkadir SA. Mechanisms of prostate tumorigenesis: roles for transcription factors Nkx3.1 and Egr1. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1059:33-40.
39. Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, Chesterman CN, Khachigian LM. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med* 2003;9:1026-32.

40. Gaggioli C, Deckert M, Robert G, Abbe P, Batoz M, Ehrenguber MU, et al. HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* 2005;24:1423-33.
41. de Mestre AM, Soe-Htwe T, Sutcliffe EL, Rao S, Pagler EB, Hornby JR, et al. Regulation of mouse Heparanase gene expression in T lymphocytes and tumor cells. *Immunol Cell Biol* 2007;85:205-14.
42. Xi Y, Nakajima G, Hamil T, Fodstad O, Riker A, Ju J. Association of insulin-like growth factor binding protein-3 expression with melanoma progression. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3078-84.
43. Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signaling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:391-403.
44. Cadalbert L, Sloss CM, Cameron P, Plevin R. Conditional expression of MAP kinase phosphatase-2 protects against genotoxic stress-induced apoptosis by binding and selective dephosphorylation of nuclear activated c-jun N-terminal kinase. *Cell Signal* 2005;17:1254-64.
45. Wang HY, Cheng Z, Malbon CC. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Lett* 2003;191:229-37.
46. Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:397-422.
47. Hellström I, Horn D, Linsley P, Brown JP, Brankovan V, Hellström KE. Monoclonal mouse antibodies raised against human lung carcinoma. *Cancer Res* 1986;46:3917-23.
48. Kao YR, Shih JY, Wen WC, Ko YP, Chen BM, Chan YL, et al. Tumor-associated antigen L6 and the invasion of human lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:2807-16.

49. Storim J, Friedl P, Schaefer BM, Bechtel M, Wallich R, Kramer MD, et al. Molecular and functional characterization of the four-transmembrane molecule 16 in epidermal keratinocytes. *Exp Cell Res* 2001;267:233-42.
50. Stripsanelli E, Valsamaki P. Monoclonal antibodies: old and new trends in breast cancer imaging and therapeutic approach. *Hell J Nucl Med* 2005;8:103-8.

Table legends

Table 1. Expression analysis systematic explorer (EASE) report of differentially expressed genes.

EASE analysis was performed with genes that were regulated >2-fold in microarray analysis. Only selected categories with an EASE score <0.05, i.e. categories with enrichment of differentially expressed genes, are listed. The number of regulated genes belonging to the category is quoted in the column *List Hits*.

Table 2. Pathways for regulation of genes by activated HERmrk

Eleven highly regulated genes were chosen. Time and direction of the regulation maximum are itemized in the third column. Small molecule inhibitors AG1478, UO126, PP2, or LY294002 were applied to block HERmrk, the MAPK kinase MEK, SRC-family kinases, or PI3K, respectively. *Stat5a*-specific siRNA was transfected as described in Materials and Methods. Effects of the inhibitors or siRNA on expression of the candidate genes at indicated time-points were monitored by real-time PCR. “+” indicates abrogation of Xmrk-dependent change in gene expression, “-“ symbolizes that there was no effect.

Figure legends

Figure 1. Color map of Xmrk-specific gene expression.

Eleven highly regulated genes are itemized. RNA was extracted at time 0 (no hEGF) and at indicated time points after hEGF addition. The color code shows differences in the expression of the eleven genes up-regulated by >4-fold in the range of +3 (*red*) to -3 (*green*).

Sos1, son of sevenless homolog 1; *Ube2i*, ubiquitin-conjugating enzyme E2I; *Cyr61*, cysteine rich angiogenic inducer 61; *Egr1*, early growth response 1; *Dusp4*, dual specificity phosphatase 4; *Igfbp3*, insulin-like growth factor binding protein 3; *Fos11*, Fos-like antigen 1; *Emp1*, epithelial membrane protein 1; *Opn*, osteopontin; *Taal6*, tumor-associated antigen L6.

Figure 2. Validation of microarray results of the eleven candidate genes by quantitative real-time PCR.

RNA was extracted at indicated time points after HERmrk stimulation with hEGF. Expression of candidate genes was compared to unstimulated cells. The fold change of transcript, referred to the unstimulated control which is set as 1, is indicated on the y axis. Mouse actin served as reference gene. Significant regulation ($p < 0.05$) is marked by an asterisk; two asterisks indicate highly significant regulation ($p < 0.001$) (Student's t-test, paired, one-tailed).

Figure 3. Regulation of *Egr1* expression by STAT5.

Stat5a expression was inhibited by siRNA and effect on EGR1 expression after 1 h stimulation of HERmrk was analyzed by real-time PCR. Scrambled siRNA worked as a negative control and was set as 1. The fold change of transcript is indicated on the y axis, and mouse actin was used as reference gene. Significant regulation ($p < 0.05$) is marked by an asterisk (Student's t-test, paired, one-tailed).

Figure 4. Expression of candidate genes in human melanoma cell lines.

A, real-time PCR was performed to determine expression levels of *FOSL1*, *EGRI*, *OPN*, *IGFBP3*, *DUSP4* and *TAAL6* in human melanoma cell lines compared to normal melanocytes (NHEM). Mel Juso and Mel Wei originate from primary cutaneous melanomas, whereas Mel Im, SK Mel 3 and SK Mel 28 were derived from metastases of malignant melanomas. A375M and LT5.1 are highly metastasizing variants of A375 and DX-3, respectively. The fold change of transcript, referred to the NHEM cells which was set as 1, is indicated on the y axis. Human actin was used as reference gene. Significant ($p < 0.05$) or highly significant ($p < 0.001$) regulation are marked by one or two asterisks, respectively (Student's t-test, paired, one-tailed).

B, protein expression of the candidate genes in human melanoma cell lines was analyzed by Western blots. Expression of ERK2 served as loading control. Please note that the order of cell lines differs from *A*. On the OPN blot, the lower band represents the OPN protein. For TAAL6, the upper band corresponds to the protein of the expected size.

Table 1

Gene Category	List Hits	EASE score
GO Biological Process		
cell death	30	0.015
apoptotic program	6	0.030
cell-matrix adhesion	9	0.016
protein metabolism	156	0.038
protein modification	74	0.049
phosphate metabolism	56	0.015
dephosphorylation	15	0.023
protein amino acid dephosphorylation	14	0.043
response to temperature	6	0.010
ER to Golgi transport	4	0.040
ubiquitin cycle	13	0.041
biological process unknown	77	0.039
GO Molecular Function		
cell adhesion receptor activity	6	0.036
nucleic acid binding	169	0.025
DNA binding	113	0.035
protein phosphatase activity	18	0.017
translation initiation factor activity	10	0.042
ubiquitin conjugating enzyme activity	11	0.004
molecular function unknown	56	0.047

Table 2

Gene symbol	Unigene ID	Regulation in real-time PCR	Target of inhibition (inhibitor)				
			Xmrk (AG1478)	MEK (UO126)	Fyn (PP2)	PI3-K (LY294)	STAT5 (siRNA)
<i>Sos1</i>	Mm.60975	24 h down	+	-	+	-	n.d.
<i>Ube2i</i>	Mm.240044	24 h down	+	-	+	-	n.d.
<i>Cyr61</i>	Mm.1231	24 h down	+	+	-	+	n.d.
<i>Egr1</i>	Mm.181959	1 h up	+	-	-	-	+
<i>Dusp4</i>	Mm.170276	1 h up	+	-	+	-	n.d.
<i>Fosl1</i>	Mm.6215	2 h up	+	-	+	-	n.d.
<i>Emp1</i>	Mm.182785	8 h up	+	+	+	-	n.d.
<i>Opn</i>	Mm.288474	8 h up	+	+	+	-	n.d.
NA	Mm.204306	24 h up	+	-	+	-	n.d.
<i>Igfbp3</i>	Mm.380693	1 h up	+	+	+	+	n.d.
<i>Taal6</i>	Mm.856	24 h up	+	-	+	-	n.d.

