

Aus dem Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologische Chemie I
Vorstand: Prof. Dr. Dr. M. Scharl

**Beeinflussung der Genexpression verschiedener Gene
durch Xmrk in Pigmentzelltumoren bei *Oryzias latipes***

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von

Anna Hokema
aus Schwäbisch Gmünd

Würzburg, April 2011

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Scharl

Koreferent: Prof. Dr. Dr. A. Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2012

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 KREBS	1
1.1.1 ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	1
1.1.2 MUTATIONEN	1
1.1.3 ONKOGENE	2
1.2 MALIGN ERKRANKUNGEN DER HAUT	4
1.2.1 HAUTKREBS	4
1.2.2 MELANOME	5
1.2.3 EINTEILUNG DER MELANOME	5
1.2.4 MALIGN PIGMENTZELLERKRANKUNGEN BEIM FISCH	9
1.3 DAS XIPHOPHORUS-XMRK-SYSTEM	10
1.3.1 ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	10
1.3.2 TYROSINKINASE XMRK	11
1.4 DAS MEDAKA-MODELL	13
1.5 ZIELSETZUNG	14
1.6 ÜBERSICHT DER UNTERSUCHTEN GENE	16
1.6.1 G6PC	16
1.6.2 GAMT	18
1.6.3 GM2A	18
1.6.4 MAPK3	19
1.6.5 NID1	22
1.6.6 PDIA4	23
1.6.7 RASL11B	24
1.6.8 SLC24A5	26
1.6.9 SPP1 (OPN)	27
1.6.11 ZFAND5	30
2. MATERIAL	32
2.1 VERWENDETE FISCHE	32
2.2 CHEMIKALIEN	37
2.3 PUFFERLÖSUNGEN	38
2.4 KITS	38
2.5 ENZYME	39
2.6 PRIMER	39
2.7 MARKER	40
2.8 GERÄTE	40
3. METHODEN	42
3.1 MICROARRAY-ANALYSE	42
3.2 PRÄPARATION DER FISCHE	42
3.3 RNA-EXTRAKTION	42

3.4 MESSEN DER RNA-KONZENTRATION	45
3.5 RT-PCR:	45
3.6 PRIMERDESIGN	47
3.7 PCR	47
3.8 GELELEKTROPHORESE	49
3.9 REAL-TIME-PCR	49
4. ERGEBNISSE	52
4.1 HISTOLOGIE	52
4.1 MICROARRAY-ANALYSE	53
4.2 REAL-TIME ANALYSEN	55
4.2.1 EXPRESSION VON G6PC	56
4.2.2 EXPRESSION VON GAMT	58
4.2.3 EXPRESSION VON GM2A	59
4.2.4 EXPRESSION VON MAPK3	61
4.2.5 EXPRESSION VON NID1 (1 OF 2)	63
4.2.6 EXPRESSION VON PDIA4	65
4.2.7 EXPRESSION VON RASL11B	66
2.4.8 EXPRESSION VON SLC24A5	68
2.4.9 EXPRESSION VON SPP1 (OPN)	69
2.4.10 EXPRESSION VON TACC2	71
4.2.11 EXPRESSION VON ZFAND5 (2 OF 2)	72
5. DISKUSSION	74
5.1 EXPRESSION VON G6PC	74
5.2 EXPRESSION VON GAMT	75
5.3 EXPRESSION VON GM2A	76
5.4 EXPRESSION VON MAPK3 (ERK1)	77
5.5 EXPRESSION VON NID1	78
5.6 EXPRESSION VON PDIA4	80
5.7 EXPRESSION VON RASL11B	80
5.8 EXPRESSION VON SLC24A5	81
5.9 EXPRESSION VON SPP1 (OPN)	83
5.10 EXPRESSION VON TACC2	84
5.11 EXPRESSION VON ZFAND5	85
5.12 FAZIT UND AUSBLICK	86
ZUSAMMENFASSUNG	88
SUMMARY	90
6. ANHANG	92
6.1 LITERATURVERZEICHNIS	92
6.2 ABKÜRZUNGEN	103
6.3 ERGEBNISSE DES MICROARRAYS	106
DANKSAGUNG	115
LEBENS LAUF	116

1. Einleitung

1.1 Krebs

1.1.1 Allgemeine Einführung

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Becker, Holzmeier, 2008). Die Ursachen für Krebserkrankungen sind Mutationen im Erbgut, durch welche der Verlust von kontrolliertem Zellwachstum und eine Dysregulation der Apoptose resultieren.

Findet eine Mutation im Genom einer Körperzelle statt, bleibt dies meist ohne Konsequenz, da die betroffene Zelle zugrunde geht, es sei denn, die Veränderung der DNA findet in einem Gen statt, welches die zelluläre Proliferation reguliert. In diesem Fall verlassen diese Zellen häufig das Gewebe, dringen in die Umgebung ein und verursachen nicht selten Krebserkrankungen. Dies ist im Prinzip bei Mensch, Tier und Pflanze derselbe Mechanismus.

Krebs stellt ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen dar. Dabei können diese ihr Ursprungsgewebe auch verlassen und sich in anderen Regionen ansiedeln und dort Metastasen ausbilden, was eine typische Situation bei malignem Wachstum beschreibt.

1.1.2 Mutationen

Die Fähigkeit zu unreguliertem Wachstum bildet eine Zelle selten nach nur einer Mutation aus. Meist sind mehrere Mutationen nötig, da bei der Erstmutation eines Gens, welches die Zellteilung reguliert, sich die betroffene Zelle öfters teilt, damit aber auch die Wahrscheinlichkeit für weitere Mutationen steigt und somit Zweit-, Dritt- und Viertmutationen usw. erst zum Beispiel zum Ausfall von DNA-Reparaturen und unreguliertem Wachstum führen.

Die Zelle besitzt in ihrer Teilungsphase verschiedene Kontrollpunkte als Schutzmechanismen vor Mutationen. So kann die Zelle nur dann von der G1-Phase der Interphase in die S-Phase übergehen, wenn die DNA unbeschadet vorliegt (sprich keine Fehlpaarungen, Doppelstrangbrüche, Beulen, Dellen, etc.). Um die S-Phase abzuschließen, müssen alle Chromosomen vollständig repliziert sein. Ist die DNA unversehrt, beginnt die Prophase der Mitose. Anschließend muss der Spindelapparat ordentlich ausgebildet sein, um die Mitose zu beschließen.

1.1.3 Onkogene

Es gibt in der Krebsentstehung zwei Klassen von Genen von immenser Bedeutung: die Proto-Onkogene, welche das Wachstum einer Zelle regulieren und die Tumor-Suppressorgene, welche das Wachstum einer Zelle bremsen. Eine Mutation, welche Krebs verursacht, führt nun dazu, dass entweder aus dem Proto-Onkogen ein Onkogen entsteht und damit die Kontrollpunkte der Zellteilung umgangen werden oder aber das Tumor-Suppressorgen wird inaktiviert, womit das Wachstum nicht mehr kontrolliert werden kann.

Der Mensch besitzt ca. 70 Proto-Onkogene, welche eine regulatorische Funktion auf den normalen Zellzyklus ausüben (Tara Rodden Robinson, 2006). Erst bei einer Mutation wird aus dem Gen ein Onkogen, welches das Gleichgewicht ins Wanken bringt.

Die Mutation von Onkogenen führt in den meisten Fällen nicht zu einer veränderten Funktion, sondern zu einer Funktionssteigerung. Alle Onkogene haben gemeinsam, dass sie das Wachstum einer Zelle fördern, indem sie beispielsweise die Aktivität oder Expression einzelner Proteine der Signalübertragungskette der Zelle steigern. In der Regel sind diese Mutationen dominant, d.h. ein mutiertes Gen reicht aus, um die Signalübertragungskette zu aktivieren.

Loss-of-function-Mutationen in Tumor-Suppressorgenen führen zu unkontrollierter Zellteilung. Dabei sind diese Mutationen häufig rezessiv, d.h. die Funktion des defekten Gens wird von dem gesunden Allel übernommen. Eines der wichtigsten und bekanntesten Tumor-Suppressorgene ist P53, welches für das Protein p53 kodiert. Die wichtigsten Funktionen dieses Genes sind die Regelung der Apoptose und des Zellzyklus, da es die Aktivität einer Anzahl von Genen bremst. Eine Mutation des P53 und ein damit verbundener Funktionsverlust spielt bei vielen Krebserkrankungen eine immens wichtige Rolle und ist gerade in entarteten Zellen in erhöhter Menge zu finden (Kastan et al. 1995).

Bei verschiedenen Tumoren sind in der Regel immer bestimmte Onkogene beteiligt, wobei hierbei auch immer Abweichungen bestehen. Jeder Tumor entwickelt sich entlang seines eigenen evolutionären Weges, wobei allerdings bestimmte Mutationen in einer gewissen Häufigkeit auftreten.

Typische Merkmale von Krebszellen in fortgeschrittenem Stadium sind zum Beispiel eine veränderte Chromosomenstruktur, Deletionen, Inversionen und Translokationen, sowie die Abwesenheit von Checkpoint-Kontrollen bei der Zellteilung, beispielsweise der Ausfall des p53-Proteins.

Bei einigen Krebsarten treten nach der Schädigung der DNA häufig Chromosomenschäden auf, da die DNA instabil und sehr anfällig für Brüche ist. Da die Kontrollmechanismen in Krebszellen durch defekte Tumor-Suppressorgene und Onkogene außer Kraft sind, teilen sich die Zellen weiter. Hierbei können Monosomien durch den Verlust eines Chromosoms oder Trisomien durch unvollständige Teilung der Chromosomen entstehen.

Der Pathologe beurteilt einen Tumor aufgrund der Histologie. Allerdings können sich die molekularen Befunde auch im selben Tumor erheblich unterscheiden, da jeder Tumor seine eigene Evolution hinter sich hat. Daher bemüht sich die Molekularbiologie um eine neuartige Klassifizierung von Tumoren, in welcher die Expression verschiedener Onkogene eruiert wird.

Viele Krebsarten sind gewebespezifisch, d.h. sie kommen nur an bestimmten Körperstellen vor. Ebenso wird zwischen hereditären und nicht-hereditären Erkrankungen unterschieden. Allerdings muss man beachten, dass bei den hereditären Krebserkrankungen nicht die Krebserkrankung an sich vererbt wird, sondern die Anfälligkeit gegenüber gewissen Krebserkrankungen, da die mitverantwortlichen Mutationen vererbt werden. Bei hereditärem Krebs spielen Onkogene in der Regel keine Rolle.

1.2 Maligne Erkrankungen der Haut

1.2.1 Hautkrebs

Hautkrebs gehört zu den drei häufigsten vermeidbaren Krebsarten (Beckmann, 2010). Vermeidbare Krebsarten entstehen unter anderem durch Risikofaktoren, wie Nikotingenuss und Strahlung. Beim Menschen werden allein in Deutschland jährlich ca. 22.000 Fälle von malignen Melanomen diagnostiziert. Es wird zwar vermutet, dass die Anfälligkeit für Hautkrebs vererbt wird, aber Strahlung, vor allem das UV-Licht der Sonne den Risikofaktor Nummer 1 darstellt. Dabei sind Menschen mit heller Haut, hellen Augen und rötlichem Haar besonders gefährdet (Williams, 2010). Nach einem Sonnenbrand ist die Gefahr der Entartung besonders hoch, da durch die Energie des UV-Lichts zwar eine große Zahl der Hautzellen untergeht, jedoch in überlebenden Zellen beschädigte DNA beim Reparaturprozess übersehen werden kann, woraus gefährliche Mutationen resultieren können. Diese können dadurch entstehen, dass durch die Strahlung Brüche entstehen oder benachbarte Basen in der DNA miteinander verkleben und Dimere bilden. Dabei ist das Entartungsrisiko nach Sonnenbränden im Kindesalter besonders hoch (Merlino et al. 2011)

Ultraviolettes Licht wird in UV-A, UV-B und UV-C-Strahlung, entsprechend ihrer Wellenlänge unterteilt. UV-A-Strahlung hat einen besonders schädigenden Effekt, da sie bis zur Lederhaut vordringt und dort die Bildung freier Radikale

erzeugen kann.

Hautkrebs wird grob in zwei Gruppen unterteilt: der „weiße Hautkrebs“ mit den zwei prominentesten Vertretern Basaliom und Plattenepithelkarzinom, und dem „schwarzen Hautkrebs“, zu welchem das maligne Melanom zuzuordnen ist.

1.2.2 Melanome

Melanome entstehen in Melanozyten, also Pigmentzellen, welche für die Farbe der Haut verantwortlich sind. Die Zellgröße ist variabel, insgesamt aber sehr groß mit einer kreisrunden bis plumbovalen Zellform. Die Zellen liegen jeweils dissoziiert voneinander vor. Zytoplasma ist reichlich vorhanden, grau tingiert und beinhaltet evtl. Pigmentgranula. Die Mitosen sind individuell häufig und oft atypisch. Das Kernchromatin ist feingranulär und Nukleolen sind, falls vorhanden, deutlich vergrößert.

Melanome werden mit Hilfe der ABCDE-Regel diagnostiziert. Dabei steht A für Asymmetrie, B für Begrenzung, C für Kolorierung, D für Durchmesser und E für Erhabenheit. Hiermit lassen sich maligne Melanome und dysplastische Nävi von unauffälligen Nävi, also gewöhnlichen „Muttermalen“, unterscheiden. Mit steigender Anzahl an Nävi steigt das Risiko, ein malignes Melanom zu entwickeln. Beim Syndrom dysplastischer Nävi oder auch FAMMM-Syndrom liegt die Wahrscheinlichkeit maligne Melanome zu entwickeln bei nahezu 100%. Auch Patienten mit Melanompaten in der Familienanamnese haben ein erhöhtes Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken.