Figure 1

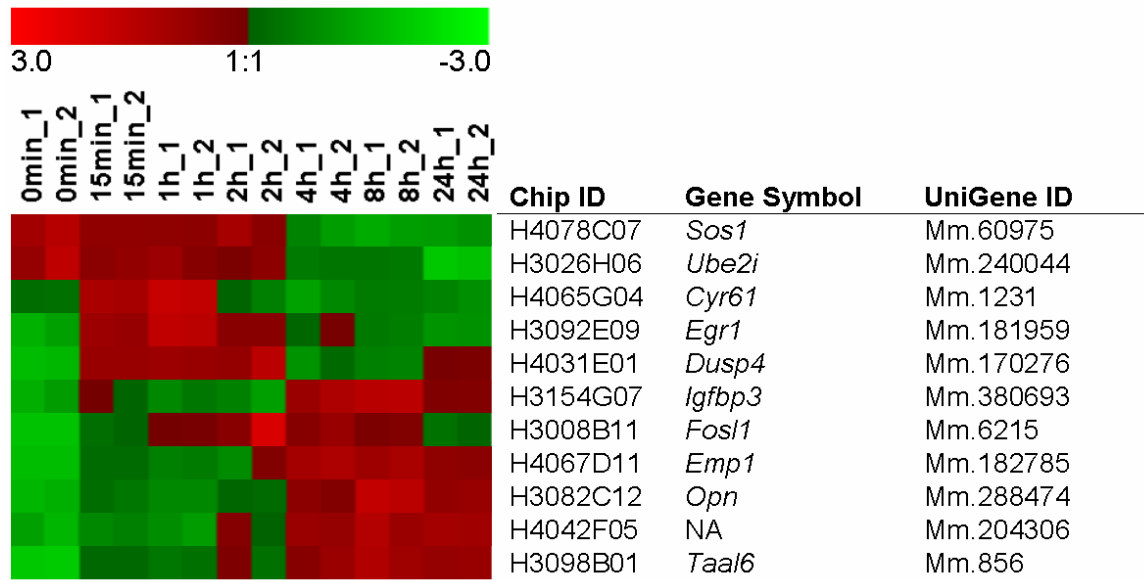


Figure 2

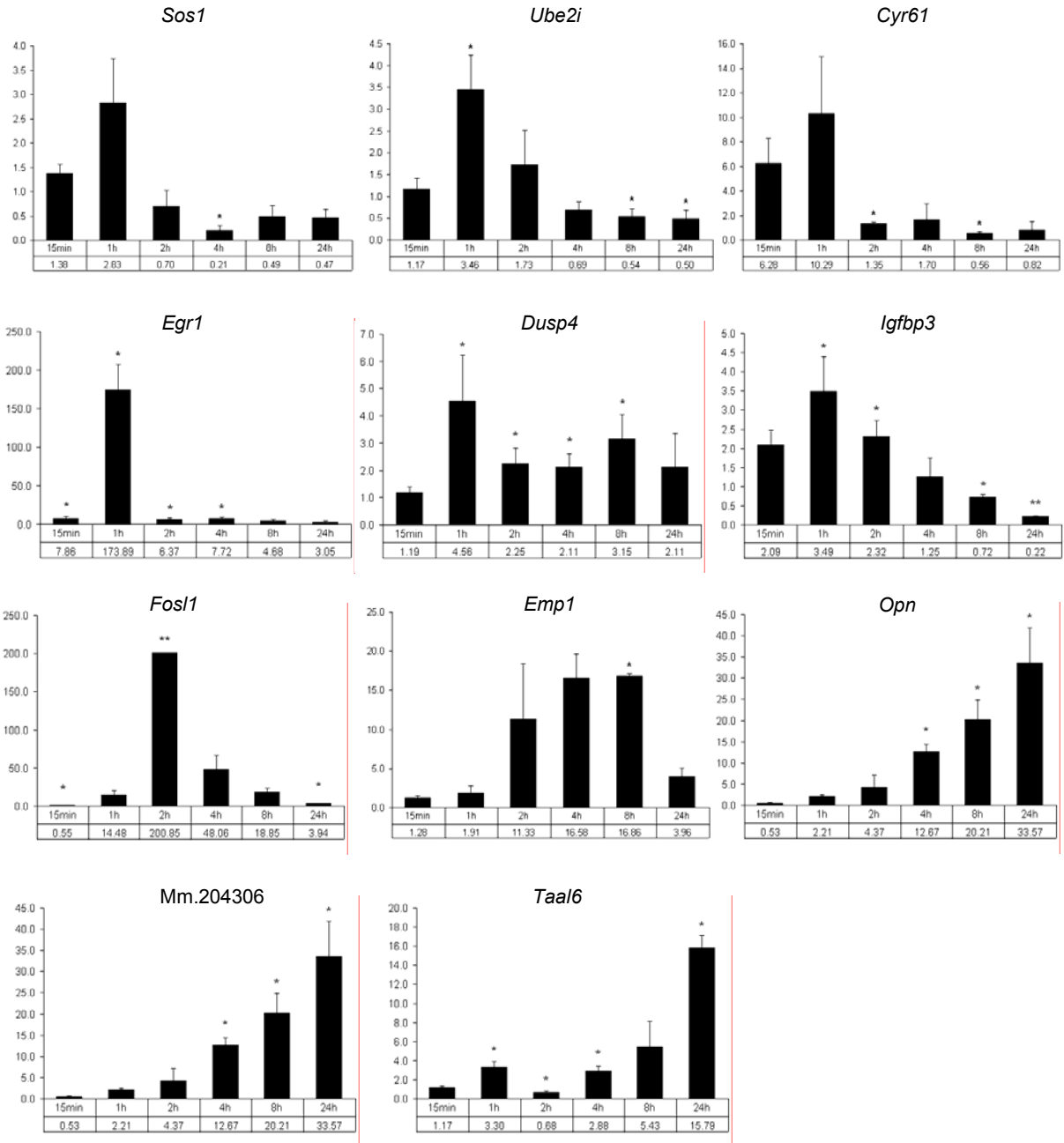


Figure 3

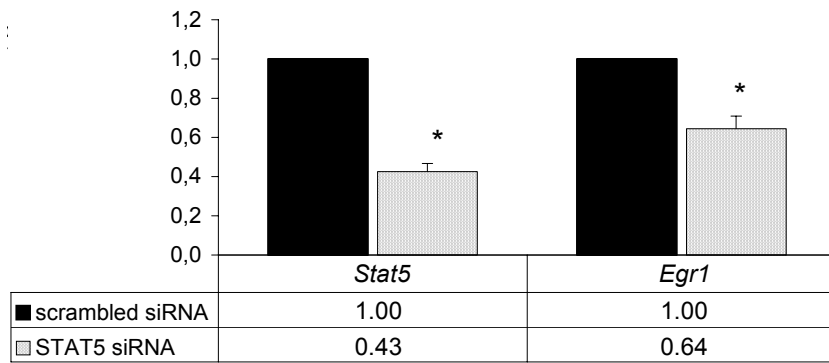


Figure 4

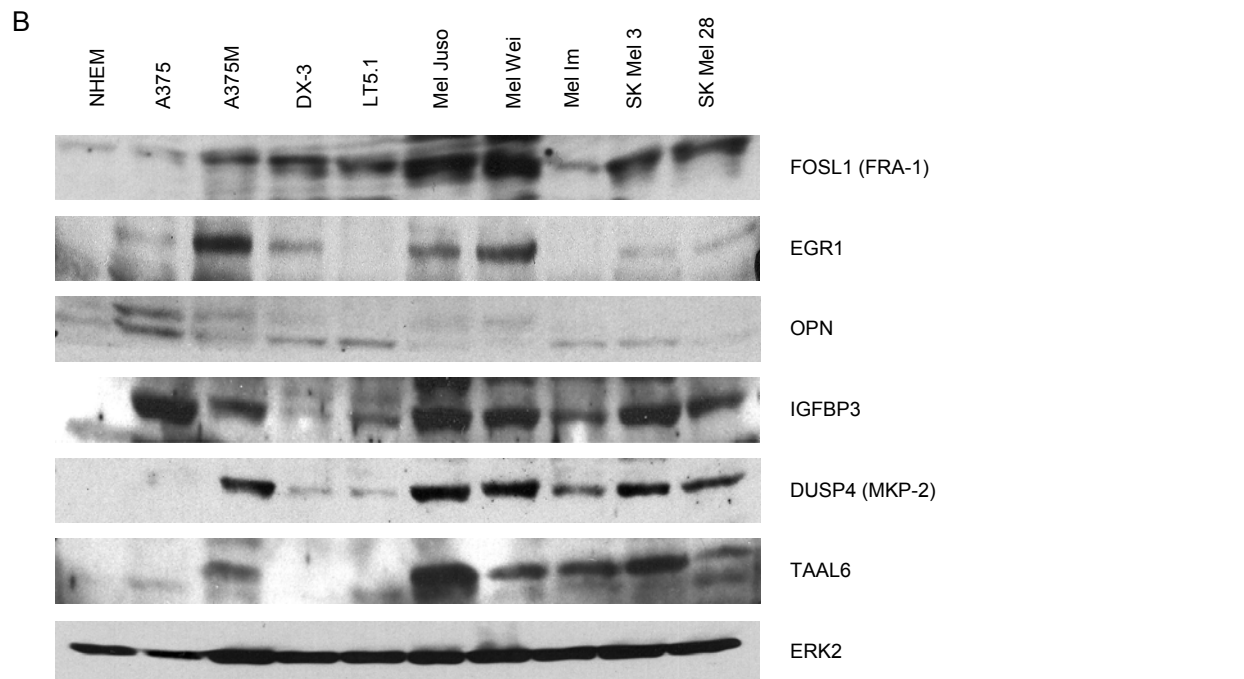
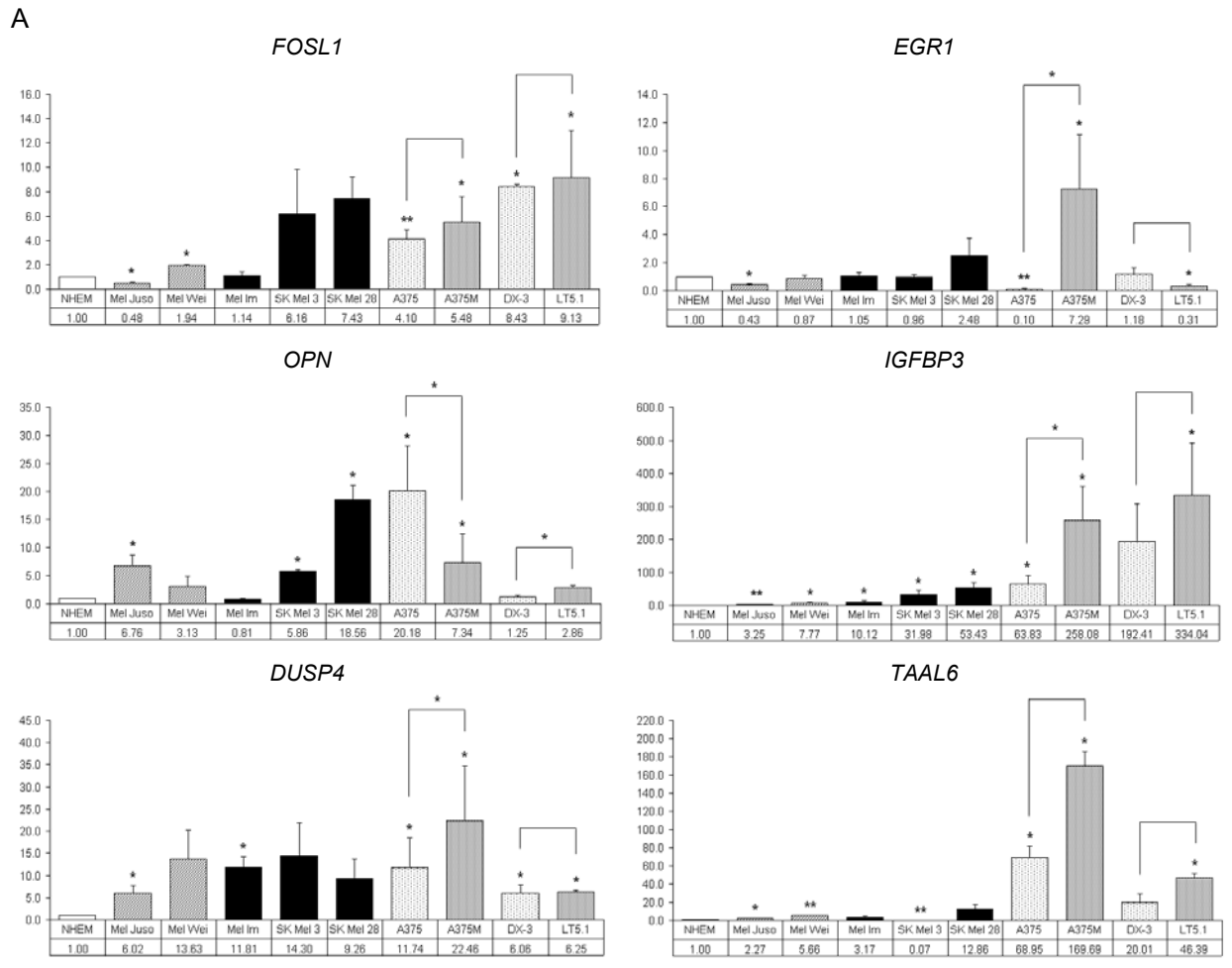


Figure legend for Supplementary Figure

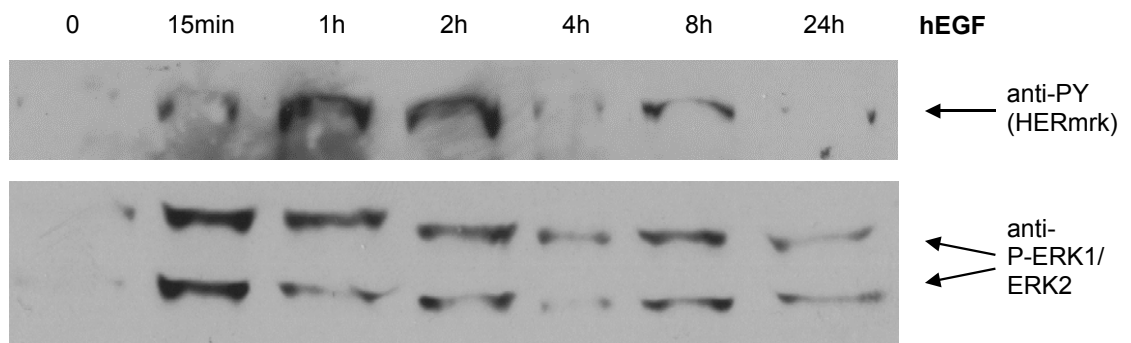
Figure S1. Activation of the chimeric receptor HERmrk.

A, stimulation of HERmrk with hEGF for indicated time periods resulted in autophosphorylation of the receptor (*top*) and phosphorylation of the downstream factor MAPK (*bottom*).

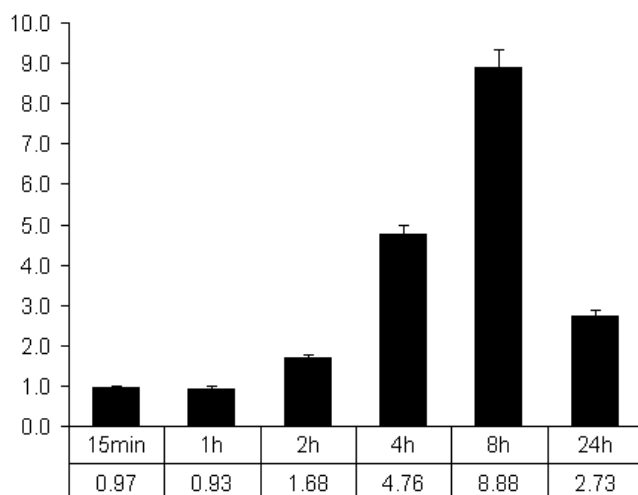
B, gene expression of the known Xmrk target *OPN* was induced after activation of HERmrk with hEGF. The fold change of transcript, referred to the unstimulated control which is set as 1, is indicated on the y axis. Mouse actin served as reference gene.