1.2.3 Einteilung der Melanome

Maligne Melanome werden anhand der TNM-Klassifikation (UICC 1997) in die Stadien I-IV eingeteilt:

Tabelle 1: TNM-Klassifizierung (UICC 1992) des Melanoms (Hermanek P, Sobin LH 1992), Beurteilung des Primärtumors, pT-Kategorie

pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Primärtumor
pTis	Melanoma in situ (Clark-Level I)
pT1	Tumordicke $\leq 0,75$ mm und Clark-Level II
pT2	Tumordicke 0,76 - 1,5 mm und/oder Clark-Level III
pT3a	Tumordicke 1,51 - 3,0 mm und/oder Clark-Level IV
pT3b	Tumordicke 3,01 - 4,0 mm und/oder Clark-Level IV
pT4a	Tumordicke $> 4,0$ mm und/oder Clark-Level V
pT4b	Satelliten innerhalb von 2 cm vom Primärtumor

Bei Diskrepanzen zwischen Tumordicke und Clark-Level richtet sich die pT-Kategorie nach dem jeweils ungünstigsten Befund.

Dabei werden die Clark-Level wie folgt eingeteilt:

- Clark-Level I: Alle Tumorzellen befinden sich oberhalb der Basalmembran (entspricht einem *carcinoma in situ*)
- Clark-Level II: Überschreitung der Basalmembran, Invasion in die Papillenschicht (*Stratum papillare*) der Dermis.
- Clark-Level III: Invasion bis an die Grenze zur Netzsicht (*Stratum reticulare*) der Dermis.
- Clark-Level IV: Invasion in die Netzsicht
- Clark-Level V: Invasion in die Subkutis

Tabelle 2: TNM-Klassifizierung (UICC 1992) des Melanoms (Hermanek P, Sobin LH 1992), Beurteilung regionärer Lymphknoten, N-Kategorie

N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung in irgendeinem regionären Lymphknoten
N2	Metastase(n) mehr als 3 cm in größter Ausdehnung in irgendeinem regionären Lymphknoten und/oder In-transit-Metastasen*
N2a	Metastase(n) mehr als 3 cm in größter Ausdehnung
N2b	In-transit-Metastase(n)
N2c	Metastase(n) mehr als 3 cm in größter Ausdehnung und In-transit-Metastase(n)

In-transit-Metastasen sind Metastasen der Haut oder Subkutis, die mehr als 2 cm vom Primärtumor entfernt, aber nicht jenseits der regionären Lymphknoten liegen.

Tabelle 3: TNM-Klassifizierung (UICC 1992) des Melanoms (Hermanek P, Sobin LH 1992), Beurteilung möglicher Fernmetastasen, M-Kategorie

M	Fernmetastasen
MX	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Befall von Haut, Subkutis oder Lymphknoten jenseits der regionären LK
M1b	Viszerale Metastasen

Letzten Endes werden die Tumore nach ihrer TNM-Klassifikation in Stadien eingeteilt:

Tabelle 4: Stadieneinteilung (UICC 1992) des Melanoms (Hermanek P, Sobin LH 1992)

Stadium I	pT1, pT2	N0	M0
Stadium II	pT3	N0	M0
Stadium III	pT4 jedes p	N0 N1, N2	M0 M0
Stadium IV	jedes pT	jedes N	M1

Je nach Wachstumsverhalten, Lokalisation und Entwicklungsverlauf unterscheidet man beim malignen Melanom in Lentigo-maligna-Melanom, superfiziell-spreitendes Melanom, noduläres Melanom und akrolentiginöses Melanom. Des Weiteren gibt es noch Sonderformen des malignen Melanoms wie Schleimhautmelanome, desmoplastische Melanome, Melanome auf großem kongenitalen Nävi, maligner blaue Nävi, amelanotische maligne Melanome oder Metastasen eines malignen Melanoms.

Das Lentigo-Maligna-Melanom tritt vorwiegend an sonnenexprimierten Flächen, wie Händen und Gesicht auf. Der Erkrankungsdurchschnitt liegt bei 68 Jahren (Hengge/Dummer, 2006). Es wächst langsam horizontal und erst nach Jahren vertikal und hat daher eine eher günstige Prognose. Charakteristisch ist vor allem seine große und oft leicht erhabende Form, häufig mit unregelmäßigen Flecken.

Das superfiziell spreitende Melanom stellt die häufigste Form des malignen Melanoms dar. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 51 Jahren (Hengge/Dummer, 2006). In den ersten vier Jahren wächst es hauptsächlich horizontal. In späteren Phasen auch vertikal. Es ist hauptsächlich durch unscharfe Begrenzung und unregelmäßige Pigmentierung charakterisiert. Vertikales Wachstum zeichnet sich meist durch Erhabenheit aus. Bei Frauen findet sich das superfiziell spreitende Melanom meist am Unterschenkel, beim Mann hingegen am Rücken.

Das noduläre Melanom besitzt die schlechteste Prognose, da es relativ schnell vertikal wächst und frühzeitig lymphogen und hämatogen metastasiert. Das

mittlere Erkrankungsalter liegt bei 56 Jahren (Hengge/Dummer, 2006). Typisch ist eine tiefschwarze Farbe. Die Oberfläche ist glatt oder auch ulzeriert und blutet leicht. Gehäuft ist es an Brust, Rücken und Extremitäten zu finden. Eine Unterform des nodulären Melanoms ist das amelanotische Melanom. Bei diesem haben die Pigmentzellen ihre Fähigkeit Melanin zu produzieren verloren, wodurch das Melanom von seiner Erscheinung her sehr untypisch auftreten kann. Daher werden diese häufig erst spät diagnostiziert, wenn bereits Metastasen vorliegen.

Das akrolentiginöse Melanom ähnelt von der Erscheinung her sehr dem Lentigo-maligna-Melanom. Allerdings wächst es deutlich schneller und aggressiver und ist von der Prognose her eher ungünstig. Lokalisiert ist es typischerweise an Handinnenflächen, Fußsohlen oder auch unter Nägeln. Typischerweise neigt es zu Ulcerationen. Dieser Melanomtyp tritt vorwiegend bei dunkelhäutigen Personen auf und stellt auf dem afrikanischen Kontinent 30-70% aller Melanome dar (Hein, Gauger, Ring, 2001).

Das Tiefenwachstum eines Melanoms ist also absolut entscheidend für die Prognose.

1.2.4 Maligne Pigmentzellerkrankungen beim Fisch

Beim Fisch unterscheidet man verschiedene Chromatophoren: die Melanophoren, die Lipophoren und die Guanophoren. Die Lipophoren werden weiter in Xantophoren und Erythrophoren unterteilt, welche als Pigmente Pterine, bzw. Pterine und Carotinoide produzieren. Diese sind für eine gelbe, bzw. orange-rote Pigmentierung verantwortlich. Bei den Guanophoren wird weiter in Iridophoren und Leukophoren unterschieden, welche für die Strukturfarbe und reflektierende Eigenschaften verantwortlich sind.

Zusätzlich werden bei Fischen die Melanozyten in Mikromelanophoren und Makromelanophoren unterteilt. Mikromelanophoren sind gleichmäßig in der Haut der Fische verteilt und sind für eine einheitlich graue Farbe zuständig,

während Makromelanophore nur stellenweise auftreten und die verschiedenen Pigmentmuster der Fische bilden.

Von all diesen Pigmentzellen können Tumore ausgehen, wie beispielsweise das Erythrophorom von den Erythrophoren. In dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener Gene in Tumoren der Melanophoren, Xanthophoren und Erythrophoren untersucht.

1.3 Das Xiphophorus-Xmrk-System

1.3.1 Allgemeine Einführung

Fische der Gattung *Xiphophorus* gehören zur Familie der lebendgebärenden Zahnkarpfen. Dies ist eine äußerst vielfältige Gattung mit zahlreichen Arten. In diesem Beispiel wurden *Xiphophorus maculatus*, auch Platy, und *Xiphophorus hellerii*, auch Schwerträger, miteinander gekreuzt (Abb. 1). Die entstandene F1-Generation zeichnet sich durch etwas größere Fische mit größeren Pigmentflecken aus. Anschließend wurde ein Weibchen der F1-Generation mit einem *Xiphophorus hellerii*-Männchen wieder rückgekreuzt. Bei der nun entstandenen BC1-Generation entstehen nach den Mendelschen Gesetzen 50% der Fische ohne Pigmentflecken, 25% sind identisch mit der F1-Generation und 25% entwickeln maligne Melanome (Meierjohann, Scharl, 2006).

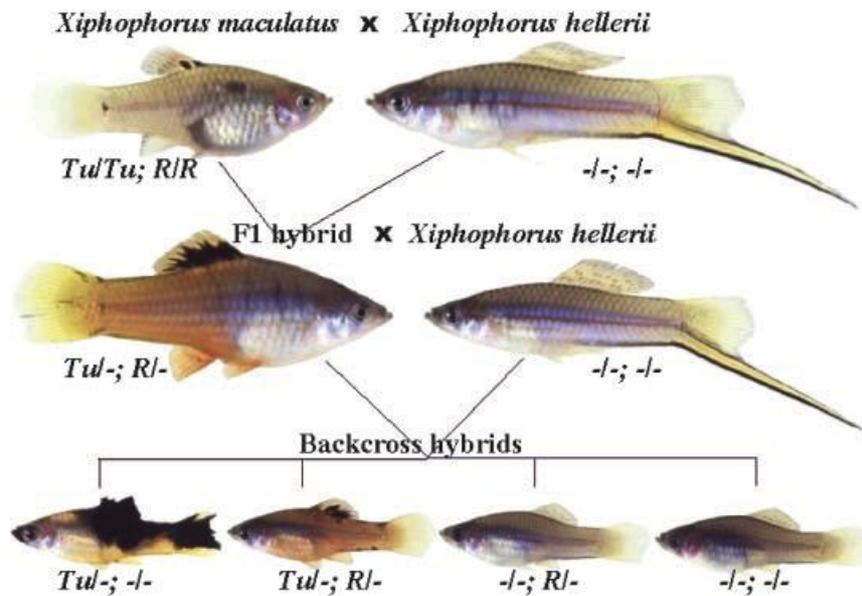


Abb.1: Kreuzungsschema, welches zur Bildung von Melanomen im Fisch *Xiphophorus* führt

Dies fundiert auf der Grundlage, dass der *Xiphophorus maculatus* Träger eines Onkogenes und eines dazugehörigen Tumorsuppressorgens ist. Dagegen besitzt der *Xiphophorus hellerii* allerdings weder das Onkogen noch das zugehörige Tumorsuppressorgen.

Als Onkogen wurde das Gen *Xmrk* identifiziert. Bei dem Suppressorgen wird vermutet, dass es sich um das Gen *CDKN2a* handeln könnte (Schartl et al. 2008).

1.3.2 Tyrosinkinase *Xmrk*

Xmrk kodiert für eine Tyrosinkinase. Tyrosinkinasen stammen aus der Familie der Proteinkinasen. Sie sind an der Übertragung von Phosphatgruppen auf Proteine beteiligt, wodurch die Aktivität des Zielproteins und damit auch die Signalübertragung erheblich beeinflusst werden. Sie werden in membrangebundene und nicht-membrangebundene Tyrosinkinasen unterteilt. Bei den membrangebundenen Kinasen wird noch einmal unterteilt in Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität und Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinaseaktivität.

Bei dem Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität stellt die Kinase einen Teil des Rezeptors dar. Bindet ein passender Ligand an den Rezeptor, kommt es zur Konformationsänderung und es entstehen Homo- oder Heterodimere, wodurch Tyrosinreste an der cytosolischen Rezeptorseite phosphoryliert werden. An diesen Resten binden wiederum Proteine mit einer SH2-Domäne, was dazu führt, dass intrazelluläre Signalwege aktiviert werden. Die aktivierten Proteine besitzen entweder selbst eine enzymatische Aktivität oder können weitere Proteine phosphorylieren, was zu einer Verstärkung des Signals führt.

Bei Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinaseaktivität kommt es nach Ligandenbindung ebenfalls zur Dimerisierung, wodurch sich rezeptorassoziierte Januskinasen einander annähern und sich gegenseitig phosphorylieren. Dadurch werden wiederum Proteine des Rezeptors phosphoryliert, an welche Transkriptionsfaktoren mit SH2-Domänen binden können. Diese werden ebenfalls phosphoryliert und zeigen dadurch eine höhere DNA-Affinität.

Rezeptortyrosinkinasen sind unter anderem am Zellwachstum beteiligt. Man unterscheidet je nach der extrazellulären Domäne drei verschiedene Rezeptortypen:

-EGF-Rezeptor-Typ mit cystinreicher, einkettiger Domäne

-Insulinrezeptor-Typ mit je zwei α - und β -Ketten, welche durch Disulfidbrücken verknüpft sind

-NGF-Rezeptor-Typ mit antikörperähnlicher extrazellulärer Domäne

Ligand für den EGF-Rezeptor-Typ ist der epidermal Growth Factor (EGF), ein Polypeptid.

Bei den EGF-Rezeptoren ist eine Unterfamilie mit vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen bekannt: EGFR1/HER1 (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4). Hierbei handelt es sich um Rezeptor-Tyrosinkinasen mit intrinsischer Aktivität, welche beim Menschen in fast allen Zelltypen vorkommen. Letztendlich wird nach Ligandenbindung das Zellwachstum stimuliert und die Apoptose verhindert.

Da bei Fischen vor Millionen von Jahren evolutionsbiologisch Genduplikationen stattgefunden haben, besitzen diese häufig eine zweite Kopie ihrer Gene. So kodieren für den EGF-Rezeptor zwei unterschiedliche Gene: Egfra und Egfrb (Laisney et al. 2010). Dabei ist Egfrb das Proto-Onkogen von Xmrk, welches als ein potentes Onkogen identifiziert wurde (M. Scharl, 2008). Es scheint, als ob Xmrk gegenüber dem Egfrb eine neue Funktion übernommen hat. Während Egfrb in allen Zellen niedrig exprimiert ist, ist Xmrk in Melanomen überexprimiert, wobei der Grad an Überexpression mit dem Malignitätsgrad korreliert.