Figure S1

A



B



B.2

Teutschbein J, Scharl M, Meierjohann S. Interaction of *Xiphophorus* and murine FYN with Focal Adhesion Kinase.

Interaction of *Xiphophorus* and murine FYN with Focal Adhesion Kinase

Janka Teutschbein^{1,2}, Manfred Scharl¹, Svenja Meierjohann¹

¹Department of Physiological Chemistry I, University of Wurzburg, Biocenter, Am Hubland, 97074 Wurzburg, Germany

²present address: Department of Molecular and Applied Microbiology, Leibniz-Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans-Knoell-Institute, Jena, Germany

Abstract

The SRC family kinase/Focal Adhesion Kinase (FAK) complex is a crucial signaling platform that plays a significant role in tumor transformation downstream of oncogenic growth factor receptors. In case of melanoma formation in *Xiphophorus*, the oncogenic EGF receptor orthologue *Xiphophorus* melanoma receptor kinase (Xmrk) leads to the continuous activation of the Src family kinase Fyn, but not Src or Yes, thereby promoting many tumorigenic events. Although FYN is well expressed in most cell types, there are only few reports of an involvement of FYN in cancer development of solid tumors so far. To find out whether the prominent role of *Xiphophorus* Fyn is based on an altered binding to its most important binding partner FAK, we performed Yeast-Two-Hybrid analysis and compared *Xiphophorus* Fyn and murine FYN with respect to their binding to full-length and differently truncated FAK constructs. We found that the interaction with FAK occurs similarly for *Xiphophorus* and mouse FYN, with phosphorylated Y397 being responsible for the FAK constructs lacking the FERM domain and the proline-rich domain being mainly responsible when the FAT domain of FAK is missing. In addition, we show that FAK and FYN interact in several human melanoma cell lines. These data indicate that FYN might play a yet unrecognized role in the tumorigenesis of human melanoma, too.

Introduction

SRC family tyrosine kinases are involved in the tumorigenesis of many tumor types including melanoma. Here they affect many cellular processes such as cell differentiation, proliferation and survival (Thomas and Brugge, 1997; Mitra and Schlaepfer, 2006; Johnson and Gallick, 2007). They also play essential roles in the signaling of integrin-mediated processes such as actin organization and cell migration (Cary et al., 2002; Boyer et al., 2002; Huang et al., 2002; Meierjohann et al., 2006b; Qi et al., 2006). SRC family kinases act through numerous substrates. Cortactin, p130^{Cas}, paxillin, and focal adhesion kinase (FAK) are examples of their membrane-proximal interaction partners (Schlaepfer et al., 1999; Huang et al., 1998; Huang et al., 2002; Schaller, 2001). The non-receptor tyrosine kinase FAK is an important link between growth factor receptors and integrin signaling pathways and forms transient signaling complexes with SRC family kinases (Schlaepfer et al., 1999; Sieg et al., 2000). Increased FAK expression and phosphorylation has often been correlated with tumor progression and metastasis (Owens et al., 1995; Sieg et al., 2000; Kahana et al., 2002). In fact, the FAK-SRC complex is a crucial component at the interface between cell surface and cytoskeleton, and is considered a platform for the promotion of cell motility, cell cycle progression and cell survival (Mitra and Schlaepfer, 2006).

FAK consists of three functional regions. The N-terminal region harbors the FERM (band four point one, ezrin, radixin, and moesin) homology domain which is important for signal integration from growth factor receptors such as the EGF receptor (EGFR) and is required for EGF-stimulated motility (Sieg et al., 2000). It is followed by a proline-rich SH3-binding domain. The central part of FAK constitutes the kinase. Finally, the C-terminal part harbors two more proline-rich domains and finally the focal adhesion targeting (FAT) domain

with binding sites for the integrin-associated proteins talin and paxillin (Chen et al., 1995; Hildebrand et al., 1995; Schlaepfer and Mitra, 2004).

Binding of FAK to clustered integrin heterodimers leads to its autophosphorylation at position Tyr397. This phosphotyrosine residue then serves as high-affinity binding site for the SH2 domain of SRC kinases, and binding results in its conformational change and activation. Conversely, SRC can trans-phosphorylate residues Tyr576 and Tyr577 within the FAK kinase domain activation loop (Mitra and Schlaepfer, 2006). The stabilization of the FAK – SRC complex may be further enhanced by SRC binding to FAK via its residues 368-376 that form an SH3-domain binding motif (Thomas et al., 1998).

Most reports that connect SRC family kinases to FAK-dependent signal transduction deal with SRC itself (Schlaepfer et al., 2004; Hsia et al., 2003; Brunton et al., 2005). Still, FYN is also expressed in most cell types. An interaction between different isoforms of endogenous FAK and endogenous FYN was mostly observed in neuronal cells and occasionally in chicken embryo cells and fibroblasts (Cobb et al., 1994; Derkinderen et al., 2001; Messina et al., 2003; Zeng et al., 2003). Similarly, overexpression of FAK in CHO cells leads to association of FAK with FYN and increases migration (Cary et al., 1996). However, a possible cooperative role of FAK and FYN in tumor migration is only scarcely investigated but was described for murine melanoma cells and melanocyte cell lines expressing an oncogenic receptor tyrosine kinase (Huang et al., 2003; Meierjohann et al., 2006b).

In the *Xiphophorus* platyfish melanoma model, the Src family kinase Fyn is one of the most crucial substrates of the oncogenic EGFR orthologue Xmrk (*Xiphophorus* melanoma receptor kinase) (Wellbrock et al., 1995; Wellbrock and Schartl, 2000; Meierjohann et al., 2006). It contributes to many effects that are causative for Xmrk-driven melanoma formation, such as proliferation, migration and blocking of differentiation (Meierjohann and Schartl, 2006; Meierjohann et al., 2006a). Fyn binds both FAK and the activated Xmrk receptor,

resulting in the modulation of FAK activity and a high turnover of focal contacts, thereby facilitating detachment and migration.

To find out why Fyn plays a particularly important role in this melanoma model, we have analyzed the interaction between FAK and *Xiphophorus* Fyn using a yeast two-hybrid (Y2H) approach and have compared it to the interaction between FAK and murine FYN. We found that *Xiphophorus* Fyn binds FAK in a similar fashion as mouse FYN, suggesting that the FYN-FAK signaling platform might be comparably important in fish and mammalian tumors, but has been largely overlooked in mammalian solid tumors as yet. In support of this, we show that human melanoma cells display a constitutive FAK – FYN interaction, which suggests a role for FYN in human melanoma, too.

Materials and Methods

Cloning procedures.

Manipulation of DNA was carried out by standard procedures (Sambrook et al., 1989). cDNA molecules encoding mouse or *Xiphophorus* proteins were PCR-amplified using cDNA of the cell lines melan a or PSM, respectively, as templates (Bennett et al., 1987; Wellbrock et al., 1998; Wakamatsu et al., 1981). For the Gal4p-based two-hybrid analysis, amplified DNA fragments were inserted into pGBT9-MCS1 or pGAD424-MCS1, expressing the Gal4 DNA binding domain (BD) or the Gal4 activation domain (AD), respectively (Kaiser et al., 1999). For the split-ubiquitin based analysis, amplified DNA fragments were introduced into the plasmids STE14-C_{UB}-rURA3 or N_{UB}-UBC6 by replacing STE14 or UBC6, respectively (Wittke et al., 1999a; Wittke et al., 1999b). Specific cloning information and oligonucleotide sequences are available on request.

Yeast strains, transformation and culture conditions.

The yeast strains Y190 (*MATa ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ200 lys2-801 trp1-901 ade2-101 gal4Δ gal80Δ cyh'2 LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3 URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ*) and JD53 (*MATα ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ200 lys2-801 trp1 Δ63*) were used for Gal4p-based two-hybrid analysis and split-ubiquitin based assays, respectively (Harper et al., 1993; Dohmen et al., 1995). Transformation of yeast cells was carried out by the method of Klebe et al. (Klebe et al., 1983). Yeast transformants were selected and cultivated on SD synthetic medium (2% glucose and 0.67% yeast nitrogen base without amino acids) supplemented with essential amino acids and nucleotides.

β -galactosidase assay.

For Gal4p-based yeast two-hybrid analysis, equal numbers of cells of fresh overnight cultures were spotted onto SD plates. After 72 hours, the expression of β -galactosidase was monitored qualitatively by a filter lift assay according to Breeden & Nasmith (Breeden & Nasmith, 1985).

5-FOA assay.

For the split-ubiquitin based interaction analysis, equal numbers of cells of fresh overnight cultures were spotted onto SD plates containing 1 mg/mL 5-fluoroorotic acid (5-FOA) (Fermentas, Vilnius, Lithuania). The plates were incubated for five days at 30°C and growth of cells was monitored visually.

Cell culture and cell lysis.

All human melanoma cell lines were cultivated under sterile conditions in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cell lines A375 and A375M were grown in DMEM supplemented with penicillin (400 U/mL), streptomycin (50 μ g/ml), L-glutamine (300 μ g/mL) and 10% FCS. Cell lines Bro and D10 were maintained in RPMI supplemented similarly. At 80-90% confluence, cells were trypsinized, rinsed twice with PBS and lysed in 50 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, freshly supplied with 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 200 μ mol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 100 mmol/L NaF.

Immunoprecipitation and Western blotting.

After cell lysis, 400 μg of the whole cell lysates were diluted 1:1 in HNTG buffer [20 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 0.1% Triton X-100, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Na_3VO_4 , 1 mmol/l PMSF, and 100 mmol/L NaF]. Protein A Sepharose (30 μl , diluted 1:1 in HNTG buffer) and 1.2 μg of the respective antibody were added. The samples were incubated overnight at 4°C. After washing with HNTG buffer, Laemmli buffer was added to the Sepharose beads (Sambrook et al., 1989). Subsequently, samples were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. Membranes were blocked for 60 minutes with TBS [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9) and 150 mmol/L NaCl], 0.1% Tween-20, and 5% bovine serum albumin (BSA) and were incubated overnight at 4°C with the first antibody. Polyclonal antibodies against FYN (FYN3) and FAK (A-17) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The secondary antibodies were conjugated with horseradish peroxidase and were directed against mouse (Pierce, Rockford, IL) or rabbit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Results

Amino acid sequence conservation between *Xiphophorus* and mouse FYN.

FYN plays an outstanding role for Xmrk-driven melanoma development and is involved in dedifferentiation, proliferation and migration in this model. For mammalian SRC it was described that its interplay with FAK is the basis for multiple tumorigenic events, such as proliferation, survival, anchorage-independent growth, invasion and angiogenesis (Mitra and Schlaepfer, 2006). Still, FYN plays a much more prominent role in lymphomas and hematopoietic malignancies than in solid tumors. In particular, FYN-FAK interaction in tumorigenesis is so far rarely described (Huang et al., 2003; Meierjohann et al., 2006b). We wanted to find out whether the central role of *Xiphophorus* Fyn in solid tumor development that was not described for mammalian FYN might be explained by the protein's primary structure with particular regard to the FAK-interacting domains. An alignment between the fish and the murine protein showed a surprisingly high overall similarity of 92.2% (Figure 1). The similarities between the functional domains are as follows: SH3 domain, 88.9%; SH2 domain: 91.9%; catalytic domain: 95.9%. Most importantly, the main regulatory residues Y420 and Y531 including their surrounding residues are conserved. Y420, whose autocatalytic phosphorylation enhances enzyme activity, is situated in the catalytic domain. Y531 phosphorylation by Csk renders the enzyme inactive, but it is also target of numerous protein tyrosine phosphatases (Roskoski, 2005). From these data, *Xiphophorus* and murine FYN seem to have the same predisposition for FAK binding and downstream signaling.

Interaction of *Xiphophorus* Fyn and mouse FYN with FAK Δ 1-375 and Δ 403-1052, but not with full-length FAK.

To determine the region of FAK responsible for the binding to both FYN orthologues we constructed plasmids expressing either full-length FAK or five different FAK truncation mutants. These were either lacking the N-terminal part including the FERM domain and most of the N-terminal proline-rich domain (Δ 1-375), the C-terminus with the FAT domain (Δ 691-1052) or both the kinase domain and the C-terminus (Δ 403-1052). Moreover, we introduced the point mutations Y397F or Y397E into the Δ 1-375 variant (Fig. 2). All constructs were tagged with the N-terminal ubiquitin domain and co-transformed into yeast cells together with *Xiphophorus* Fyn, mouse FYN or mouse SRC as a control, respectively, which were fused to the ubiquitin C-terminus and the reporter rURA3. The proteins STE14 and UBC6, both located in the endoplasmic reticulum membrane, served as controls (Wittke et al., 1999b; Johnsson, personal communication). Yeast cells were cultivated on selective medium containing 5-FOA. This allowed cells expressing interacting proteins to grow whereas cells expressing non-interacting proteins should not grow.

Yeast cells expressing FYN from either *Xiphophorus* or mouse together with the FAK constructs Δ 1-375 or Δ 403-1052 grew well, whereas cells containing FYN and either full-length or Δ 691-1052 FAK failed to proliferate (Fig. 3A). Unfortunately, interaction of murine SRC with FAK variants could not be determined since the negative control with UBC6 already appeared positive, suggesting an unspecific interaction of this construct. The negative control STE14 did not interact with any of the FAK constructs tested.

To confirm the interaction between FYN and Δ 1-375 or Δ 403-1052, the Gal4p-based “classical” yeast two-hybrid system was used (Fields & Song, 1989). *Xiphophorus* Fyn, murine FYN and murine SRC were tagged with the activation domain (AD) of the transcription factor Gal4p, whereas Δ 1-375 and Δ 403-1052 were fused to the Gal4p DNA

binding domain (BD). Yeast cells co-expressing bait and prey proteins were analyzed for activity of the reporter lacZ by a β -galactosidase filter lift assay (Breedon & Nasmith, 1985) (Fig. 3B). A specific interaction between bait and prey protein was supposed to be visualized by blue staining. Δ 1-375-BD was not applicable for interaction studies, since its co-expression with the AD alone resulted in blue staining of yeast colonies due to artificial transactivation of the Δ 1-375-BD fusion protein. However, the interaction of FAK Δ 403-1052 domain with *Xiphophorus* Fyn and murine FYN as well as murine SRC was confirmed.

Phosphorylated Y397 of the FAT-containing FAK construct is necessary for interaction with FYN.

In previous studies, phosphorylation of tyrosine residue Y397 has been stated to be essential for FAK interaction with SRC family kinases (Cary et al., 1996; Thomas et al., 1998; Schaller et al., 1999; Arold et al., 2001). As the Δ 403-1052 truncation mutant of FAK interacted well with *Xiphophorus* and murine FYN despite its missing FAT domains, we expected that this FAK mutant should not be phosphorylated at Tyr397. Here, the interaction might take place via the SH3 domain of FYN and the proline-rich domain of FAK, which is located just N-terminal of the Y397 site. Still, it was not known whether the Δ 1-375 fragment containing the FAT region is phosphorylated in yeast. To clarify this, we generated the point-mutations Y397F and Y397E of the Δ 1-375 construct (Fig. 2). Split-ubiquitin analysis revealed that the Y397F mutant did not interact with murine FYN (Fig. 4). However, the Y to E substitution which mimics a phosphorylated tyrosine residue resulted in growth of the yeast cells on selective medium, confirming that phosphorylated Y397 is necessary for interaction with FYN. At the same time, these data indicate that the Y397 residue of the Δ 1-375 FAK truncation mutant is phosphorylated in yeast.

Fyn interacts with FAK in human melanoma cell lines.

As the interaction characteristics between *Xiphophorus* Fyn and FAK seem to be similar to the ones observed for murine FYN and FAK, there is no obvious reason for an exceptional role of Fyn in fish melanoma compared to human melanoma. Still, in human melanoma cell lines, FYN is rarely described. For this reason, we wanted to know whether the FYN – FAK interaction is also present in human melanoma. Co-immunoprecipitation experiments in various melanoma cell lines revealed a strong FYN – FAK interaction in all cell lines tested, i.e. A375, A375M, Bro, and D10 (Fig. 5).

Discussion

The SRC family tyrosine kinase FYN has been reported to act tumorigenic in some cell types, but tumor suppressive in others (Berwanger et al., 2002; Sorensen et al., 2008; Mariotti et al., 2001; Granot-Attas et al., 2004). In neoplastic keratinocytes, FYN is activated by EGFR and contributes to integrin-mediated migration (Mariotti et al., 2001). Similarly, mammary epithelial tumors transformed by ErbB2/Neu activate FYN which increases their transformation capacity (Granot-Attas et al., 2004). However, the role of FYN in tumors gained much less attention compared to its related protein SRC, and it is not well understood. In the *Xiphophorus* melanoma model, where aggressive melanoma are caused by the oncogenic EGF receptor orthologue Xmrk, Fyn was shown to be of particular importance for all kinds of neoplastic events, while Src and Yes did not play a similar role (Wellbrock et al., 1995, Meierjohann and Scharl, 2006a). It was also demonstrated that Fyn interacts with the Focal Adhesion Kinase FAK and both are co-localized at cellular focal contacts (Meierjohann et al., 2006b). The fact that signaling from the SRC kinase/FAK interface can lead to a plethora of events enhancing cellular transformation prompted us to perform the studies described here. To find out whether the interaction characteristics between *Xiphophorus* Fyn and FAK are the reason for the exceptional role of Fyn in this fish melanoma model, we performed Y2H analysis between *Xiphophorus* Fyn and FAK in comparison to murine FYN and FAK.

Both fish and murine FYN did not interact with full-length FAK and the terminally truncated variant $\Delta 691-1052$. These FAK constructs both contain the N-terminal FERM domain as well as the kinase domain. These observations fit well to the published data showing that the FERM domain acts autoinhibitory on FAK activity, since it can interact with the kinase domain and inhibit its phosphorylation (Lietha et al., 2007; Cooper et al., 2003;

Dunty et al., 2004). This interaction is released in response to either growth factor receptor binding to the FERM domain or the contact of integrin cluster complexes to FAT. Whether the observed constitutive FAK activity in melanoma is mainly caused by its association with integrins or RTKs is unclear. However, integrins α_3 , β_4 as well as $\alpha_v\beta_3$ integrins were directly demonstrated to induce FAK activity in melanoma cells (Yang et al., 2004; Abdel-Ghany et al., 2002; Kahana et al., 2002; Li et al., 2001; Pasco et al., 2000).

Furthermore, we showed that both *Xiphophorus* and murine FYN are able to interact with the FAK truncation mutant lacking either the FERM and N-terminal proline-rich domain or the FAT domain, but retaining Y397. When we replaced Y397 of the FERM- and proline-rich domain-truncated mutant $\Delta 1-375$ with phenylalanine, the interaction between the FAK variant $\Delta 1-375$ and FYN was disrupted. Contrarily, mutation of Y397 to a glutamate residue, which is known to mimic phosphorylated tyrosine, allowed the proteins to interact. Thus, we confirmed by Y2H that phosphorylated Y397, at least in the FAT-retaining truncation mutant, is necessary for this interaction. In addition, the results indicate that this residue is phosphorylated in the “wildtype” $\Delta 1-375$ version, most likely by binding to yeast integrin clusters. In theory, activation via the FAT-domain might be possible, since proteins similar to mammalian integrins, talin and paxillin, respectively, have been described in yeast (Hostetter et al., 1995; Holtzman et al., 1993; Gao et al., 2004). Although no yeast protein kinases have been classified as tyrosine kinases, tyrosine phosphorylation occurs in yeast due to dual specificity protein kinases (Dhanasekaran & Premkumar Reddy, 1998).

However, a phosphorylation of Y397 in the $\Delta 403-1052$ construct, lacking the FAT domain, is unlikely. Although phosphorylation at this position can be observed in $\Delta 403-1052$ FAK constructs in human fibroblasts, this was shown to occur only in response to EGFR stimulation (Sieg et al., 2000). Yeast cells do not contain receptor tyrosine kinases. We therefore believe that the interaction of *Xiphophorus* and murine FYN occurs here via the

SH3 domain of FYN and the proline-rich region of FAK that is located in the N-terminal proximity of Y397 (Thomas et al., 1998).

To our knowledge this is the first time that the complex of FAK and FYN orthologues was investigated in the living cell. Applying techniques such as immunoprecipitation and isothermal titration calorimetry, the phospho-Y397 dependent interaction of FAK with FYN was detected before (Cary et al., 1996; Schaller et al., 1999; Arold et al., 2001). In these studies, FYN was of mammalian origin. Here we show that Fyn of the species *Xiphophorus* follows the same binding characteristics as murine FYN, which renders a structural reason for the prominent role of FYN in *Xiphophorus* melanoma unlikely. Most importantly, we could demonstrate that a constitutive FAK-FYN interaction occurred in many human melanoma cell lines, too, which provides a first hint that these proteins might also play a cooperative role in human melanomagenesis. Further studies will address a possible role of FAK- and FYN-dependent signaling in melanoma.

References

- Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. Focal adhesion kinase activated by beta(4) integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth. *J Biol Chem*;277:34391-400.
- Arold ST, Ulmer TS, Mulhern TD, Werner JM, Ladbury JE, Campbell ID, Noble ME. The role of the Src homology 3-Src homology 2 interface in the regulation of Src kinases. *J Biol Chem* 2001;276:17199-205.
- Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* 1987;39:414-8.
- Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, Bernard S, Nielsen D, Krause M, Kartal A, Flynn D, Wiedemeyer R, Schwab M, Schäfer H, Christiansen H, Eiles M. Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell* 2002;2:377-86.
- Boyer B, Bourgeois Y, Poupon MF. Src kinase contributes to the metastatic spread of carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21:2347-56.
- Breeden L, Nasmyth K. Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1985;50:643-50.
- Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ, Serrels B, Metcalf CA 3rd, Sawyer TK, Frame MC. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res* 2005;65:1335-42.

- Cary LA, Chang JF, Guan JL. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Science* 1996;109:1787-94.
- Cary LA, Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Dooper JA. SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation, cell migration, and cell spreading. *Mol Cell Biol* 2002;22:2427-40.
- Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 1995;270:16995-9.
- Chodniewicz D, Klemke RL: Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692:63-76.
- Cobb BS, Schaller MD, Leu TH, Parsons JT: Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol Cell Biol* 19;14:147-55.
- Cooper LA, Shen TL, Guan JL. Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol* 2003;23:8030-41.
- Derkinderen P, Toutant M, Kadaré G, Ledent C, Parmentier M, Girault JA. Dual role of Fyn in the regulation of FAK+6,7 by cannabinoids in hippocampus. *J Biol Chem* 2001;276:38289-96.
- Dohmen RJ, Stappen R, McGrath JP, Forrova H, Kolarov J, Goffeau A, Varshavsky A. An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 1995;270:18099-109.
- Dunty JM, Gabarra-Niecko V, King ML, Ceccarelli DF, Eck MJ, Schaller MD. FERM domain interaction promotes FAK signaling. *Mol Cell Biol* 2004;24:5353-68.
- Dhanasekaran N, Premkumar Reddy E. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 1998;17:1447-55.

- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;340:245-6.
- Gao XD, Caviston JP, Tcheperegine SE, Bi E. Pxl1p, a paxillin-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, may coordinate Cdc42p and Rho1p functions during polarized growth. *Mol Biol Cell* 2004;15:3977-85.
- Granot-Attas S, Elson A. Protein tyrosine phosphatase epsilon activates Yes and Fyn in Neu-induced mammary tumor cells. *Exp Cell Res* 2004;294:236-43.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805-16.
- Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell* 1995;6:637-47.
- Holtzman DA, Yang S, Drubin DG. Synthetic-lethal interactions identify two novel genes: SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 1993;122:635-44.
- Hostetter MK, Tao NJ, Gale C, Herman DJ, McClellan M, Sharp RL, Kendrick KE. Antigenic and functional conservation of an integrin I-domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Med* 1995;55:122-30.
- Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Strelbow DN, Nelson JA, Ilic D, Huang S, Li E, Nemerow GR, Leng J, Spencer KS, Cheresch DA, Schlaepfer DD. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol* 2003;160:753-67.
- Huang C, Liu J, Haudenschild CC, Zhan X. The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:25770-6.