Xmrk hat eine Größe von 160kDa. Während der EGF-Rezeptor erst nach Ligandenbindung aktiviert wird, liegt der Xmrk-Rezeptor in konstitutiv aktiver Form vor, was zu einer dauerhaften Phosphorylierung von carboxyterminalen Tyrosinresten führt. Dies kommt daher, dass bei Xmrk zwölf Aminosäuren ausgetauscht wurden. Dabei scheinen vor allem zwei Aminosäuren einen besonderen Einfluss zu haben, da diese statt intermolekulare intramolekulare Disulfidbrücken zwischen zwei Xmrk-Proteinen bilden, was zur Dimerbildung und damit zur konstitutiven Aktivierung von Xmrk führt.

An den phosphorylierten Tyrosinresten des Xmrk werden Substrate phosphoryliert, was im Folgenden zur Signaltransduktion in der Zelle führt. Substrate für Xmrk sind unter anderem Phospholipase C γ , die Adapterproteine Shc und Grb2, Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), Fyn-Kinase aus der Familie der Src-Kinasen und der Transkriptionsfaktor STAT5.

1.4 Das Medaka-Modell

Medakas (*Oryzias latipes*) gehören zur Familie der Reifische (Adrianichthyidae), welche in Süß- und Brackwasser in Gebieten von Indien bis Indonesien, nördlich von Japan, heimisch sind. Die kleinen Fische sind für ihre robuste Art bekannt und lassen sich leicht transportieren.

In der Forschung stellen Medakas, nicht zuletzt auf Grund ihres relativ kleinen Genoms, einen sehr gut erforschten Modell-Organismus dar. Aufgrund ihrer

Eigenschaft als Ovipare sind transgene Medakas relativ einfach zu produzieren. Hinzu kommt, dass bereits das gesamte Genom sequenziert wurde. Aufgrund dieser Tatsachen wurden für diese Arbeit Medakas als Modell-Organismus ausgewählt.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Medakas im Einzell-Stadium ein Xmrk-Konstrukt, mit mitf-Promotor, injiziert. Somit entstanden transgene Medakas welche Xmrk als Onkogen unter Kontrolle des pigmentzell-spezifischen mitf-Promotors exprimieren, aber ohne ein passendes Tumorsuppressorgen. Obwohl Medakas gewöhnlich nicht anfällig für Krebserkrankungen sind, entwickelten diese Fische daraufhin verschiedene pigmentierte Hauttumore, wie invasive Melanome und Erythrophorome, im Gegensatz zu den Xiphophori mit selber Genkonstellation, welche ausschließlich Melanome entwickelte (Schartl et al. 2008). Dies unterstreicht noch einmal, dass es sich bei Xmrk um ein hochpotentes Onkogen handelt, da Xmrk alleine in der Lage ist hoch-maligne Tumore zu erzeugen, während es sich bei der Krebsentstehung für gewöhnlich um einen Prozess aus mehreren Mutationen handelt.

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es mehr über die veränderte Genexpression verschiedener Gene in Pigmentzelltumoren transgener Medakas zu erfahren und in wie weit diese von Xmrk abhängig ist.

Einen Ansatz hierfür liefert ein DNA-Microarray, welcher in Kooperation mit dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Universität Marburg, erstellt wurde. Ziel eines Microarrays ist es, mögliche Änderungen in der Expression verschiedener Gene beispielsweise in erkranktem Gewebe gegenüber gesundem Gewebe zu eruieren (Abb. 2).

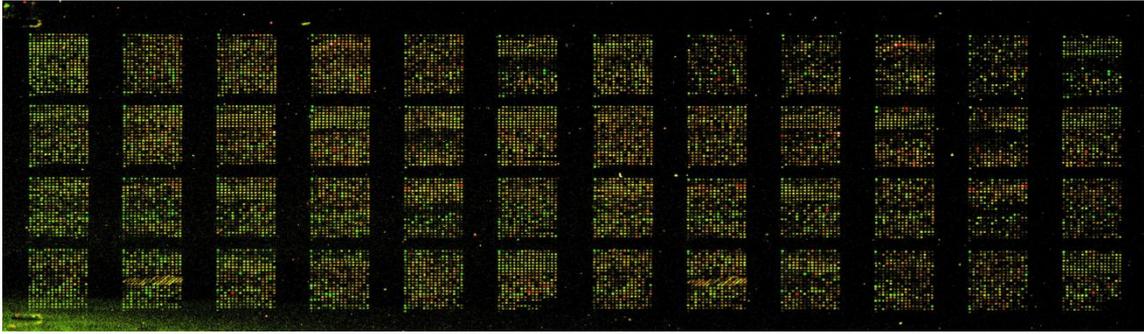


Abb. 2: Microarray mit 83 verschiedenen Genen in Leber und Kieme als Test vor dem eigentlichen Microarray in welchem Melanome im Vergleich zu hyperpigmentierter Haut getestet wurden. (C. Schmidt, 2008)

Im betreffenden Microarray wurden 83 verschiedene Gene bezüglich ihrer Expression in Melanomen des Fisches *Xiphophorus* im Vergleich zu hyperpigmentierter Haut untersucht. Für diese Arbeit wurden elf dieser Gene, welche überexprimiert waren, ausgewählt und näher überprüft um zu verstehen in wie weit Xmrk Signalwege, bzw. die Expression anderer Gene beeinflusst:

Tabelle 5: Untersuchte Gene mit ihrer im Microarray festgestellten Überexpression

Gen	Überexpression	Ensembl ID
G6PC	3,42	ENSORLG00000018711
GAMT	8,2	ENSORLG00000008238
GM2A	4,42	ENSORLG00000011522
MAPK3	4,12	ENSORLG00000011993
NID1	3,49	ENSORLG00000012649
PDIA4	9,11	ENSORLG00000007272
RASL11B	3,72	ENSORLG00000000467
SLC24A5	24,35	ENSORLG00000002760
SPP1		ENSORLG00000020900

TACC2	3,56	ENSORLG00000011582
ZFAND5	3,24	ENSORLG00000013620

Anmerkung: SPP1 wurde auf dem Microarray nicht überprüft, wurde aber aufgrund interessanter Publikationen mit einbezogen.

Hierzu wurden aus einer Anzahl an Melanomen und exophytische Erythrophoromen von transgenen Medakas, RNA extrahiert, welche dann letztendlich mittels Real-time-PCR im Vergleich zu hyperpigmentierter bis normaler Haut ausgewertet wurde.

In der Arbeit wurde überprüft in wie weit sich die Expression der verschiedenen Gene in Pigmentzelltumoren transgener Medakas im Vergleich zu gesunder Haut, bzw. Vorstufen der Pigmentzelltumoren unterscheidet. Um zu erfahren ob Xmrk die Expression betreffenden Gene verändert, wurden Xmrk-unabhängige Lymphome zum Vergleich hinzugezogen. Zur Analyse wurden hoch sensitive, quantitative Real-time-Analysen angewandt.

1.6 Übersicht der untersuchten Gene

1.6.1 G6PC

Die Glucose-6-Phosphatase gibt es beim Menschen in mehrere Isoformen, für welche die Gene *G6PC*, *G6PC2* und *G6PC3* codieren. Hier wurde das Gen *G6PC* untersucht. Dieses ist ein essentielles Enzym der Gluconeogenese und katalysiert die Abspaltung eines Phosphatrestes von Glucose-6-Phosphat.

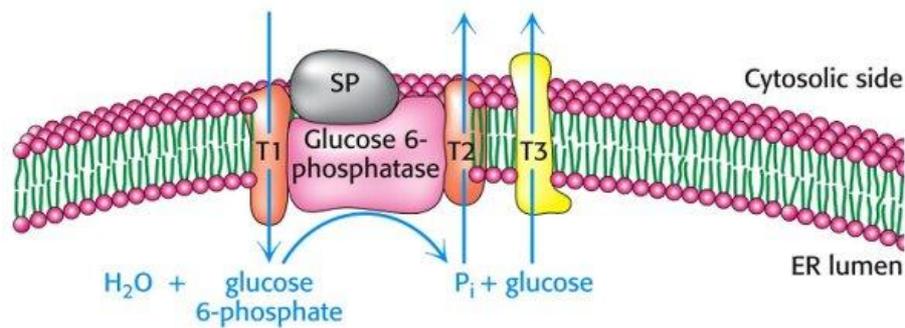


Abb. 3: Die Glukose-6-Phosphatase wird durch das Calciumbindende Protein SP stabilisiert. Nach der Spaltung der Glucose-6-Phosphat werden die Produkte Orthophosphat und Glukose mittels der Transporter T2 und T3 von der Lumenseite des ER wieder ins Zytoplasma befördert. (Berg, Tymoczko, Stryer, 2002)

G6PC wird hauptsächlich in der Leber, Nierenrinde, in den β -Zellen des Pankreas und in der Dünndarmmukosa exprimiert (van Schaftingen et al. 2002). Die Glucose-6-Phosphatase ist ein membranständiges Protein des endoplasmatischen Retikulums (ER) und bildet mit der Glucose-6-Phosphat-Translokase einen Komplex (Abb.3). Sie besitzt neun transmembranäre Helices, bestehend aus insgesamt 357 Aminosäuren (Lei et al. 1993). Der N-Terminus und das aktive Zentrum befinden sich an der Lumenseite des ER. Die exakte Struktur ist allerdings unbekannt (Ghosh et al. 2004).

Die Glucose-6-Phosphatase besitzt zwei verschiedene Phosphohydrolasen, G6Pase- α und G6Pase- β , wobei ersteres den Prototyp darstellt (Ghosh et al. 2004).

Mutationen des G6PC sind verantwortlich für die von-Gierke-Krankheit, eine Glycogenspeicherkrankheit wodurch eine Glucose-6-Phosphataccumulation in der Leber und im proximalen Tubulus der Niere und vermehrter Glycogensynthese resultiert. Die Folgen sind häufig eine Muskelschwäche und Wachstumsverzögerung (von Gierke, 1929).

1.6.2 GAMT

Guanidinoacetat-N-Methyltransferase (GAMT) ist ein Enzym, welches die Synthese von Kreatin aus Guanidinoacetat katalysiert, wobei S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator bereit steht (Abb. 4).

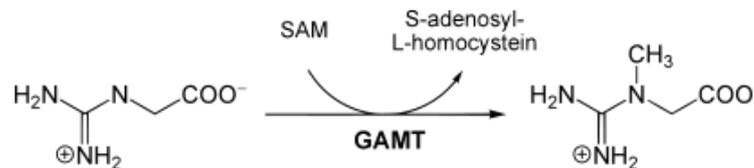


Abb. 4: Synthese von Kreatin aus Guanidinoacetat, katalysiert von der Guanidinoacetat-N-Methyltransferase (<http://de.wikipedia.org/wiki/GAMT>)

Kreatin ist die Vorstufe des Kreatinin, welches einen essentiellen Energiespeicher im Muskel darstellt. Mutationen im GAMT-Gen führen zu einem GAMT-Mangel, welcher mit neurologischen Störungen durch eine Ansammlung von Guanidinacetat im Gehirn und Muskel-Hypotonus einhergeht (Schulze et al. 2003).

GAMT zählt zu den Methyltransferasen und besteht aus einem Monomer mit 236 Aminosäuren (www.uniprot.org). Dabei sind zwei verschiedene Isoformen bekannt. In seinem Promotor besitzt GAMT drei potentielle p53-Bindungsstellen, wobei p53 an eine dieser drei Bindungsstellen binden kann und somit eine p53-abhängige GAMT-Transkription induziert. Eine up-Regulation des GAMT allein reicht nicht zur Apoptose aus. Als Reaktion auf genotoxischen und metabolischen Stress, produzieren menschliche Zellen und Mauszellen GAMT. Ebenso ist es essentiell für die p53-abhängige up-Regulation der Fettsäureoxidation und Apoptose im Zusammenhang mit Glucosemangel (Ide et al. 2009).

1.6.3 GM2A

Der offizielle Name lautet GM2-gangliosid-activator. Das Gen codiert für das gleichnamige Protein (Li et al. 1979), ein kleines Glycolipid-Transport-Protein, welches für die normale Funktion des Enzyms β -Hexosaminidase A essentiell

ist. Diese spielt eine wichtige Rolle beim Abbau von Glykosaminoglykanen und Glycosphingolipiden im Gehirn und Rückenmark (Klima et al. 1991). Dabei arbeitet es mit dem GM2 Gangliosid-Aktivator-Protein zusammen, welches die Lipidmoleküle bindet und dann den Hexosaminidasen präsentiert, welche daraufhin mit dem Abbau beginnen. Das GM2-Gangliosid-Aktivator-Protein ist in der Lysosomenmembran lokalisiert (Wendeler et al. 2004) (Abb. 5).

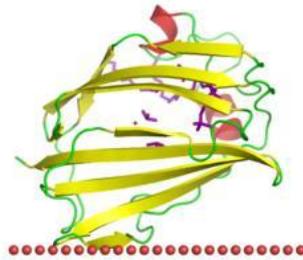


Abb. 5: Tertiärstruktur des Gangliosid-aktivator-Protein
(<http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=2ag4>)

Mutationen im GM2A-Gen (AB-Variante) führen zu einem nicht funktionstüchtigem GM2—Gangliosid-Aktivator-Protein, bzw. zu dessen frühzeitigem Abbau, wodurch die Ganglioside nicht abgebaut werden können, mit dem Ergebnis, dass in den Nervenzellen toxische Level erreicht werden und zu deren Untergang führen (Mahuran et al. 1999).

1.6.4 MAPK3

Der MAPK-Weg ist ein mehrstufiger Signaltransduktionsweg, der bei Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellwachstum und Embryogenese eine Rolle spielt.

Aktivierung der MAP-Kinasen:

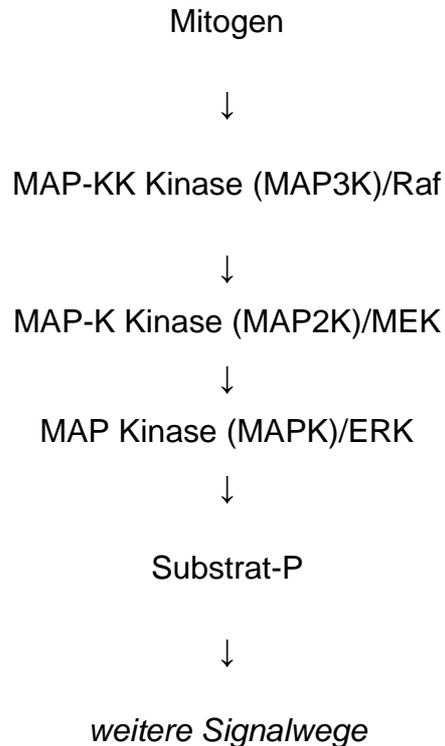


Abb. 6: Aktivierung der MAP-Kinasen

Man spricht hier auch von Phosphorylierungskaskaden, da die MAPK in dieser Reihenfolge phosphoryliert und damit aktiviert werden (Abb. 6). Dabei wird die MAPK von der MAPKK an zwei Stellen, einem Tyrosin und einem Threonin, welche durch nur eine Aminosäure getrennt sind, phosphoryliert. Die aktivierten MAPK phosphorylieren wiederum kerneigene Transkriptionsfaktoren im Nukleus, wodurch die Transkription vieler Zielgene reguliert wird. Findet eine Dephosphorylierung der MAPK statt, wandern sie ins Zytosol, bis sie wieder phosphoryliert werden (www.wikipedia.de).

MAPK werden in verschiedene Gruppen eingeteilt:

- extrazellulär-regulierte-Signal-Kinase (ERK1/2)
- p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
- c-Jun-N-terminalen Kinasen JNK

MAPK3 sind Serin-Threonin-Kinasen, auch ERK1 (extrazellulär-regulierte-Signal-Kinasen) genannt. Sie kommen in allen Geweben in unterschiedlicher Anzahl vor. Die Aktivierung erfolgt durch Mitogene; Proteine welche das Zellwachstum anregen. Bei 30% aller Krebsarten ist diese Kaskade hyperaktiv (Garnett et al. 2004).

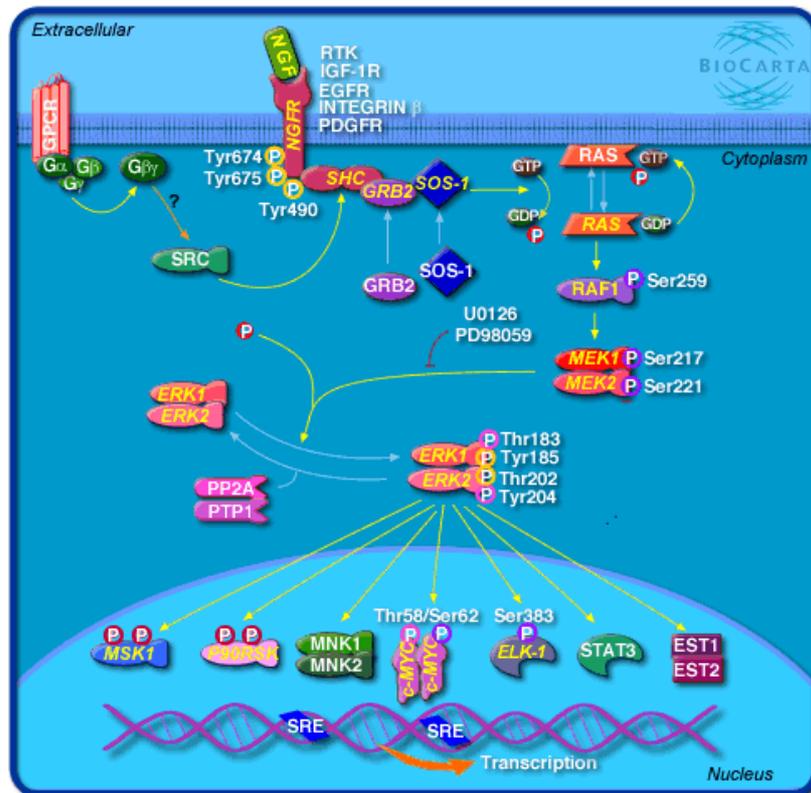


Abb. 7: Erk1/Erk2 Mapk Signaltransduktion (Michael Shih, www.biocarta.com)

Die ERK-Kaskade besteht aus sechs Stufen (Abb. 7). Initiiert wird die Kaskade durch Ligandenbindung an Rezeptoren, welche in diesem Fall die Rezeptor-Tyrosin-Kinase, Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase oder Rezeptoren mit gekoppeltem G-Protein sind. Als Liganden dienen Wachstumsfaktoren, wie epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factor (PDGF), insulin like growth factor (IGF) und nerve growth factor (NGF). Die ribosomale Translation wird durch den epidermal growth factor (NGF) ERK1/2-abhängig aktiviert (Orton et al. 2005).

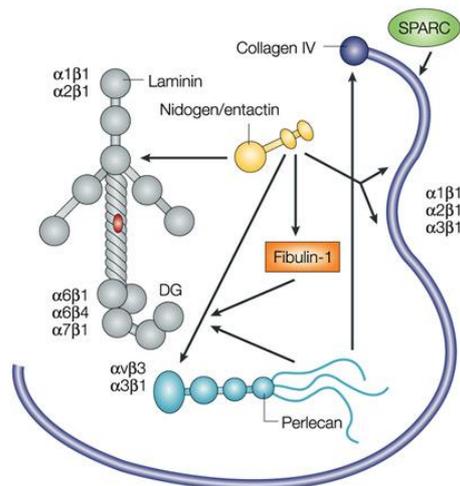
Im nächsten Schritt wird RAS aktiviert, welches dann mit Raf1 in Verbindung tritt, dessen Effektorprotein wiederum MEK darstellt. Das aktivierte MEK phosphoryliert anschließend die nachgeschalteten MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (Orton et al. 2005).

Da die ERKs Substrate mit der häufig vorkommenden Sequenz Pro-Leu-Ser/Thr-

Pro phosphoryliert, schließt man daraus, dass eine große Anzahl von Effektorproteinen existiert (Alvarez et al. 1991). Die wichtigsten Substrate sind dabei Transkriptionsfaktoren wie c-MYC oder ELK-1, welche durch Phosphorylierung aktiviert werden (Karin et al. 1994).

1.6.5 NID1

Das NID1-Gen codiert für das Nidogen1-Protein, auch Entactin genannt (Olsen et al. 1989). Dies ist ein Protein der Basallamina, welche aus zwei Schichten, der Lamina rara und der Lamina densa mit jeweils einem Durchmesser von ca. 20nm, besteht. In beiden Schichten ist Entactin zu finden. Ebenso wie Kollagen Typ IV, Proteoglycane, Laminin und Fibronectin. Entactin interagiert mit sämtlichen dieser Proteine und weiteren Proteinen der Basallamina (Abb. 8), wodurch diese in allen drei Dimensionen stabilisiert wird (Durkin et al. 1988). Möglicherweise spielt es auch eine Rolle bei Zell-Kommunikationen mit der Extrazellulärmatrix, vor allem bei Interaktionen mit Fibulin1 (Sasaki et al. 1995).



Nature Reviews | Cancer

Abb. 8: Interaktion von Entactin mit Proteinen der Basallamina (Kalluri, 2003)

In Krebszellen wird das NID1-Gen abnormal stark methyliert, was mit einem Verlust der Transkription einhergeht. Dies kann bei Demethylierung des Promotors wieder aufgehoben werden (Ulazzi, 2007).

Nidogen spielt auch eine wichtige Rolle bei der Zell-Adhäsion, da es mit verschiedenen Integrinen, insbesondere mit der β_1 -Familie der Integrinrezeptoren und mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, Bindungen eingeht (Zhou et al. 1993). Ein Verlust der Nidogen-Expression begünstigt das Einwandern von Metastasen durch den Verlust der Verbindung zur Basalmembran und deren Schwächung (Ulazzi, 2007).

Die Interaktionen zwischen Basalmembran und Zelle regulieren verschiedene Prozesse wie Apoptose, Differenzierung und Proliferation.

1.6.6 PDIA4

Hierbei handelt es sich um ein Enzym der Protein Disulfid Isomerase family A (member 4), welches zu den Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) gehört, welches wiederum zur Thioredoxin-Superfamilie zugeordnet wird und im Lumen des ER und Melanosomen angesiedelt ist (Weisbart et al. 1992). Dabei liegt es in verschiedenen Oligomerisierungsformen vor, zB. als Tetramer oder

Homodimer. PDI ist aus zwei redox-aktiven und zwei inaktiven Untereinheiten aufgebaut. Es katalysiert die Bildung von Disulfidbrücken in Proteinen, nachdem es von dem Protein Ero1p oxidiert wird (Goldberger et al. 1963). Zudem ist es Teil eines großen Chaperon-Proteinkomplexes (Abb. 9). PDIA4 enthält dagegen drei aktive Thioredoxin-Domänen und verfügt über eine Calciumbindungsaffinität (Mamoru et al. 2005).

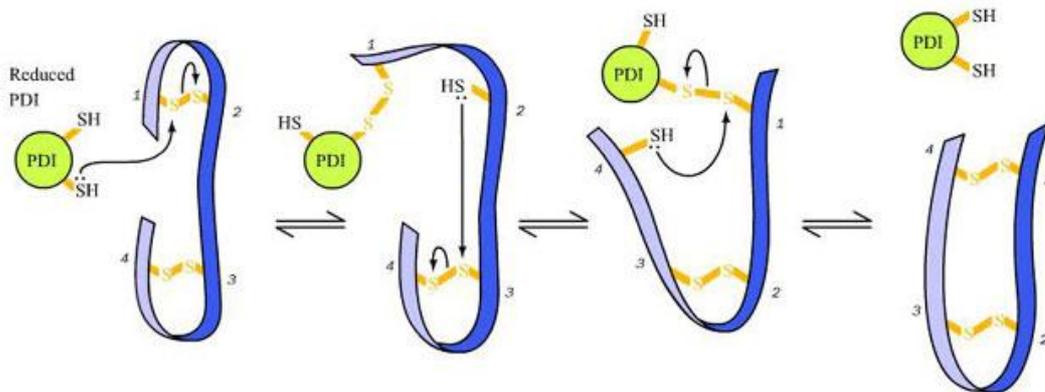


Abb. 9: Chaperonaktivität der Protein-Disulfid-Isomerase (Ekstrom J., 2010)

PDI ist auch eine Untereinheit des Enzyms Prolyl-4-hydroxylase, welches an der Kollagensynthese beteiligt ist (Koivu et al. 1987).

In der Membran von neutrophilen Granulozyten scheint PDIA4 als Antigen zu fungieren. Weißbart et al. zeigte 1992, dass nach der Bindung eines Antikörpers an PDIA4 in der Granulozytenmembran, der Metabolismus der Zelle angeregt wird. In diesem Kontext scheint PDIA4 in Verbindung zu Autoimmunerkrankungen zu stehen. Allerdings sind die genauen Mechanismen noch unbekannt.

1.6.7 RASL11B

RASL11B gehört zu einer Gruppe, über die bisher nur wenig publiziert wurde; der Familie der kleinen GTPasen, welche eine hohe Ähnlichkeit zu den H-RAS-Proteinen aufweist. Sie befinden sich auf der zytosolischen Seite und sind über einen postranslational angeheften Fettsäurerest in der Zellmembran verankert. Meist besitzen die kleinen GTPasen ein C-terminales Erkennungsmotiv, das

CaaX mit C: Cystein, a: aliphatische Aminosäure, X: Leucin, Methionin, Serin oder Glutamin. Dies fehlt allerdings beim RASL11B (Stolle et al. 2007).

Die Aufgaben von GTPasen sind vielfältig. So beeinflussen sie das Zellwachstum und die Differenzierung von Zellen, regulieren das Wachstum des Cytoskeletts, Exozytose und Endozytose, sowie den intrazellulären Vesikeltransport und sind am nukleären Import beteiligt (Exton, 1998). Das Protein RAS stellt den bekanntesten Vertreter der kleinen GTPasen dar. Mutationen, die RAS konstitutiv aktivieren, spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Karzinomen (Bos et al. 1989).

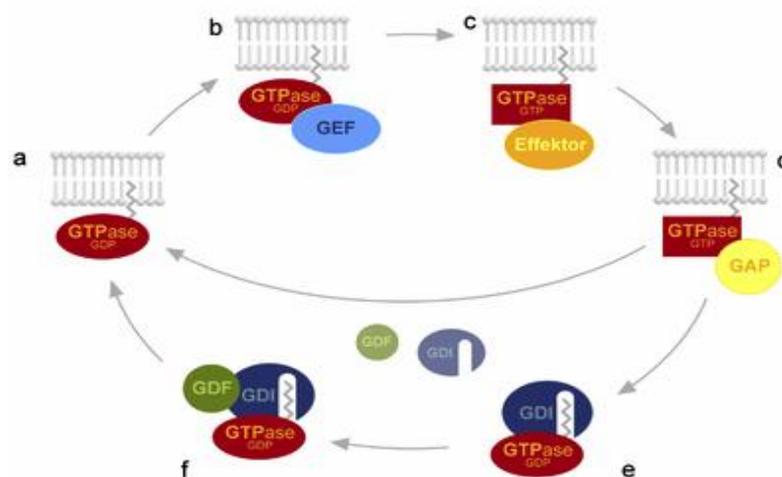


Abb. 10: GTPase-Zyklus (http://de.wikipedia.org/wiki/Kleine_GTPase)

Die Aktivierung von kleinen GTPasen und damit der Wechsel von der gebundenen GDP- in die GTP-Form erfolgt über die Katalyse von GEF (guanine nucleotide exchange factor) (Vetter et al. 2001) (Abb. 10).