- Huang J, Hamasaki H, Nakamoto T, Honda H, Hirai H, Saito M, Takato T, Sakai R. Differential regulation of cell migration, actin stress fiber organization, and cell transformation by functional domains of Crk-associated substrate. *J Biol Chem* 2002;277:27265-72.
- Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R. Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *J Biol Chem* 2003;278:48367-76.
- Johnson FM, Gallick GE. SRC family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7:651-9.
- Johnsson N, Varshavsky A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10340-4.
- Kahana O, Micksche M, Witz IP, Yron I. The focal adhesion kinase (p125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma. *Oncogene* 2002;21:3969-77.
- Kaiser B, Munder T, Saluz HP, Kunkel W, Eck R. Identification of a gene encoding the pyruvate decarboxylase gene regulator CaPdc2p from *Candida albicans*. *Yeast* 1999;15:585-91.
- Klebe RJ, Harriss JV, Sharp ZD, Douglas MG. A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 1983;25:333-41.
- Li X, Regezi J, Ross FP, Blystone S, Ilic D, Leong SP, Ramos DM. Integrin alphavbeta3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 2001;114:2665-72.
- Lietha D, Cai X, Ceccarelli DF, Schaller MD, Eck MJ. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell*. 2007;129:1177-87.

- Mariotti A, Kedeshian PA, Dans M, Curatola AM, Gagnoux-Palacios L, Giancotti FG. EGF-R signalling through Fyn kinase disrupts the function of integrin $\alpha_6\beta_4$ at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J Cell Biol* 2001;155:447-58.
- Meierjohann S, Scharl M. From Mendelian to molecular genetics: the *Xiphophorus* melanoma model. *Trends Genet* 2006;22:654-61. **(2006a)**
- Meierjohann S, Wende E, Kraiss A, Wellbrock C, Scharl M. The oncogenic epidermal growth factor receptor variant *Xiphophorus* melanoma receptor kinase induces motility in melanocytes by modulation of focal adhesions. *Cancer Res* 2006;66:3145-52. **(2006b)**
- Messina S, Onofri F, Bongiorno-Borbone L, Giovedi S, Valtorta F, Girault JA, Benfenati F. Specific interactions of neuronal focal adhesion kinase isoforms with Src kinases and amphiphysin. *J Neurochem* 2003;84:253-65.
- Mitra SK, Schlaepfer DD: Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Oct;18(5):516-23.
- Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET, Cance WG. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res* 1995;55:2752-5.
- Qi J, Wang J, Romanyuk O, Siu CH. Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and beta-catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* 2006;17:1261-72.
- Pasco S, Monboisse JC, Kieffer N. The alpha 3(IV)185-206 peptide from noncollagenous domain 1 of type IV collagen interacts with a novel binding site on the beta 3 subunit of integrin $\alpha V\beta 3$ and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 2000;275:32999-3007.

- Reichel C, Johnsson N. The split-ubiquitin sensor: measuring interactions and conformational alterations of proteins *in vivo*. *Methods Enzymol* 2005;399:757-76.
- Roskoski R. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:1-14.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Parsons JT. Complex formation with focal adhesion kinase: a mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Mol Biol Cell* 1999;10:3489-505.
- Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 2001;20:6459-72.
- Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:435-78.
- Schlaepfer DD, Mitra SK. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:92-101.
- Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692:77-102.
- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000;2:249-56.
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, Neel BG, Birge RB, Fajardo JE, Chou MM, Hanafusa H, Schaffhausen B, Cantley LC. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993;72:767-78.

- Sorensen KD, Borre M, Orntoft TF, Dyrskjot L, Topping N. Chromosomal deletion, promoter hypermethylation and downregulation of FYN in prostate cancer. *Int J Cancer* 2008;122:509-19.
- Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:513-609.
- Thomas JW, Ellis B, Boerner RJ, Knight WB, White GC 2nd, Schaller MD. SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem* 1998;273:577-83.
- Wakamatsu Y. Establishment of a cell line from the platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res* 1981;41:679-80.
- Wellbrock C, Lammers R, Ullrich A, Scharl M. Association between the melanoma-inducing receptor tyrosine kinase Xmrk and SRC family tyrosine kinases in *Xiphophorus*. *Oncogene* 1995;10:2135-43.
- Wellbrock C, Fischer P, Scharl M. Receptor tyrosine kinase Xmrk mediates proliferation in *Xiphophorus* melanoma cells. *Int J Cancer* 1998;76:437-42.
- Wellbrock C, Scharl M. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a complex of p59fyn and the receptor tyrosine kinase Xmrk is involved in malignant transformation of pigment cells. *Eur J Biochem* 2000;267:3513-22.
- Wittke S, Lewke N, Müller S, Johnsson N. Probing the molecular environment of membrane proteins *in vivo*. *Mol Biol Cell* 1999;10:2519-30. **(1999a)**
- Wittke S, Dünwald M, Albertsen M, Johnsson N. Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 1999;13:2223-32 **(1999b)**

- Yang J, Price MA, Neudauer CL, Wilson C, Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson MA, McCarthy JB. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol* 2004;165:881-91.
- Yayon A, Ma YS, Safran M, Klagsbrun M, Halaban R. Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase-deficient FGF receptor 1: evidence for the involvement of Src-family kinases. *Oncogene* 1997;14:2999-3009.
- Zeng L, Si X, Yu WP, Le HT, Nq KP, Teng RM, Ryan K, Wang DZ, Ponniah S, Pallen CJ: PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol* 2003;160:137-46.

Figure legends

Fig. 1

Alignment of *Xiphophorus* FYN with mouse FYN. The following regions are highlighted: SH3 domain: gray (residues 87-140), SH2 domain: red (residues 148-246), kinase, catalytic domain: green (residues 271-516). Tyr 420 and 531 are marked in yellow.

Fig. 2

Scheme of full-length focal adhesion kinase (FAK) and truncated FAK constructs. Construct Δ 1-375 lacks the N-terminal part including the FERM domain and most of the SH3 binding domain. Δ 691-1052 lacks the C-terminus with the FAT domain. Δ 403-1052 lacks both the kinase domain and the C-terminus. Δ 1-375/Y397F and Δ 1-375/Y397E are similar to the Δ 1-375 truncation mutant, but contained the indicated mutation.

Fig. 3

A: Split-ubiquitin based yeast two-hybrid analysis of FAK – FYN interaction. Pairwise combinations of full-length FAK or FAK mutants fused to the N-terminus of ubiquitin on the one hand and *Xiphophorus* FYN (XFyn), mouse FYN (MFYN), or mouse SRC (MSRC) fused to the ubiquitin C-terminus and the reporter rURA3 on the other hand were co-expressed in yeast. STE14 and UBC6 served as controls. Growth of the yeast cells on selective medium containing 5-FOA indicates interaction of the respective proteins.

B: Classical yeast two-hybrid analysis of FAK – Fyn interaction. *Xiphophorus* or mouse FYN and mouse SRC were fused to the Gal4p activation domain (AD) and co-expressed with Gal4p binding domain (BD) fusions of Δ 1-375 and Δ 403-1052 in pairwise combinations in yeast. AD and BD alone served as negative controls. Yeast cells were grown on selective medium, transferred to filter paper and analyzed for β -galactosidase activity. Blue color of yeast cells indicates protein – protein interaction.

Fig. 4

Split-ubiquitin based analysis of the role of FAK Y397 in FAK – FYN interaction. Point mutations Y397F or Y397E were introduced into the Δ 1-375 construct. Yeast cells co-expressing the mutant FAK fusion protein and the MFYN fusion protein were grown on selective medium containing 5-FOA. STE14 and UBC6 served as controls. Growth of the yeast cells indicates protein – protein interaction.

Fig. 5

Co-immunoprecipitation of FAK and FYN in human melanoma cell lines. Cell lines A375, A375M, Bro and D10 were analyzed for FAK – FYN interaction as described in Materials and Methods.

Fig. 1

```
fyn_mouse<          MGCVQCKDKEAAKLTEERDGSLNQSSGYRYGTDPTPQHYPSPFGVTSIPNYNNFHAAGGQG 60
fyn_Xiphophorus<   MGCVQCKDKEATKLTDDRDAISQGAGYRYGADPTPQHYPSPFGVTAIPNYNNFHAPVGGG 60
                    *****:***::*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
fyn_mouse<          LTVFGGVNSSSHTGTLRTRGGTGVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFQILNSSEGDDW 120
fyn_Xiphophorus<   VTVFGGVNTSSHTGTLRTRGGTGVTLFVALYDYEARTEDDLSFRKGERFQILNSTEGDWW 120
                    :*****:*****:*****:*****:*****:*****
fyn_mouse<          EARSLLTGTETGYIPSNYVAPVDSIQAE EWYFGKLRKDAERQLLSFGNPRGTFLLIRESET 180
fyn_Xiphophorus<   DARSLLTGGSGYIPSNYVAPVDSIQAE DWYFGKLRKDAERQLLSFGNPRGTYLLIRESET 180
                    :***** :*****:*****:*****:*****:*****:*
fyn_mouse<          TKGAYSLSI RDWDDMKGDHVKHYKIRKLDNGGYYITTRAQFETLQQLVQHYSEARAAGLCC 240
fyn_Xiphophorus<   TKGAFSLSI RDWDEKGDHVKHYKIRKLDSDGGYYITTRAQFDTLQQLVQHYSDRAAGLCC 240
                    ***:***** *****:*****:*****:*****:*****
fyn_mouse<          RLVVPC HKGMPRLDLSVTKDVWEI PRES LQLIKRLGNGQFGEVWLGTVNGNTKVAIKT 300
fyn_Xiphophorus<   RLVVPC HKGMPRLADLSVTKDVWEI PRES LQLIKRLGNGQFGEVWMTWNGTKVAVKT 300
                    *****:*****:*****:*****:*****:*****
fyn_mouse<          LKPGTMSPEFLEEAIQIMKLRHDKLVQLYAVVSEEPYIVTEYMSKGSLLDFLKDGEGR 360
fyn_Xiphophorus<   LKPGTMSPEFLEEAIQIMKLRHDKLVQLYAVVSEEPYIVTEYMSKGSLLDFLKDGEGR 360
                    *****:*****:*****:*****:*****:*****
fyn_mouse<          ALKLPNLVDMAAQVAAGMAYIERMNYIHRDLRSANILVGNGLICKIADFLARLIEDNEY 420
fyn_Xiphophorus<   ALKLPNLVDMAAQVAAGMAYIERMNYIHRDLRSANILVGDNLVCKIADFLARLIEDNEY 420
                    *****:*****:*****:*****:*****
fyn_mouse<          TARQGAKFPIKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILLTELVTKGRVPYPGMNREVLEQVE 480
fyn_Xiphophorus<   TARQGAKFPIKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILLTELVTKGRVPYPGMNREVLEQVE 480
                    *****:*****:*****:*****:*****
fyn_mouse<          RGYRMPCPQDCPISLHELMIHCWKKDPEERPTFEYLG GFLEDYFTATEPQYQPGENL 537
fyn_Xiphophorus<   RGYRMPCPQDCPASLHELMLQCWKKDPEERPTFEYLG AFLEDYFTATEPQYQPGDNL 537
                    ***** *****:*****:*****:*****:*****
```