RASL11B wird vor allem in primären Makrophagen und der Plazenta exprimiert. Unter anderem gehört RASL11B auch zu einer RAS-Subfamilie von Tumorsuppressoren (Pezeron et al. 2008).

1.6.8 SLC24A5

SLC24A5 gehört zu den SLC-Transportern, welche ungeladene und geladene Moleküle, sowie anorganische Ionen transportieren können.

SLC24A5 codiert für ein intrazelluläres Membranprotein, bei welchem es sich um einen kaliumabhängigen Natrium/Calcium-Austauscher mit zwei großen hydrophoben intrazellulären loops und zwei transmembranäre Anteilen handelt (Schnetkamp et al. 2004). Möglicherweise ist er am Kationenaustausch in Melanosomen beteiligt. Es wird angenommen, dass ein Kaliumion mit einem Calciumion gegen vier Natriumionen ausgetauscht wird (Lamason et al. 2005).

Das Gen hat einen sehr großen Einfluss auf die Hautfarbe. Eine Änderung der Sequenz im Gen, besonders ein Austausch der Aminosäure auf Position 111 im Protein (Threonin statt Alanin) hat eine veränderte Hautpigmentierung zur Folge. Ein Entfernen des Proteins hat eine signifikante Verminderung der Melaninproduktion zur Folge (Lamason et al. 2005).

Es wird angenommen, dass SLC24A5 in der Evolution, betreffend der Hautfarbe von europäischen Vorfahren, eine Rolle spielt. Die Funktion des Gens wurde erstmals in Zebrafischen entdeckt. Keith Cheng ging der Ursache auf den Grund, weswegen eine Mutante von Zebrafische goldene Streifen besitzen, im Vergleich zu ihren wildlebenden Artgenossen mit dunkelblauen Streifen (Cheng, 2006) (Abb. 11). Dabei entdeckte er mittels Elektronenmikroskop, dass es eine auffällige zelluläre Veränderung der Melanozyten der goldenen Zebrafische gibt, welche mit den Melanozyten hellhäutiger Menschen identisch sind. Mark D. Shriver fand schließlich heraus, dass aufgrund des Austausches einer Aminosäure an der 111. Position des Proteins des Gens SLC24A5 die unterschiedlichen Färbungen entstehen. Europäer besitzen zu 98,7-100% das Threonin-Allel, während Afrikaner, Ost-Asiaten und eingeborenen Amerikaner zu 93-100% das Alanin-Allel besitzen. Es wird angenommen, dass sich das Threonin-Allel vor 5.300-12.000 Jahren durchsetzte.

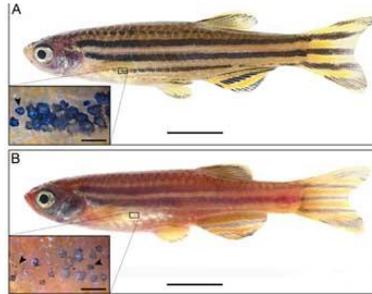


Abb. 11: A: Zbrafish Wildtyp, B: goldener Phänotyp (Lamason et al., 2005)

Das Protein SLC24A5 ist im Golgi-Apparat oder in Melanozyten lokalisiert. Die Expression von SLC24A5 ist in Auge und Haut zehnfach höher, als in sonstigem Gewebe. In Melanomen beträgt die Expression das 100fache (Lamason et al. 2005).

1.6.9 SPP1 (Opn)

Osteopontin ist ein extrazelluläres Strukturprotein, das an der Knochenerhaltung beteiligt ist und einen Teil des Knochenmarks darstellt. Das zugehörige kodierende Gen wird SPP1 (secreted Phosphoprotein 1) genannt. Durch Bindung von Hydroxylapatit stellt es die Knochenmatrix dar, ist aber auch an der Bildung von Nierensteinen beteiligt. Es gehört zur Familie der small integrin binding ligand N-linked Glycoproteinen, besteht aus ca. 300 Aminosäuren und besitzt viele saure Reste, wie Glutamat und Aspartat.

Osteopontin beeinflusst die Knochenneubildung, indem es die Bildung des Bürstensaums (ruffled border) initiiert, an welchem die eigentliche Knochenresorption stattfindet. Ebenso spielt es auch eine Rolle als Immunmodulator, z.B. in der Wundheilung und Zelladhäsion. Studien haben gezeigt, dass osteopontin-produzierende Tumore in der Lage sind, die Makrophagenaktivität zu steigern. Zudem ist es ein wichtiger anti-Apoptose-Faktor (Standal et al. 2004).

Osteopontin entsteht im Gehirn, Knochenmark, Makrophagen, Osteoblasten, Innenohr, Niere, Plazenta, Odontoblasten, glatter Muskulatur, Knorpelzellen und endothelialen Zellen (Kohri et al. 1992).

Des Weiteren ist Osteopontin ein üblicher Bestandteil von elastischen Fasern der Haut und der Aorta (Bacarini-Contri et al. 1994).

Osteopontin spielt auch in der Wundheilung und Immunantwort bei Erkrankungen, wie allergische Atemwegserkrankungen, reumatoide Arthritis, autoimmune Hepatitis und multiple Sklerose eine Rolle (Abb. 12). Osteopontin wird auch Eta-1 genannt, für „early T lymphocyte activation 1“, da es ein Ligand für CD44-Zellen darstellt (Suzuki et al. 2002).

Eine Fähigkeit des Osteopontins ist die Bindung von Integrinen über die RGD-Sequenz, einer Sequenz der drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure, wodurch Zellen mechanisch verankert werden (Karadag et al. 2006). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle im Tumorwachstum als Botenstoff. Bei aggressiven Tumoren liegen häufig sehr hohe Osteopontinserumspiegel vor. So ist vor allem bei den Krebsarten Lungenkrebs, Brustkrebs, Darmkrebs, Magenkrebs, Eierstockkrebs, Hautkrebs und dem Pleuramesotheliom Osteopontin überexprimiert (www.wikipedia.de).

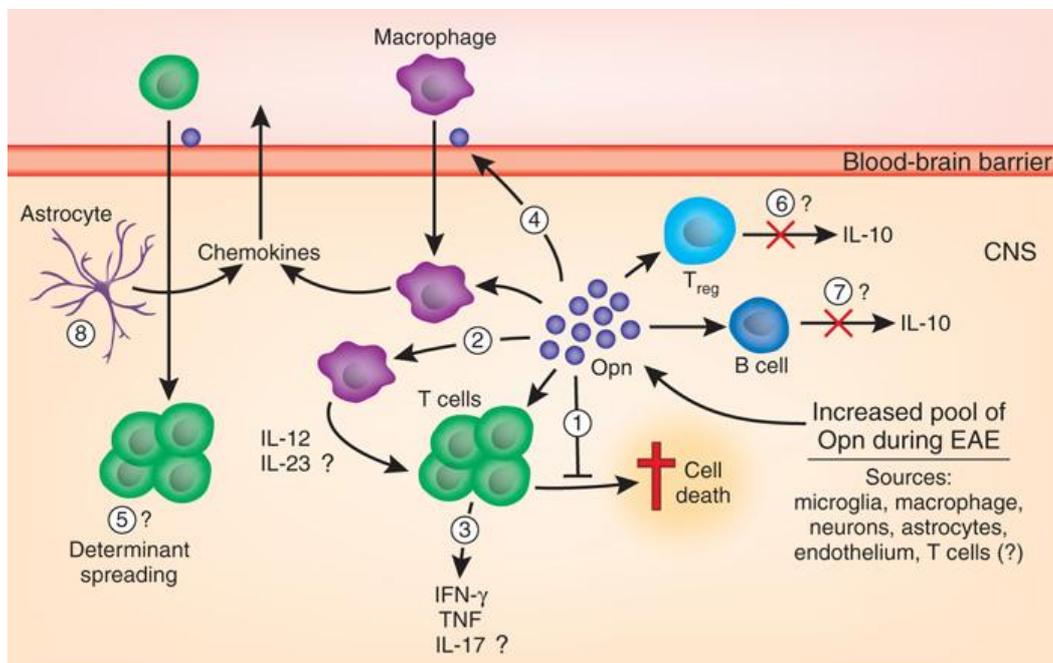


Abb. 12: Identified Opn-induced mechanisms that could influence disease progression include enhanced survival of activated T cells in the CNS (1); increased IL-12 production by macrophages (effect of Opn on IL-23 production is unknown; 2); enhanced secretion of

proinflammatory cytokine production by T cells (effect on IL-17 production is unknown; 3); increased migration of monocytes and T cells into the CNS (4), which could lead to increased determinant spreading (5); possible inhibition of IL-10 produced by regulatory T cells (6); possible inhibition of IL-10 produced by B cells (7); and activation of astrocytes (8); '?' indicates potential mechanisms that are consistent with reported Opn activity but have not yet been demonstrated. IFN, interferon; TNF, tumor necrosis factor. (Stromnes I., Goverman, J., 2007)

In einigen menschlichen Tumoren wurden Splice-Varianten des Osteopontins beobachtet (He et al. 2006). Diese sind Osteopontin-a, Osteopontin-b und Osteopontin-c. Für die Expression von Osteopontin sind die Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osterix essentiell. Hypophosphatasie und Hypocalcämie führen zu einem Anstieg der Osteopontintranskription und – translation, was in einem hoch spezifischen Vitamin D response element im Promotor des Osteopontins begründet ist. Die Osteopontinexpression wird ebenso durch Cytokine, proinflammatorische Stoffe, Angiotensin II, transforming growth faktor β und Parathormon stimuliert.

Osteopontin spielt möglicherweise eine Rolle in der Hemmung des Tumorwachstums, da es ein Zielgen des P53 darstellt und bei DNA-Schäden durch die Aktivierung des P53 hochreguliert wird. Der Zusammenhang mit P53 entsteht über eine P53-abhängige Region im Promotor des Osteopontins (Morimoto et al. 2002).

1.6.10 TACC2

TACC2 kodiert für das transforming acidic coiled-coil-containing protein 2. Dies gehört zur Familie der Transforming acidic coiled-coil Proteine, welche mit Zentrosomen und Mikrotubuli interagieren und mit Krebs in Zusammenhang gebracht werden. TACC2 liegt auf einem Chromosomenabschnitt, welcher mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht wird. Die Expression dieses Gens wird mit Brustkrebs assoziiert (Cheng et al. 2010). Allerdings wird Expression durch Erythropoetin induziert (Pu et al 2001).

Das zugehörige Protein fungiert möglicherweise als Tumorsupressorprotein, bzw. repräsentiert einen Tumormarker. Die These des Tumorsupressorproteins wurde allerdings von Schuendeln et al. 2004 widerlegt, da allein das Fehlen von TACC2 keine Tumore oder ein verändertes Zellwachstum hervorruft.

Da bei vielen Krebszellen zentrosomale Abnormalitäten zu beobachten sind, steht die Vermutung nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen Zentrosomen und Krebs gibt. Es besteht der Verdacht, dass TACC-Proteine dazu beitragen. Sie befinden sich an den Zentrosomen, wo sie die Stabilität der Mikrotubuli regulieren (Xie et al. 2007) (Abb. 13).

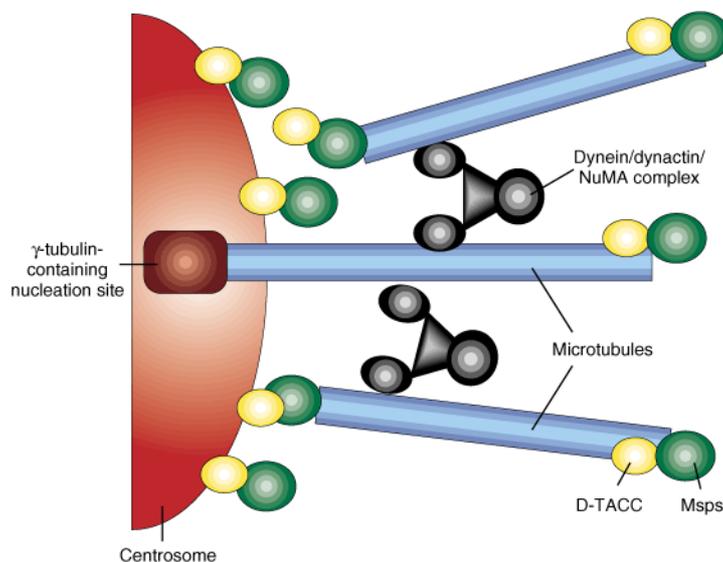


Abb: 13: D-TACC und Msps sind jeweils an den Zentrosomen lokalisiert und kooperieren dort mit einander um zentrosomale Mikrotubuli zu stabilisieren. Dabei binden diese zuerst an das minus-Ende der Mikrotubuli und stabilisieren damit diese und anschließend an das plus-Ende (Lee M., 2001)

1.6.11 ZFAND5

ZFAND5 (zinc finger, AN1-type domain 5) gehört zu der Familie der Zinkfingerproteine. Diese interagieren mit Nukleinsäuren und haben

unterschiedliche Funktionen. Die Zinkfingerdomäne ist eine Aminosäuresequenz, welche an der Koordination von Zink beteiligt ist.

ZFAND5 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von NF- κ B, einem wichtigen spezifischen Transkriptionsfaktor, der praktisch in allen Zelltypen und Geweben vorkommt (Huang et al. 2004). Zudem verhindert es die Osteoklastendifferenzierung (Hishiya et al. 2005) und spielt eine kritische Rolle in der Muskelatrophie und Proteinabbau, da der AN1-typ Zinkfinger in ubiquitinähnlichen Proteinen, welche am Ubiquitinstoffwechsel beteiligt sind, gefunden wurde (Hishiya et al. 2006).

Zinkfingerdomänen können nicht nur Zink, sondern auch Eisen und Nichtmetalle binden. Zu Beginn wurde eine Zinkfingerdomäne im Transkriptionsfaktor TFIIIA als DNA-bindendes Motiv entdeckt. Daraufhin wurde bekannt, dass Zinkfingerdomänen neben DNA auch RNA und Proteine binden können (Brown et al. 2005). Der AN1-type Zinkfinger kann mit Hilfe seiner Sequenz von sechs Cystein-Molekülen und zwei Histidin-Molekülen jeweils zwei Zinkatome binden (Mukhopadhyay et al. 2003).

2. Material

2.1 Verwendete Fische

Es wurden ausschließlich *Oryzias latipes* (*Medakas*) verwendet. Die Pigmentzelltumore stammen aus transgenen Linien mit dem mitf:Xmrk-Konstrukt. Dabei wurden Linien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund (Carbio, Albinos oder p53-knockouts) verwendet. Die Lymphome und gesunden Kontrollorgane entstammen nicht-transgenen Wildtyp-Linien.

Tabelle 6: Verwendete Fische, bzw. Gewebe mit den jeweiligen Kreuzungen

Nr.	Gewebe	Anzahl der Fische	Kreuzung
1	Gehirn	5 ♂	Carbio Wildtyp (KN 1754)
2	Auge	5 ♂	
3	Kieme	5 ♂	
4	Leber	5 ♂	
5	Milz	5 ♂	
6	Hoden	5 ♂	
7	Gehirn	5 ♂	Carbio Wildtyp (KN 2674)
8	Auge	5 ♂	
9	Kieme	5 ♂	
10	Leber	5 ♂	
11	Milz	5 ♂	
12	Hoden	5 ♂	

13	tumorfrees Gewebe	1	<i>mitf</i> :Xmrk, carbio (KN 3124)
14	Tumor	1	
15	Tumor mit Muskelgewebe	1	
16	exophytisches Erythrophorom (am Kopf oben rechts, sehr groß, evt. nekrotisch)	1	<i>mitf</i> :Xmrk albino (KN 3453)
17	exophytisches Erythrophorom (vor Rückenflosse, metastasierend)	1	<i>mitf</i> :Xmrk albino (KN 3453)
18	Melanom (Bauchhöhle)	1	
19	exophytisches Erythrophorom (vor Schwanzflosse, evt. nekrotisch)	1	
20	exophytisches Erythrophorom (vor Rückenflosse, frühe Wachstumsphase)	1	
21	exophytisches Erythrophorom (Bauch , vor Afterflosse)	1	
22	exophytisches Erythrophorom	1	
23	Augenmelanom	1	
24	exophytisches Erythrophorom (an Schwanzwurzel, anfängliche Wachstumsphase)	1	
25	Augenerythrophorom	1	
26	invasives Melanom	1	
27	Lymphom	1	<i>mitf</i> :Xmrk,

28	exophytisches Erythrophorom	1	Carbio (KN 3537)
29	Tumor mit Muskelgewebe	1	Medaka ohne Xmrk
30	Kiemen	1	
31	Leber	1	
32	Milz	1	
33	exophytisches Erythrophorom 1 (orange)	1	<i>mitf</i> :Xmrk, Carbio, p53-/- (KN 3715r)
34	exophytisches Erythrophorom 2 (hell gelb)	1	
35	invasives Melanom (evt. mit Muskelgewebe)	1	
36	exophytisches Erythrophorom (orange)	1	
37	sehr großes fortgeschrittenes exophytisches Erythrophorom (gelb/orange mit kleinen schwarzen Anteilen)	1	<i>mitf</i> :Xmrk (KN 3362)
38	vermutlich Lymphom	1	Medka VaBR (ohne Xmrk)
39	Tumor an Kieme (rot)	1	Medaka ohne Xmrk
40	exophytisches Erythrophorom (orange)	1	<i>mitf</i> :Xmrk, Albino (KN 3656)
41	exophytisches Erythrophorom (orange) mit invasivem Melanom	1	
42	Augenmelanom	1	

43	invasives Melanom (frühes Stadium)	1	
44	exophytisches Erythrophorom (orange mit gelben Anteilen)	1	<i>mitf</i> ::Xmrk, Carbio, p53-/- (KN 3715)
45	invasives Melanom	1	
46	Augenmelanom	1	
47	exophytisches Erythrophorom (orange)	1	
48	Muskel	6	Carbio Wildtyp
49	Haut	6	
50	Auge	6	
51	Milz	6	
52	Gehirn	6	
53	exophytisches Erythrophorom (Schwanzflosse)	1	<i>mitf</i> ::Xmrk, Carbio, p53-/- (KN 3819)
54	Melanom (abgekapselt, im abdominalen Bereich, keine Verwachsungen mit inneren Organen)	1	
55	exophytisches Erythrophorom	1	
56	Haut (normal)	1	<i>mitf</i> ::Xmrk, Carbio (KN 3669)
57	Frühstadium exophytisches Erythrophorom	1	
58	Frühstadium exophytisches Erythrophorom	1	
59	Frühstadium exophytisches Erythrophorom	1	
60	Frühstadium exophytisches Erythrophorom	1	<i>mitf</i> ::Xmrk, Carbio
61	Frühstadium exophytisches Erythrophorom	1	

62	gesunde Haut	1	(KN 3362)
63	Hyperpigmentierung	1	
64	Hyperpigmentierung	1	
65	Hyperpigmentierung	1	
66	Hyperpigmentierung	1	
67	Hyperpigmentierung	1	
68	Hyperpigmentierung	1	
69	Hyperpigmentierung	1	
70	exophytisches Erythrophorom	1	
71	Hyperpigmentierung	1	
72	Hyperpigmentierung	1	
73	Hyperpigmentierung-normale Haut	1	
74	Vorstufe Hyperpigmentierung	1	
75	Vorstufe Hyperpigmentierung	1	
76	Gehirn	8	
77	Auge	8	
78	Kiemen	8	
79	Leber	8	
80	Milz	8	
81	vermutlich Lymphom (am Kopf)	1	delta DMG, 3u, Carbio

			(KN 3877)
--	--	--	-----------

2.2 Chemikalien

Tabelle 7: verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Roth
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Serva
Chlorophorm	Sigma
DEPC	Roth
DMSO	Roth
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Gibco
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Sigma
FITC	BioRad
Glycerin	Ferak
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Roth
Natronlauge	Roth
SybrGreen	BioRad
Total-RNA-Isolation-Reagent (TRIR)	Peqlab
Tris	Roth
Triton	Roth
Xylencyanol	Serva
β -Mercaptoethanol	Merck

2.3 Pufferlösungen

10x ReproFast Puffer

200 nM Tris
500 mM KCl
15 mM MgCl₂
1% Triton
2 mg/ml BSA

50x TAE

242 g/l Tris
57,1 ml/l Eisessig
100 ml/l 0,5M EDTA (pH8)

TE 10:1

1M Tris
0,5M EDTA

Ladepuffer

Glycerin
0,5M EDTA
20% SDS
Bromphenolblau
Xylencyanol

2.4 Kits

Desoxyribonuklease I

Fermentas

Desoxyribonuklease I (RNase-free)
(1u/μl)
10X Reaction Buffer with MgCl₂
25nM EDTA
RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor
(40u/μl)

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit Fermentas RevertAid™ M-MuIV Reverse Transcriptase (200u/μl)
 RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor (20u/μl)
 5x Reaction Buffer
 10mM dNTP Mix
 Random Hexamer Primer

RNeasy Mini Kit Qiagen Buffer RLT
 Buffer RW1
 Buffer RPE
 1500 units RNase-free DNase I
 RNase-free Buffer RDD

2.5 Enzyme

Go Tag Promega

2.6 Primer

Tabelle 8: verwendete Primer mit zugehöriger Schmelztemperatur und Größe

Gen	Sequenz Forward Primer	Sequenz Reverse Primer	Tm (left/right) [°C]	Produkt -größe [bp]
<i>ELF</i>	GCTCAGCCTTGAGTTTGT CC	CACCGGTCACCTGATCTA CA	63,9/63,7	130
<i>G6PC</i>	AGTATCCCATGACCTGCG AG	CCAAAACAAGGACCATAG GC	60.1/59.4	197
<i>GAMT</i>	TTCGCACGTCTGGAGAAC TG	AGCAACCTGTATGCGTGA CC	62.6/61.1	212
<i>GM2A</i>	GAACTGGACGCTCCGTTA TC	ACGTTGGGCAGGTAGAA GTC	59.7/59.2	260

<i>MAPK</i>	CACTCTGCCAACGTGCTG	AACGAGTGGCCACATACT CAG	60.2/60.2	160
<i>NID1</i>	ACCGGTATGCTGTCTTTG GA	GGAGCTGTGAGAATCCG TGT	60.5/60.3	106
<i>PDIA4</i>	AAGCGTCTGGCTCCAGAG TA	TCTCCCATGTGTTCCACG AT	60.2/61.4	221
<i>RASL1 1B</i>	GCGCTTCATTGGAGACTA CG	AGTAAACCAGCACCCACAG CA	60.9/59.4	209
<i>SLC24 A5</i>	ACTGCCTGGCATATGGAA TC	AACTCACTGATGCGGAG GTC	59.9/60.3	151
<i>SPP1</i>	AGATTCATGGCAACGAGG TG	TGGTCTTGAGATACGCTG GA	60.1/59.4	150
<i>TACC2</i>	GTGCTCAGGATTATCTGTC ACG	CTAGCCTGGTAGACCGCT TG	59.8/60.0	157
<i>ZFAND 5</i>	AGGTCTCAGCCATTCAGA GG	AGCGACAGCAGGTGAGC TT	59.4/61.3	122

2.7 Marker

1kB-Ladder-Mix

Ladder (Gibco, 1µg/µl)

TE 10·1

Ladepuffer

2.8 Geräte

- Waage: Chyp MP 300
- Real-Time PCR Zykler: Bio-Rad iCycler
- PCR-Zykler: T Gradient (Biometra)
- PCR-Zykler: Tpersonal (Biometra)
- PCR-Zykler: T3 Thermocycler (Roxanne© 2004)
- Gelelektrophoresekammer: Hergestellt von der Werkstatt des Biozentrums der Universität Würzburg
- Zentrifuge: Biofuge Pico (Heraeus)
- Spektralphotometer: Nano Drop® ND 1000 (Detektionslimit 2ng/µl)

- Zentrifuge 5415C (Eppendorf)
- Heizblock: Thermomixer 5436 (Eppendorf)
- KODAK images station 4000MM
- Mikroskop: Axiovert 100 (Zeiss)
- Brutschrank (Heraeus)

3. Methoden

3.1 Microarray-Analyse

Hierzu wird zunächst die mRNA des zu untersuchenden Gewebes isoliert, in cDNA umgeschrieben, auf einer festen Phase immobilisiert und mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Die Menge an mRNA in einer Zelle gibt Aufschluss darüber, wie oft die entsprechende DNA transkribiert wurde. Sämtliche zu überprüfenden Gene sind auf einem Gen-Chip, dem Microarray, angeordnet. Die markierte cDNA wird auf den Chip gegeben, wodurch die DNA an die entsprechenden Gene bindet. Anschließend wird die Fluoreszenz mit sogenannten Array-Scannern gemessen und mit einer entsprechenden Software ausgewertet. Die Fluoreszenz korreliert dabei mit der Expressionsrate. Es werden jeweils zwei Proben miteinander verglichen. Dabei wird in Form von „Spots“ angezeigt, ob Probe A höher exprimiert ist (blau) als Probe B (gelb). Bei gleich starker Expression beider Proben erscheint ein grüner Spot.

Der hier verwendete Microarray wurde in Kooperation des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Universität Marburg angefertigt.

3.2 Präparation der Fische

Die Tumore bzw. Organe wurden von Prof. Schartl nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes präpariert und anschließend auf Trockeneis oder in Flüssigstickstoff gelagert, bzw. bei -80°C eingefroren.

3.3 RNA-Extraktion

Für das Arbeiten mit RNA gelten gesonderte Regeln, da es sonst schnell zur RNA-Denaturierung kommen kann (Sambrook, Russell, 1989):

- grundsätzlich sollten alle Glas- und Plastikwaren, welche mit RNA in Berührung kommen, autoklaviert werden
- Wasser sollte im Voraus mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt werden, da dieses RNAsen inaktiviert. Hierzu wird 1ml DEPC/l Wasser angesetzt, 12h gerührt und anschließend autoklaviert, um kanzerogenes DEPC zu beseitigen
- alkalische Puffer sollten vermieden werden
- alle RNA-Reagenzien sollten separat behandelt und gelagert werden, um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden
- sinnvoll ist auch das Arbeiten an gesonderten RNA-Arbeitsplätzen, zudem sollten Handschuhe getragen werden, um eine Kontamination mit RNAsen , welche sich auf der Haut befinden, zu vermeiden

Bei der RNA-Extraktion kamen zwei verschiedenen Verfahren zur Anwendung, wobei letztere hauptsächlich bei Melanomen verwendet wurde:

Phenol/Chloroform-Extraktion:

Im Voraus müssen die Gewebe gewogen werden.