Fig. 2

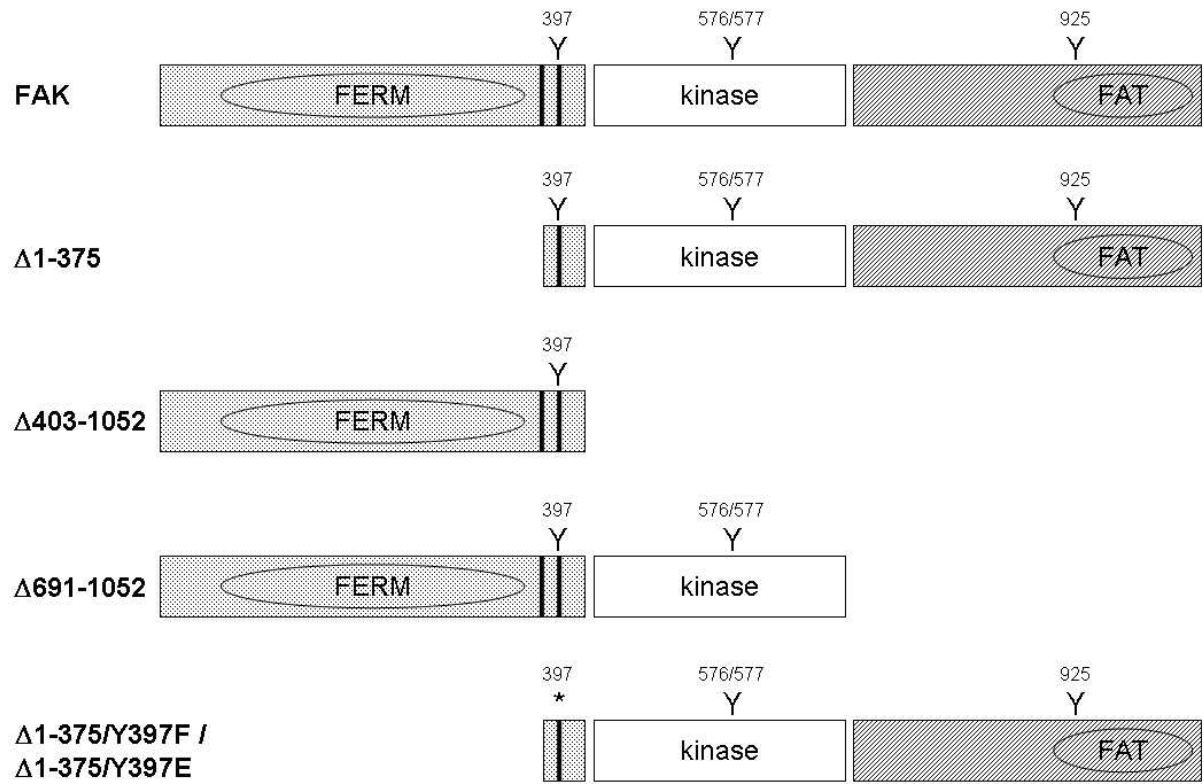


















Fig. 3

A

N_{UB} \ C_{UB}	XFyn	MFYN	MSRC	STE14
FAK			/	
$\Delta 1-375$			/	
$\Delta 403-1052$			/	
$\Delta 691-1052$			/	
UBC6				

B










AD \ BD	$\Delta 1-375$	$\Delta 403-1052$	/
XFyn	/		
MFYN	/		
MSRC	/		
/			

Fig. 4









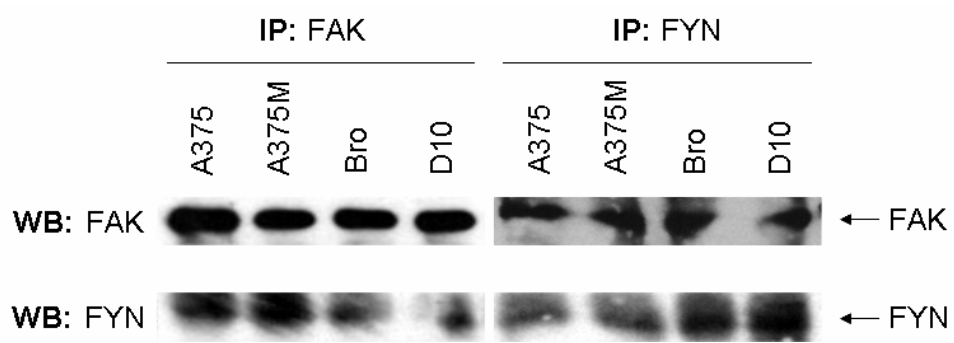
N_{UB} \ C_{UB}	MFYN	STE14
$\Delta 1-375$		
$\Delta 1-375/Y397F$		
$\Delta 1-375/Y397E$		
UBC6		

Fig. 5



Anhang C – Materialien und Methoden

Hier nicht aufgeführte Materialien sind den Originalpublikationen (Anhang B) zu entnehmen. Sämtliche Methoden wurden durchgeführt wie in den Originalpublikationen oder von Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

Escherichia coli-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	<i>F</i> , $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$, <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> - <i>m_K</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , U169	Invitrogen
Top10	<i>F</i> , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (<i>Str^R</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

Saccharomyces cerevisiae-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Herkunft
JD53	<i>MATα</i> <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ200 lys2-801 trp1 Δ63</i>	Dohmen <i>et al.</i> , 1995	N. Johnsson, Karlsruhe
Y190	<i>MATα</i> <i>ura3-52 leu2-3,-112 his3 Δ200 lys2-801 trp1-901 ade2-101 gal4Δ gal80Δ cyh² LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3 URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993	T. Munder, Jena

Verwendete Plasmide

Name	Kurzbeschreibung	Referenz	Herkunft
STE14-C _{UB} -rURA3	Konstruktion von <i>Ste14</i> zwischen <i>P_{Met25}</i> -Promotor und <i>C_{UB}-rUra3</i> -Modul im Vektor pRS315	Wittke <i>et al.</i> , 1999a	N. Johnsson, Karlsruhe
N _{UB} -UBC6 *	Konstruktion von <i>Ubc6</i> hinter die <i>P_{CUP1}-N_{UB}</i> -Kassette im Vektor pRS314	Wittke <i>et al.</i> , 1999b	N. Johnsson, Karlsruhe
pGBT9-MCS1	<i>GAL4</i> -BD, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i> , 2 μ ; 5.556bp; Leserahmen der <i>multiple cloning site</i> (MCS) modifiziert	Kaiser <i>et al.</i> , 1999	T. Munder, Jena
pGAD424-MCS1	<i>GAL4</i> -AD, <i>LEU2</i> , <i>amp^r</i> , 2 μ ; 6.691bp; Leserahmen der <i>multiple cloning site</i> (MCS) modifiziert	Kaiser <i>et al.</i> , 1999	T. Munder, Jena

* Bemerkung: N_{UB} = N_{Ui}

Plasmidkonstruktionen

Name	Kurzbeschreibung (Klonierungsstellen)
XFyn-C _{UB} -rUra3	STE14 in STE14-C _{UB} -rURA3 durch XFyn ersetzt (<i>Clal</i> – <i>Agel</i>)
MFYN-C _{UB} -rURA3	STE14 in STE14-C _{UB} -rURA3 durch MFYN ersetzt (<i>Clal</i> – <i>Agel</i>)
MSRC-C _{UB} -rURA3	STE14 in STE14-C _{UB} -rURA3 durch MSRC ersetzt (<i>Clal</i> – <i>Sall</i>)
MYES-C _{UB} -rURA3	STE14 in STE14-C _{UB} -rURA3 durch MYES ersetzt (<i>Clal</i> – <i>Agel</i>)
Xmrk-C _{UB} -rURA3	STE14 in STE14-C _{UB} -rURA3 durch Xmrk ersetzt (<i>Clal</i> – <i>Sall</i>)
Xmrk Δ 1-577-C _{UB} -rURA3	STE14 in STE14-C _{UB} -rURA3 durch Xmrk Δ 1-577 ersetzt (<i>Clal</i> – <i>Agel</i>)
HERmrk-C _{UB} -rURA3	STE14 in STE14-C _{UB} -rURA3 durch HERmrk ersetzt (<i>Clal</i> – <i>Agel</i>)
N _{UB} -FAK	UBC6 in N _{UB} -UBC6 durch FAK ersetzt (<i>Bam</i> HI – <i>Kpn</i> I)
N _{UB} - Δ 1-375	UBC6 in N _{UB} -UBC6 durch FAK Δ 1-375 ersetzt (<i>Bam</i> HI – <i>Kpn</i> I)
N _{UB} - Δ 403-1052	UBC6 in N _{UB} -UBC6 durch FAK Δ 403-1052 ersetzt (<i>Bam</i> HI – <i>Kpn</i> I)
N _{UB} - Δ 691-1052	UBC6 in N _{UB} -UBC6 durch FAK Δ 691-1052 ersetzt (<i>Bam</i> HI – <i>Kpn</i> I)
N _{UB} - Δ 1-375/y397f	Punktmutation Y397F in N _{UB} - Δ 1-375
N _{UB} - Δ 1-375/y397e	Punktmutation Y397F in N _{UB} - Δ 1-375
N _{UB} -XFyn	UBC6 in N _{UB} -UBC6 durch XFyn ersetzt (<i>Bam</i> HI – <i>Eco</i> RI)
BD- Δ 1-375	FAK Δ 1-375 in pGBT9-MCS1 (<i>Not</i> I – <i>Bam</i> HI)
BD- Δ 403-1052	FAK Δ 403-1052 in pGBT9-MCS1 (<i>Not</i> I – <i>Bam</i> HI)
BD-Xmrk	Xmrk in pGBT9-MCS1 (<i>Not</i> I – <i>Nco</i> I)
BD-Xmrk Δ 1-577	Xmrk Δ 1-577 in pGBT9-MCS1 (<i>Not</i> I – <i>Nco</i> I)
BD- XFyn	XFyn in pGBT9-MCS1 (<i>Eco</i> RI – <i>Bam</i> HI)
AD- XFyn	XFyn in pGAD424-MCS1 (<i>Eco</i> RI – <i>Bam</i> HI)
AD-MFYN	MFYN in pGAD424-MCS1 (<i>Eco</i> RI – <i>Nco</i> I)
AD-MSRC	MSRC in pGAD424-MCS1 (<i>Eco</i> RI – <i>Bam</i> HI)
AD- Δ 403-1052	FAK Δ 403-1052 in pGAD424-MCS1 (<i>Not</i> I – <i>Bam</i> HI)
AD-Xmrk	Xmrk in pGAD424-MCS1 (<i>Not</i> I – <i>Nco</i> I)
AD-Xmrk Δ 1-577	Xmrk Δ 1-577 in pGAD424-MCS1 (<i>Not</i> I – <i>Nco</i> I)

Synthetische Oligonukleotide für Klonierungen		
Name	Sequenz	Konstruktion
Ä1-375-5'-BamHI	5' <i>gcgc</i> ggatcc ctg ggt ctg ggt tgg cca aca gtg aaa agc aag gc	N _{UB} -Δ1-375 N _{UB} -Δ1-375/y397f N _{UB} -Δ1-375/y397e
äfrnk-3'-acc65i	5' <i>gcgc</i> ggtacc <i>tca</i> ccg ttc ttc ttg ctg cac ctt c	N _{UB} -Δ691-1052
äkin/frnk-3'-acc65i	5' <i>gcgc</i> ggtacc <i>tca</i> atc gat gat ctc agc ata gtc	N _{UB} -Δ403-1052
D1-375-5'-NotI	5' <i>aaggaaaaa</i> gcggccgc a <i>atg</i> ttg gcc aac agt gaa aag caa ggc	BD-Δ1-375
Dkin/frnk-3'-BamHI	5' <i>cg</i> ggatcc <i>tca</i> atc gat gat ctc agc ata gt	BD-Δ403-1052 AD-Δ403-1052
FAK3'-acc65i	5' <i>gcgc</i> ggtacc <i>tca</i> gtg tgg ccg tgt ctg ccc	N _{UB} -FAK N _{UB} -Δ1-375
FAK3'-BamHI	5' <i>cg</i> ggatcc <i>tca</i> gtg tgg ccg tgt ctg ccc tag	BD-Δ1-375
FAK5'-BAMHIneu	5' <i>gcgc</i> ggatcc ct gga tct gga gca gct gct tat ctt gac cca aac	N _{UB} -FAK N _{UB} -Δ403-1052 N _{UB} -Δ691-1052
FAK5'-NotI	5' <i>aaggaaaaa</i> gcggccgc a <i>atg</i> gca gct gct tat ctt gac cca	BD-Δ403-1052 AD-Δ403-1052
fyn3'-EcoRI	5' <i>gcgc</i> gaattc <i>tta</i> gag gtt atc ccc agg ctg gta	N _{UB} -XFyn
fyn5'-BamHI	5' <i>gcgc</i> ggatcc ct gga tct gga ggc tgt gtg caa tgc aag gat aag	N _{UB} -XFyn
HERmrk5'-Clal	5' <i>gcgc</i> atcgat <i>atg</i> cga ccc tcc ggg acg gc	HERmrk-C _{UB} -rURA3
Mfyn3'-Agel	5' <i>gcgc</i> accggt cag gtt ttc acc ggg ctg ata ctg	MFYN-C _{UB} -rURA3
Mfyn-3'-NcoI	5' <i>cg</i> ccatgg <i>tca</i> cag gtt ttc acc ggg ctg ata	AD-MFYN
Mfyn5'-Clal	5' <i>gcgc</i> atcgat <i>atg</i> ggc tgt gtg caa tgt aag gat	MFYN-C _{UB} -rURA3
Mfyn-5'-EcoRI	5' <i>gc</i> gaattc <i>atg</i> ggc tgt gtg caa tgt aag gat	AD-MFYN
Msrc-3'-BamHI	5' <i>cg</i> ggatcc <i>cta</i> tag gtt ctc ccc ggg ctg gta	AD-MSRC
Msrc-3'-Sall	5' <i>gc</i> gtcgac tag gtt ctc ccc ggg ctg gta ctg	MSRC-C _{UB} -rURA3
Msrc-5'-Clal	5' <i>gcgc</i> atcgat <i>atg</i> ggc agc aac aag agc aag ccc	MSRC-C _{UB} -rURA3
Msrc-5'-EcoRI	5' <i>gc</i> gaattc <i>atg</i> ggc agc aac aag agc aag ccc	AD-MSRC
Myes-3'-Agel	5' <i>gcgc</i> accggt taa att ttc tcc tg ttg gta ctg	MYES-C _{UB} -rURA3
Myes-5'-Clal	5' <i>gcgc</i> atcgat <i>atg</i> ggc tgc att aaa agt aaa gaa	MYES-C _{UB} -rURA3
v/y397f/3'	5' atcgat gat ctc tgc <i>aaa</i> gtc atc tgt ctc tga c	N _{UB} -Δ1-375/y397f
Xfyn3'-Agel	5' <i>gcgc</i> accggt gag gtt atc ccc agg ctg gta ctg	XFyn-C _{UB} -rURA3