Zu jeweils 50-100mg Gewebe wird 1ml TRIR (TotalRNAIsolationReagent) gegeben. Die Proben werden mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Dabei muss zwischen jedem Gewebewechsel das Messer jeweils dreimal mit Wasser und einmal mit Ethanol gespült werden. Die Proben werden währenddessen auf Eis gelagert. Im Anschluss lagern die Proben 5min bei Raumtemperatur und werden anschließend 10min bei 10.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt in welches 200µl Chloroform zugegeben wird. Das Eppendorfgefäß wird 30s lang geschüttelt und anschließend 5min auf Eis gelagert. Danach wird es 15min bei 10.000rpm und 4°C zentrifugiert. Die oberste der drei entstandenen Phasen wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in welches ebenso 500µl

Isopropanol gegeben werden. Die Proben werden geschüttelt und inkubieren zehn weitere Minuten auf Eis. Anschließend werden sie 10min bei 10.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Pellet wird in 1ml 75% Ethanol gelöst und hierzu vorsichtig geschüttelt. Daraufhin werden die Proben 15min bei 10.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum abgenommen und verworfen. Das Pellet wird im Heizblock bei 55°C 1-2min getrocknet und in 175µl DEPC-Wasser gelöst.

RNA-Extraktion mittels RNeasy-Kit:

Die Gewebe werden wieder im Voraus gewogen und so aufgeteilt, dass im Endeffekt Portionen von >30mg resultieren. Ebenso wird im Voraus der RLT-Puffer angesetzt, für welchen 1ml RLT und 10µl β-Mercaptoethanol eingesetzt werden.

Die Proben werden jeweils mit 600µl RLT-Puffer mittels des Ultra-Turrax 20-40s lang homogenisiert. Das Messer wird wieder zwischen jedem Gewebewechsel dreimal mit Wasser und einmal mit Ethanol gespült. Die Proben werden anschließend bei maximaler Umdrehung (14.000rpm) und Raumtemperatur 3min lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu diesem werden 600µl Ethanol gegeben. Die Proben werden unmittelbar darauf durchmischt und auf die vom Hersteller mitgelieferte Säule gegeben. Dabei dürfen nicht mehr als 700µl auf einmal eingesetzt werden. Die Säulen werden 15s lang bei 10.000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Vorgang wird so lange wiederholt, bis die komplette Probe die Säule passiert hat. Das Filtrat wird verworfen.

Im Anschluss findet der DNase-Verdau statt. Hierzu werden 350µl RW-Puffer auf die Säulen gegeben und diese bei 10.000rpm und Raumtemperatur 15s lang zentrifugiert. Anschließend wird ein Mastermix aus 10µl DNase-Stock-Solution und 70µl RDD-Puffer hergestellt. Pro Probe werden 80µl des Mastermixes auf die Säulen gegeben. Diese inkubieren bei Raumtemperatur

15min und wird anschließend 15s bei 10.000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, worauf wiederum das Verwerfen des Filtrats folgt.

Auf diese Säulen werden nun 500µl RPE-Puffer gegeben und 15s bei 10.000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Filtrat wird erneut verworfen. Dieser Vorgang wird wiederholt und beim zweiten Mal 2min lang zentrifugiert. Die Säulen werden in ein neues Eppendorfgefäß gestellt, mit welchem es 1min lang bei maximaler Umdrehung (14.000rpm) zentrifugiert wird. Daraufhin werden die Säulen erneut in ein frisches Eppendorfgefäß gestellt. Auf die Säulen werden jeweils 30µl RNase-freies Wasser gegeben. Im Anschluss werden sie 1min lang bei maximaler Umdrehung (14.000rpm) zentrifugiert. Das Filtrat wird ein weiteres mal auf die Säule gegeben und der letzte Schritt wiederholt.

3.4 Messen der RNA-Konzentration

Mittels eines Nano-Drop-Spektralphotometers wurden Reinheit und Konzentration der RNA bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Dazu wurde jeweils 1µl RNA eingesetzt.

Die RNA wird bei -80°C gelagert.

3.5 RT-PCR:

Die RT-PCR, oder auch Reverse-Transkriptase-PCR, ist ein Verfahren, um spezifische RNA-Sequenzen zu amplifizieren. Das Verfahren weist dabei eine hohe Sensitivität auf. Hierzu wird RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, da RNA nicht direkt als Template in einer PCR eingesetzt werden kann. Das Enzym reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche aus Retroviren gewonnen wird.

Es sollen jeweils 2 μ g RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wird mit folgender Gleichung berechnet, wie viel μ l der RNA-Proben eingesetzt werden müssen um 2 μ g zu erhalten:

$$x = \frac{2\mu\text{g}}{\text{gemessene RNA-Konzentration } [\mu\text{g} / \mu\text{l}]}$$

Hierbei steht x für einzusetzende Menge RNA.

Die RNA, welche durch Chloroformfällung gewonnen wurde, muss nun erst noch einem DNase-Verdau unterzogen werden:

Hierzu werden je 8,75 μ l Probenvolumen eingesetzt. Daher wird zur berechneten RNA Menge die Differenz an Wasser gegeben, um 8,75 μ l zu erhalten.

Anschließend wird folgender Mastermix angefertigt:

DNase-Puffer	1 μ l
DNase	1 μ l
RNase-Inhibitor (40U/ μ l)	0,25 μ l

Zu jeder Probe werden 2,25 μ l Mastermix gegeben. Die Proben inkubieren 1h bei 37°C.

Der DNase-Verdau wird durch Zugabe von 1 μ l 25mM EDTA beendet. Die Proben inkubieren danach 10min bei 65°C.

Für die cDNA-Synthese werden jeweils 11 μ l Probenvolumen eingesetzt. Hinzu kommt jeweils 1 μ l Random-Hexamer-Primer. Anschließend inkubieren die Proben 5min bei 70°C. Währenddessen wird ein Mastermix wie folgt pipettiert:

5xreaction buffer	4 μ l
Ribonuclease Inhibitor	2 μ l
10nM dNTP mix	1 μ l
MuLV Reverse Transcriptase	1 μ l

Pro Probe werden 8µl Mastermix zugegeben. Die Proben inkubieren anschließend 10min bei 25°C, 60min bei 42°C und im Anschluss 10min bei 70°C.

Die cDNA-Proben werden bei -20°C gelagert.

3.6 Primerdesign

Es wurden ausschließlich intronüberspannende Primer mit einer cDNA-Produktgröße zwischen 105bp und 260bp ausgewählt. Dabei sollte der GC-Gehalt in etwa 50% betragen.

Mit folgender Formel kann die Schmelztemperatur T_m berechnet werden:

$$T_m = 4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T) [^{\circ}C]$$

Primer sollten spezifisch hybridisieren. Daher sollten sie nur an einer gewünschten Stelle auf der DNA-Sequenz binden. Um dies zu erreichen, sind häufige Basenwiederholungen oder Pallindrome zu vermeiden. Am 3'-Ende der Primer sollten sich mindestens zwei Basen befinden, welche drei Wasserstoffbrücken ausbilden (G oder C). Zudem sollte überprüft werden, ob die Sequenz oder auch Teile der Sequenz nur einmal auf der DNA binden. Um Primerdimere zu vermeiden, sollte darauf geachtet werden, dass die Primer nicht selbst komplementär zueinander sind. Ebenso sollte das 3'-Ende eines Primers nicht komplementär zum 5'-Ende sein, um eine Haarnadelbildung zu vermeiden.

Die Primer wurden mit Hilfe von primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) und www.roche.de ausgewählt.

3.7 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen.

Hierzu wird die DNA-Matritze zuerst bei hohen Temperaturen denaturiert, damit sich anschließend bei niedrigerer Temperatur Primer an die Einzelstränge anlagern können. Bei einer erneuten leichten Temperaturerhöhung kommen dann DNA-Polymerasen zu einsatz, welche die Primer verlängern und damit den Abschnitt zwischen den Primern syntethisieren. Diese Vorgänge werden in mehreren Zyklen wiederholt. Um die schnellen Temperaturänderungen zu ermöglichen, benötigt man einen Thermozycler. Verwendet wird dabei folgendes Programm:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale	95	5min	1x
Denaturierung			
Denaturierung	95	30s	24x
Annealing	60 bzw. 55	30s	
Elongation	68	30s	
Final Elongation	68	15min	1x

Zu den Proben wurde dazu folgender Reaktionsansatz gegeben:

Wasser	15,0 / 13,75µl
10xReproFast Puffer	2,5µl
dNTPs (1,25mM je dNTP)	4µl
Primer F (10ηm/µl)	0,5µl
Primer R(10ηm/µl)	0,5µl
His-Taq (5U/µl)	0,5µl
DMSO	0 / 1,25µl

Dabei wurden jeweils 2µl cDNA (100ηg) eingesetzt. Die Produkte werden anschließend auf Agarosegele aufgetragen.

3.8 Gelelektrophorese

Bei einer Elektrophorese werden Teilchen je nach Größe, Form oder Ladung aufgetrennt. Hier wird eine Gelelektrophorese mit Agarosegelen in TAE angewandt, bei welcher DNA je nach ihrer Größe aufgetrennt wird.

Dazu wird ein 2%iges Agarosegel in TAE hergestellt. Die Proben werden mit einem Ladepuffer, welcher Bromphenolblau und Cylencyanol enthält, gemischt und aufgetragen. Zudem wird als Standard ein 1kb-Leiter verwendet, wodurch die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden kann. An die Kammer wird eine Spannung von 110-190V, je nach Kammergröße, angelegt. Sind die Proben weit genug gewandert, werden die Gele für etwa 20min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend unter UV-Licht photographiert und ausgewertet.

3.9 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine quantitative Methode zur Bestimmung der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt. Als Template wird cDNA eingesetzt. Zusätzlich werden DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, welche sich in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA einlagern. Durch spezielle Thermozycler, welche die Fluoreszenz der Produkte am Ende eines jeden Zykluses messen, kann die Menge des Produkts bestimmt werden.

Mit dieser Methode ist es folglich möglich die Expression eines bestimmten Gens zu messen. Dafür muss immer auch ein so genanntes Housekeeping-Gene eingesetzt werden, welches in allen Geweben gleich hoch exprimiert wird. Mit diesem werden alle getesteten Gene abgeglichen. In diesem Fall kam als Housekeeping-Gene der Elongationsfaktor-1 α zum Einsatz.

Als Protokoll wurde eine Two-Step-PCR angewandt, da als Template cDNA eingesetzt wurde:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale	95	3min	1x
Denaturierung			
Denaturierung	95	30sec	34x
Annealing	60 bzw. 55	30sec	
Elongation	68	10min	1x
Schmelzkurve	55-95	je 10sec	40x

Zu den Proben wurde folgender Reaktionsansatz gegeben:

Wasser	14,0 / 12,75µl
10xReproFast Puffer	2,5µl
dNTP (5mM)	4µl
Primer F (10ηm/µl)	0,5µl
Primer R(10ηm/µl)	0,5µl
His-Taq (5U/µl)	0,5µl
DMSO	0 / 1,25µl
SybrGreen	0,75µl
Fitc	0,25µl

Für die Gene GAMT und GM2A wurde eine Annealingtemperatur von 55°C mit DMSO verwendet, da dies beim Testen der Primer die besten Ergebnisse ergab. Alle anderen Gene liefen bei 60°C ohne DMSO.

Dabei wurden jeweils 2µl cDNA (100ηg) eingesetzt. Mit den gemessenen Daten kann die relative Expression mit der Formel $2^{\Delta Ct_{Gen}} / 2^{\Delta Ct_{Elf}}$ (Livak, Schmittgen, 2001) errechnet werden. Dabei steht CtGen für die gemessenen Ct-Werte des jeweiligen Gens und CtElf für die Ct-Werte des Housekeeping-Gens Elongationsfaktor-1α.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Messreihen bestimmt. Zudem wurden die Versuche jeweils ein bis

zweimal mit einer unabhängigen cDNA wiederholt. Aus den jeweiligen CT-Werten wurde der Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung bestimmt. Anschließend wurden die Mittelwerte für jedes Gen jeweils auf ein spezielles Gewebe, wie Gehirn, Kieme oder Auge bezogen, wodurch letztendlich die ΔCt -Werte entstanden.

Aus den zusammengehörigen Werten der relativen Expression wurde wiederum ein Mittelwert gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Die Expressionswerte wurden anschließend auf die Vorstufe der Hyperpigmentierung bezogen, so dass diese letztendlich den konstanten Wert 1 besitzt.

4. Ergebnisse

4.1 Histologie

Da unklar war, ob es sich bei dem Lymphom 81 tatsächlich um ein Lymphom handelt, wurde ein histologischer Schnitt des Fischkopfes, an welchem sich der Tumor befand, angefertigt. Die Schnitte wurden von Robin Wacker hergestellt. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei dem Tumor tatsächlich um ein Lymphom handelt, welches reichlich infiltrativ in sämtliche Strukturen des Kopfes und unter anderem des Herzens wächst (Abb. 25 und 26).