Synthetische Oligonukleotide für Klonierungen (Fortsetzung)

Name	Sequenz	Konstruktion
Xfyn3'-BamHI	5' <i>gc</i> ggatcc <i>tta</i> gag gtt atc ccc agg ctg gta	BD-XFyn AD- XFyn
Xfyn5'-ClaI	5' <i>g</i> <i>cg</i> c atcgat <i>atg</i> ggc tgt gtg caa tgc aag gat	XFyn-C _{UB} -rURA3
Xfyn5'-EcoRI	5' <i>gc</i> gaattc <i>atg</i> ggc tgt gtg caa tgc aag gat	BD-XFyn AD-XFyn
xmrk 5'cla1	5' <i>g</i> <i>cg</i> c atcgat <i>atg</i> gag ttt ctg cgc gga gg	Xmrk-C _{UB} -rURA3
Xmrk3'-AgeI	5' <i>g</i> <i>cg</i> c accggt gcg gac agg agt gta cag tg	XmrkΔ1-577-C _{UB} - rURA3 HERmrk-C _{UB} -rURA3
Xmrk3'-NcoI	5' <i>cg</i> ccatgg <i>cta</i> gcg gac agg agt gta cat tgc	BD-Xmrk AD-Xmrk BD-XmrkΔ1-577 AD-XmrkΔ1-577
Xmrk3'-Sall-neu	5' <i>g</i> <i>cg</i> gtcgac <i>cc</i> gcg gac agg agt gta cag	Xmrk-C _{UB} -rURA3
Xmrk5'-NotI	5' <i>aagg</i> <i>aaaaaa</i> g <i>cg</i> gccgc <i>a</i> <i>atg</i> gag ttt ctg cgc gga gga gcg	BD-Xmrk AD-Xmrk
Xmrk-trunk5'-ClaI	5' <i>g</i> <i>cg</i> c atcgat <i>atg</i> aag agt gca cac ttt caa gat	XmrkΔ1-577-C _{UB} - rURA3
Xmrktrunk5'-NotI	5' <i>aagg</i> <i>aaaaaa</i> g <i>cg</i> gccgc <i>a</i> <i>atg</i> aag agt gca cac ttt caa gat	BD-XmrkΔ1-577 AD-XmrkΔ1-577
y397e-3'	5' atcgat gat ctc tgc ctc gtc atc tgt ctc tga c	N _{UB} -Δ1-375/y397e

Die fett gedruckten Buchstaben kennzeichnen die eingeführten Schnittstellen für Restriktionsenzyme; die kursiven Buchstaben markieren Basen, die eingefügt bzw. ausgetauscht wurden, um die Hybridisierungseigenschaften der Primer zu verbessern oder den Leserahmen einzuhalten. Grün sind Start- bzw. Stop-Kodons, rot Basenaustausche zur Einführung einer Mutation dargestellt.

Alle aufgeführten Primer wurden von der Firma biomers.net bezogen.

Synthetische Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Sequenz	sequenzierte Plasmide
cub1f	5' gct ttt cat cta cta ttt cc	alle Konstrukte im C _{UB} -Vektor
Cub2f	5' ata cag ggt cgt cag ata ca	alle Konstrukte im C _{UB} -Vektor
ferm1f	5' gga cat ggg tgt ctc cag tg	N _{UB} -FAK N _{UB} -Δ403-1052 N _{UB} -Δ691-1052
ferm1r	5' ctc cga tcg cag gtg act ga	N _{UB} -FAK N _{UB} -Δ403-1052 N _{UB} -Δ691-1052
nug1f	5' caa cgc aat atg gat tgt ca	alle Konstrukte im N _{UB} -Vektor
nug1r	5' tga tta cgc caa gct cgg aa	alle Konstrukte im N _{UB} -Vektor
Seq-ADf	5' cgc gtt tgg aat cac tac agg	alle AD-Konstrukte
Seq-ADr	5' aag gta gac acg tat cta cca	alle AD-Konstrukte
Seq-BDf	5' gcc tct aac att gag aca gca	alle BD-Konstrukte
Seq-BDr	5' aaa cct aag agt cac ttt aaa	alle BD-Konstrukte
xmrk1f	5' att tgg gac ggt cta caa gg	Xmrk-C _{UB} -rURA3 BD-Xmrk AD-Xmrk
xmrk1r	5' cat cct ctg agc act cgt tg	Xmrk-C _{UB} -rURA3 BD-Xmrk AD-Xmrk
xmrk2r	5' gga agg aga ggt cct ggt tc	Xmrk-C _{UB} -rURA3 XmrkΔ1-577-C _{UB} -rURA3 BD-Xmrk AD-Xmrk

Synthetische Oligonukleotide für quantitative real-time PCR

Name	Sequenz	Gen-Symbol (Organismus)	UnigenID
Actin_up	5' gct aca gct tta cca cca	<i>Aktin (Mus musculus)</i>	Mm.426706
Actin_down	5' aag gaa ggc tgg aag agt gc		
67f	5' ttc aag gaa caa ggg aat gc	<i>Dnajc7 (Mus musculus)</i>	Mm.258140
67r	5' cgg aca aaa ctg tca tcc aa		
535f	5' cca tct gct gtg ttc tgt gg	<i>Ube2i (Mus musculus)</i>	Mm.240044
535r	5' ggg gaa ctc tgc atc agg ta		
1645f	5' ctg ctg ggt cac aca ctg ag	<i>Emp1 (Mus musculus)</i>	Mm.182785
1645r	5' aaa ggc cac caa ata tgc ac		
3998f	5' gct ctc tgc att ttg cct tt	<i>Dag1 (Mus musculus)</i>	Mm.7524
3998r	5' gca aag caa ttt ccc ata cc		
4000f-2	5' gag acc gac aaa ttg gag ga	<i>Fosl1 (Mus musculus)</i>	Mm.6215
4000r-2	5' tgg aga aag gga gat gca ag		
4098f	5' aaa cac cat tat ggc caa cg	<i>Rnf11 (Mus musculus)</i>	Mm.172605
4098r	5' agg ggc agg atg agc ttt ac		
4797f	5' ttc agt gcc agt caa acc tg	<i>Sec22l1 (Mus musculus)</i>	Mm.2551
4797r	5' aag caa ggt gac aca cct aac a		
5616f	5' aag gga gag gca gga aag ac	<i>Egr1 (Mus musculus)</i>	Mm.181959
5616r	5' ttc agg cag ctg aag tca aa		
6729f	5' ggg cac gct act caa cct ta	<i>Sema6d (Mus musculus)</i>	Mm.330536
6729r	5' ctc cct gct aag cca act gt		
7676f	5' gca tgc ttg aga tgg cta ca	<i>Prkwnk1 (Mus musculus)</i>	Mm.333349
7676r	5' gga aaa agg cat ggt tca aa		
Opnlight_5'	5' tgc acc cag atc cta tag cc	<i>Opn (Mus musculus)</i>	Mm.288474
Opnlight3'	5' ctc cat cgt cat cat cat cg		
9983f	5' tgg aac tgg gaa gtt tgg ag	<i>Rest (Mus musculus)</i>	Mm.28840
9983r	5' ctg tga atc cgg atg tga tg		
9988f-2	5' caa cct gct cca gga aac at	<i>Igfbp3 (Mus musculus)</i>	Mm.380693
9988r-2	5' ttc tgg gtg tct gtg ctt tg		
10127f-2	5' tcc agg tct ttg tgg ctt tt	NA (<i>Mus musculus</i>)	Mm.125975
10127r-2	5' cag gga caa agg ctc ttc ag		

Synthetische Oligonukleotide für quantitative real-time PCR (Fortsetzung)

Name	Sequenz	Gen-Symbol (Organismus)	UnigenelD
10331f	5' cag cac ctc gag aga agg ac	<i>Cyr61 (Mus musculus)</i>	Mm.1231
10331r	5' ggt caa gtg gag aag ggt ga		
12871f-2	5' gcc aag aca aag gca cag tt	<i>2600011C06Rik (Mus musculus)</i>	Mm.46005
12871r-2	5' tgt gag ggg gca ttt agt tc		
13362f	5' tga aga tcc tgc cat tcc tc	<i>Dusp4 (Mus musculus)</i>	Mm.170276
13362r	5' gct tca gcc ctc agt ctc ac		
14518-f2	5' tga aga acc acc tcc aga cc	<i>Plagl1 (Mus musculus)</i>	Mm.287857
14518-r2	5' ttt tct tcc gcg tga gac tt		
15690f	5' aag ccc tgg aaa gga tgt tt	<i>Hba-a1 (Mus musculus)</i>	Mm.196110
15690r-2	5' gaa gtt gac ggg atc cac ac		
15911f	5' ccc tga cca ttg tgg ata cc	<i>Hspca (Mus musculus)</i>	Mm.1843
15911r	5' gac tcc cag gca tac tgc tc		
17068f-2	5' atc caa ggg cac tga tga ag	<i>Sos1 (Mus musculus)</i>	Mm.60975
17068r-2	5' ggt aac aag gga ggg ctt tc		
18754f	5' gcc gtt tcg tgt ggt att tt	<i>Taal6 (Mus musculus)</i>	Mm.856
18754r	5' ctt ctg cca aac cca gtg at		
18931f-2	5' tac ctc act cgc tcg gct at	<i>Pln (Mus musculus)</i>	Mm.34145
18931r-2	5' gat gca gat cag cag cag ac		
19044f	5' caa gca gag act tgc agc ac	<i>Wfdc1 (Mus musculus)</i>	Mm.87599
19044r	5' ctg cca cat tct tgg agt ca		
19290f	5' gga ttc agt tgc gaa agc at	<i>9030612M12Rik (Mus musculus)</i>	Mm.38813
19290r	5' tca ccg gtg tgg gtt att tt		
19344f	5' caa gag cac tga tgc ctg tc	<i>NA (Mus musculus)</i>	Mm.204306
19344r	5' tgg tct gca cat ctt tcc aa		
19354f-2	5' tcc cct ggt ctt ttc tcc tt	<i>5730557B15Rik (Mus musculus)</i>	Mm.102470
19354r-2	5' ctg gga gga gct gaa aag gt		
mStat5ae5fw	5' gta tcc gtc aca ttc tgt ac	<i>Stat5a (Mus musculus)</i>	Mm.277403
mStat5ae6rev	5' tca ggc tct cct ggt act gg		

Synthetische Oligonukleotide für quantitative real-time PCR (Fortsetzung)

Name	Sequenz	Gen-Symbol (Organismus)	UnigeneID
Mitf_Maus_up	5' gga aca gca acg agc taa gg	<i>Mitf (Mus musculus)</i>	Mm.333284
Mitf_Maus_down	5' tga tga tcc gat tca cca ga		
m-Tyr-f	5' att gat ttt gcc cat gaa gc	<i>Tyr (Mus musculus)</i>	Mm.238127
m-Tyr-r	5' aag gat gct ggg ctg agt aa		
DCT-Maus-up	5' agc aga cgg aac act gga ct	<i>Dct (Mus musculus)</i>	Mm.19987
DCT-Maus-down	5' gca tct gtg gaa ggg ttg tt		
m-Kit-f	5' atc ccg act ttg tca gat gg	<i>Kit (Mus musculus)</i>	Mm.247073
m-Kit-r	5' aag gcc aac cag gaa aag tt		
m-Slc45a2-f	5' gcc tgg gaa cag gat tca ta	<i>Slc45a2 (Mus musculus)</i>	Mm.138278
m-Slc45a2-r	5' tac cat gca ggt gag agc ag		
m-Tbx2-f	5' cga gcc aat gac atc ttg aa	<i>Tbx2 (Mus musculus)</i>	Mm.287052
m-Tbx2-r	5' cag cgt tag ctg ctt cct tt		
m-Sox10-f	5' gga cac tct gcc tgg atc tc	<i>Sox10 (Mus musculus)</i>	Mm.276739
m-Sox10-r	5' agt caa act ggg gtc gtg ag		
m-AP2-f	5' cca aga agt ggg ctc aga ag	<i>AP2 (Mus musculus)</i>	Mm.85544
m-AP2-r	5' tgg cat ctt caa ctg act gc		

Synthetische Oligonukleotide für quantitative real-time PCR (Fortsetzung)

Name	Sequenz	Gen-Symbol (Organismus)	UnigenelD
h-Actin-f	5' tct gtg gct tgg tga gtc tg	<i>ACTG1 (Homo sapiens)</i>	Hs.514581
h-Actin-r	5' agt aac agc cca cgg tgt tc		
h-535-f	5' cag gag agg aaa gca tgg ag	<i>UBE2I (Homo sapiens)</i>	Hs.302903
h-535-r	5' tcg ggt gaa ata atg gtg gt		
h-1645-f	5' cca atg tct ggt tgg ttt cc	<i>EMP1 (Homo sapiens)</i>	Hs.696241
h-1645-r	5' cat ggt gaa gag ctg gaa ca		
h-4000-f	5' agc tgc aga agc aga agg ag	<i>FOSL1 (Homo sapiens)</i>	Hs.283565
h-4000-r	5' gga gtt agg gag ggt gtg gt		
h-5616-f	5' tga ccg cag agt ctt ttc ct	<i>EGR1 (Homo sapiens)</i>	Hs.326035
h-5616-r	5' tgg gtt ggt cat gct cac ta		
h-9545-f	5' cat cac ctg tgc cat acc ag	<i>OPN (Homo sapiens)</i>	Hs.313
h-9545-r	5' gtc atg gct ttc gtt gga ct		
h-9983-f	5' gga tgt ggc tgg aaa gaa aa	<i>REST (Homo sapiens)</i>	Hs.631513
h-9983-r	5' gct gtc aac ttc cag ctt cc		
h-9988-f	5' gcg gga gac aga ata tgg tc	<i>IGFBP3 (Homo sapiens)</i>	Hs.450230
h-9988-r	5' agg ctg ccc ata ctt atc ca		
h-10331-f	5' caa ccc ttt aca agg cca ga	<i>CYR61 (Homo sapiens)</i>	Hs.8867
h-10331-r	5' tgg tct tgc tgc att tct tg		
h-13362-f	5' agg cgg cta tga gag gtt tt	<i>DUSP4 (Homo sapiens)</i>	Hs.417962
h-13363-r	5' cac tgc cga ggt aga gga ag		
h-17068-f	5' agc cct ttt cac tca agc aa	<i>SOS1 (Homo sapiens)</i>	Hs.654397
h-17068-r	5' ggg gac tgt cca aat gct ta		
h-18754-f	5' ctg tgg cca tga aaa ctg tg	<i>TAAL6 (Homo sapiens)</i>	Hs.696050
h-18754-r	5' cag aag gta ctg gcc ctc ag		

Marker		
--------	--	--

Name	Größenbereich	Firma
100 bp DNA Ladder	0,1 – 2 kb	Invitrogen
1 kb DNA Ladder	0,2 – 12 kb	Invitrogen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	11 – 250 kDa	Fermentas

Enzyme	
--------	--

Name	Firma
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
DNA-Polymerasen (Taq, Pfu)	Eigenherstellung durch AG Gessler, Physiologische Chemie I, Universität Würzburg
RNase A	Serva

Kits		
------	--	--

Name	Anwendung	Firma
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmente aus Agarosegelen	peqlab
E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit	Aufreinigung von DNA in Lösung	peqlab
Super Signal® West Pico	Western Blots	Pierce

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Janka Teutschbein
Geburtsdatum: 03.09.1979
Geburtsort: Leipzig
Nationalität: deutsch
Familienstand: nicht verheiratet, 1 Kind

Ausbildung & wissenschaftlicher Werdegang

seit 10/2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für
Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. – Hans-Knöll-
Institut, Jena

02/2004 – 09/2007 Promotionsstudium, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
„Identifizierung und Charakterisierung von Genen und
Proteinen in der Xmrk-induzierten Entwicklung von
Melanomen“

05/2004 – 09/2006 assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs „Molekulare und
strukturelle Grundlagen der Tumorinstabilität“ (GK 639)

09 – 11/2003 Praktikum in der Abteilung für Biochemie, Mikrobiologie &
Biotechnologie der Rhodes University, Grahamstown,
Südafrika

01/2004 Diplom (Gesamtnote 1,5), Friedrich-Schiller-Universität Jena

01/2003 – 01/2004 Diplomarbeit, Hans-Knöll-Institut, Jena
„Erstellung einer Interaktionskarte von Proteinen des Esat-6-
Exportsystems aus *Mycobacterium tuberculosis*“

10/1999 – 01/2004 Biochemie-Studium, Friedrich-Schiller-Universität Jena

08/1998 – 09/1999 Ausbildung zur Pharmakantin, Bayer AG, Leverkusen
(vorzeitig ohne Abschluss beendet)

07/1998 Abitur (Gesamtnote 1,0), Staatliches Gymnasium “Carl Zeiss”
mit math.-naturwiss.-techn. Spezialklassen, Jena

Publikationen

Teutschbein J, Scharl M, Meierjohann S. (2004) Interaction partners of the RTK Xmrk and their role in tumorigenesis. *Signal Transduction* 4:120 (Abstract).

Teutschbein J, Stuhlfelder C, Wende E, Scharl M, Meierjohann S. (2005) The oncogenic receptor Xmrk and its interactors – insights into mechanisms of melanomagenesis. *Onkologie* 28:57 (Abstract).

Teutschbein J, Schumann G, Möllmann U, Grabley S, Cole ST, Munder T. (2007) A protein linkage map of the ESAT-6 secretion system (ESX-1) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Res* (doi:10.1016/j.micres.2006.11.016).

Denker K, Meierjohann S, Schütz C, Teutschbein J, Scharl M, Sickmann A. Quantitative differential proteome analysis in an animal model for human melanoma. (eingereicht).

Teutschbein J, Samans B, Krause M, Eilers M, Scharl M, Meierjohann S. Gene expression analysis after receptor tyrosine kinase induction reveals novel melanoma proteins. (Manuskript B.1; eingereicht).

Teutschbein J, Scharl M, Meierjohann S. Interaction of *Xiphophorus* and murine FYN with Focal Adhesion Kinase (Manuskript B.2; zum Einreichen bereit).

Poster

Teutschbein J, Wende E, Wellbrock C, Scharl M, Meierjohann S. (2004) The role of the receptor tyrosine kinase Xmrk in tumorigenesis. International Symposium of the SFB487, Würzburg, 10.-12.06.2004.

Teutschbein J, Wende E. (2004) The role of the RTK Xmrk in tumorigenesis. 1st Graduate Day, Universität Würzburg, 20.07.2004.

Teutschbein J, Stuhlfelder C, Sickmann A, Wende E, Scharl M, Meierjohann S. (2004) Interaction partners of the RTK Xmrk and their role in tumorigenesis. 8th Joint Meeting of the Signal Transduction Society, Weimar, 04.-06.11.2004.

Teutschbein J, Stuhlfelder C, Wende E, Scharl M, Meierjohann S. (2005) The oncogenic receptor Xmrk and its interactors – insights into mechanisms of melanomagenesis. 13th International AEK/AIO Cancer Congress of the German Cancer Society, Universität Würzburg, 13.-16.03.2005.

Teutschbein J, Wende E, Reinders Y, Sickmann A, Kraiss A, Scharl M, Meierjohann S. (2005) *Xiphophorus* as animal model for melanomagenesis – The oncogenic EGF receptor Xmrk induces melanocyte motility. EMBO/FEBS advanced lecture course, Spetses, Griechenland, 15.-26.08.2005.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Februar 2004 bis März 2008 am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg angefertigt.

Sie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 487, Transregio 17, Graduiertenkolleg 639) finanziell gefördert.

Die Arbeit wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte:

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Manfred Scharl für die interessante Aufgabenstellung und die immerwährende Diskussionsbereitschaft danken. Mein Dank gilt außerdem Dr. Svenja Meierjohann, die mir stets als kompetente Betreuerin zur Seite stand.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich PD Dr. Thomas Munder. Er stellte darüber hinaus Bakterien- und Hefestämme, Y2H-Vektoren sowie v.a. seine langjährige Erfahrung als Y2H-Experte zur Verfügung.

Die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Eilers am IMT Marburg war eine wichtige Grundlage für die Durchführung der differentiellen Genexpressionsanalyse, wofür ich insbesondere Dr. Michael Krause, Birgit Samans und Sigrid Bischofsberger danke. Weiterhin gilt mein Dank Dr. Albert Sickmann, Dr. Katrin Denker und Florian Beck vom Rudolf-Virchow-Zentrum Würzburg für die Kooperation auf dem Gebiet der differentiellen Proteomanalyse.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Prof. Dr. Nils Johnsson, der die Vektoren und den Hefestamm für das Split-Ubiquitin-System bereitstellte, bei Dr. Steve Roffler für den TAAL6-Antikörper und bei Prof. Dr. Anja Bosserhoff für die humanen Melanomzelllinien.

Nicht versäumen möchte ich, mich bei den Mitgliedern des Instituts für Physiologische Chemie I zu bedanken, allen voran Anita Hufnagel und Claudia Leikam, die mir jederzeit Hilfe aller Art zuteil werden ließen und für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Meiner neuen Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Axel Brakhage und Dr. Olaf Kniemeyer danke ich für ihr Entgegenkommen, mir neben der Forschung an meinem neuen interessanten Projekt die Fertigstellung der Dissertation zu ermöglichen.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg aussprechen.

Meinem Freund Peter bin ich unendlich dankbar für seine Liebe und ausdauernde Motivation. Und nicht zuletzt hat unser kleiner Max während der letzten zwei Jahre mein Leben durch sein sonniges Gemüt bereichert.

Peter und Max – meiner kleinen Familie – ist diese Doktorarbeit gewidmet.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt. Die Zitate sind gekennzeichnet, alle Abbildungen enthalten nur die originalen Daten und sind in keinem Fall inhaltsverändernder Bildbearbeitung unterzogen worden. Es handelt sich bei der vorliegenden Dissertationsschrift um in Wort und Bild übereinstimmende Exemplare.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 12.03.2008

.....

Janka Teutschbein