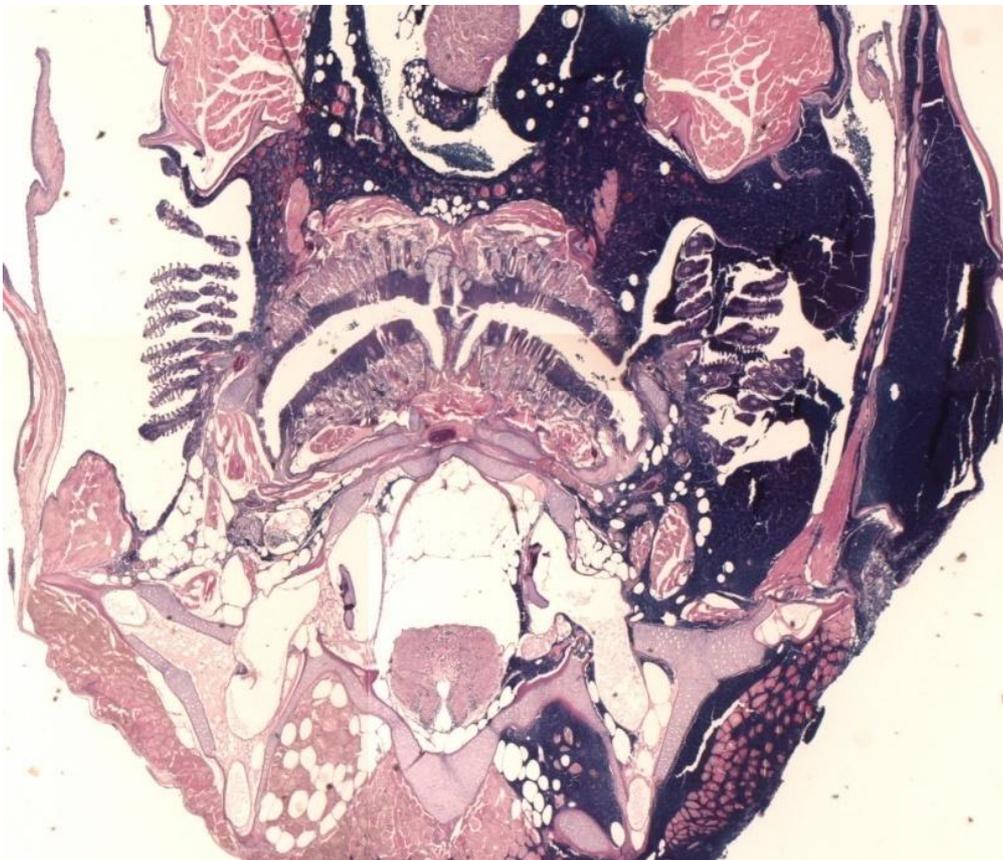


Abb. 25: histologischer Schnitt des Lymphoms 81, Übersicht

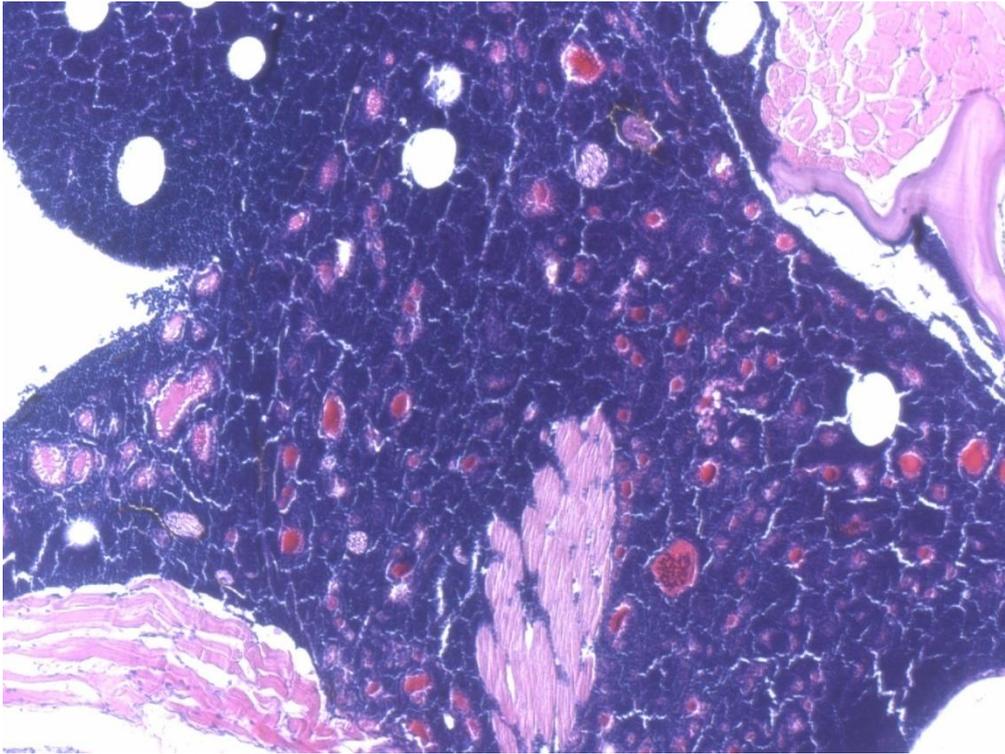


Abb. 26: histologischer Schnitt des Lymphoms 81, Detailaufnahme des Lymphoms; reichlich vaskularisiert mit vereinzelt Nekrosen

4.1 Microarray-Analyse

Der betreffende Microarray wurde in Kooperation des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Universität Marburg hergestellt. Verwendet wurde hierfür RNA aus Melanomen, bzw. hyperpigmentierte Haut des Fisches *Xiphophorus*.

Es wurde ein Oligonukleotid-Microarray angefertigt. Hierzu wurde cRNA mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert und anschließend mit der Sandwichtechnik hybridisiert. Um die Intensitätsunterschiede der einzelnen Spots zu ermitteln wurden MA-Plots mit $M = \log_2 R/G$ und $A = \log_2 \sqrt{R/G}$ genutzt (Dudoit et al., 2002; Yang et al., 2001). Dabei stehen R und G für die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für Cy5 bzw. Cy3 nach Abzug des entsprechenden Hintergrunds.

Ergebnisse des Microarray siehe Anhang.

Folgende Gene wurden aus dem Microarray ausgewählt, da sie für die Tumorforschung interessante Gesichtspunkte bieten:

Tabelle 9: Auszug der Ergebnisse des Microarrays welcher in Kooperation mit dem Institut für Molekularbiologie der Universität Marburg hergestellt wurde.

ID_1	A_mean	W1_a3 X19 Haut(M elanom) 210907	W2_a3 X19 Haut(M elanom) 210907	W1_b3 X20 Melano m(Haut) 210907	W2_b3 X20 Melano m(Haut) 210907	Fold change Melano m/Haut	directi on	UnigeneID	Description
1322(SLC24A5)	11,88	0,03	0,04	0,10	0,10	24,35	up	Ola.6826	Transcribed locus, moderately similar to XP_413812.1 PREDICTED: similar to solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 5 [Gallus gallus]
2904(PDIA4)	10,67	0,30	0,51	0,48	0,88	9,11	up	Ola.2076	
3696(GAMT)	10,81	0,10	0,10	0,10	0,10	8,20	up	Ola.4329	Transcribed locus, moderately similar to NP_036925.1 guanidinoacetate methyltransferase [Rattus norvegicus]
589(GM2A)	11,13	0,58	1,00	0,89	1,00	4,42	up	Ola.5961	Transcribed locus, weakly similar to NP_034429.1 GM2 ganglioside activator protein [Mus musculus]
3621(MAPK3)	10,07	0,52	0,36	0,63	1,00	4,12	up	Ola.2463	Transcribed locus, strongly similar to NP_036082.1 mitogen activated protein kinase 3 [Mus musculus]
2898(RASL11B)	9,48	0,26	0,55	0,64	0,53	3,72	up	Ola.1967	Transcribed locus, weakly similar to NP_001002830.1 RAS-like family 11 member B [Rattus norvegicus]
688(TACC2)	8,65	0,19	0,36	0,48	0,38	3,56	up	Ola.8502	Transcribed locus, moderately similar to NP_006274.1 transforming, acidic coiled-coil containing protein 1 [Homo sapiens]
2832(NID1)	9,89	0,38	0,09	0,10	1,00	3,49	up	Ola.278	Transcribed locus, moderately similar to NP_035047.1 nidogen 1 [Mus musculus]

2876(G6PC)	9,13	0,10	0,06	0,08	0,74	3,42	up	Ola.1378	Transcribed locus, weakly similar to NP_000142.1 glucose-6-phosphatase, catalytic [Homo sapiens]
7518(ZFAND5)	9,17	0,31	0,06	0,24	0,94	3,24	up	Ola.3112	Transcribed locus, weakly similar to XP_533526.1 PREDICTED: similar to Zinc finger A20 domain containing protein 2 (Zinc finger protein 216) isoform 1 [Canis familiaris]

Anmerkung: Rot markierte Werte sind kleiner als 0,1 und entsprechen damit niedriger Qualität. Altrosa Ergebnisse liegen mit 0,1 im Grenzbereich, während grün markierte Werte einer hohen Qualität entsprechen. Die Differenzen zwischen den Replikaten innerhalb eines Sandwiches sollten einen M-Wert von 75% nicht überschreiten. Ebenso sollte die mittlere Intensität A nicht weniger als 7,95 betragen.

4.2 Real-Time Analysen

Mittels der quantitativen Real-Time Analyse sollten die Ergebnisse des Microarrays bei verschiedenen Tumoren getestet werden. Hierfür wurde aus Geweben RNA extrahiert, welche in cDNA umgeschrieben und in die Real-time-PCR eingesetzt wurde.

Als Gewebe fanden Gehirn, Augen, Kiemen, Leber, Milz, Hoden, Haut und Muskel von gesunden Fischen Verwendung. Als pathologische Gewebe wurden Melanome, exophytische Erythroplakome, Hyperpigmentierte Haut und die Vorstufe hyperpigmentierter Haut hinzugezogen.

Auf jeder Platte wurde jeweils immer ein Testgewebe mitgeführt, auf welches die Berechnung der relativen Expression bezogen wurde. Dies war für die Gene G6PC, MAPK3, SPP2 und RASL11B Kieme, SLC24A5 Auge. Alle anderen Gene wurden auf Proben des Gehirns abgeglichen. Um einen Bezug zur Vorstufe der hyperpigmentierten Haut herzustellen, wurde diese bei der nachfolgenden Berechnung im Kontext zu allen Expressionswerten auf 1 gesetzt.

4.2.1 Expression von G6PC

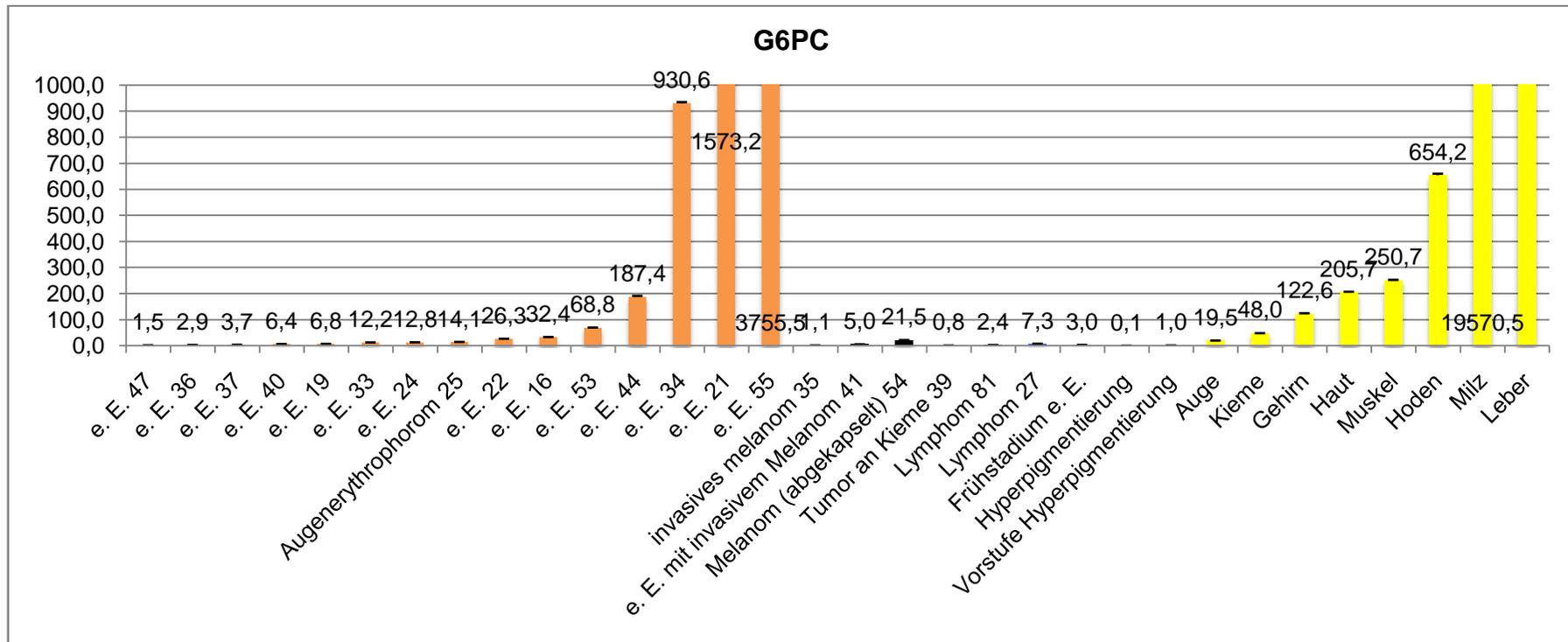


Abb. 14: Expression von G6PC in verschiedenen Geweben

G6PC ist im Frühstadium des Exophytischen Erythroplakoms, bzw. in hyperpigmentierter Haut und dessen Vorstufe sehr viel niedriger exprimiert, als in gesunder Haut, bei welcher die Expression von G6PC gegenüber der Vorstufe der Hyperpigmentierung um das 205-fache gesteigert ist. In den meisten exophytischen Erythroplakomen wird G6PC sehr schwach exprimiert, allerdings etwas mehr, als in der Vorstufe bzw. der Hyperpigmentierung. In den exophytischen

Erythrophoromen 44, 34, 21 und 55 ist G6PC allerdings überexprimiert. In Melanomen und Lymphomen scheint sich die Expression von G6PC nicht wesentlich von der Expression in hyperpigmentierter Haut, bzw. dessen Vorstufe zu unterscheiden, mit Ausnahme des Melanoms 54, welches 21-fach höher exprimiert ist. Besonders hoch ist das Vorkommen an G6PC mit einer ca. 168000-fachen Überexpression in der Leber. Auch in der Milz und in Hoden ist die Expression um das 19570- bzw. 654-fache gesteigert. In Gehirn, Kieme und Auge dagegen ist die Expression zwar weniger als in gesunder Haut, aber mehr als in hyperpigmentierter Haut, bzw. dessen Vorstufe (Abb. 14).

4.2.2 Expression von GAMT

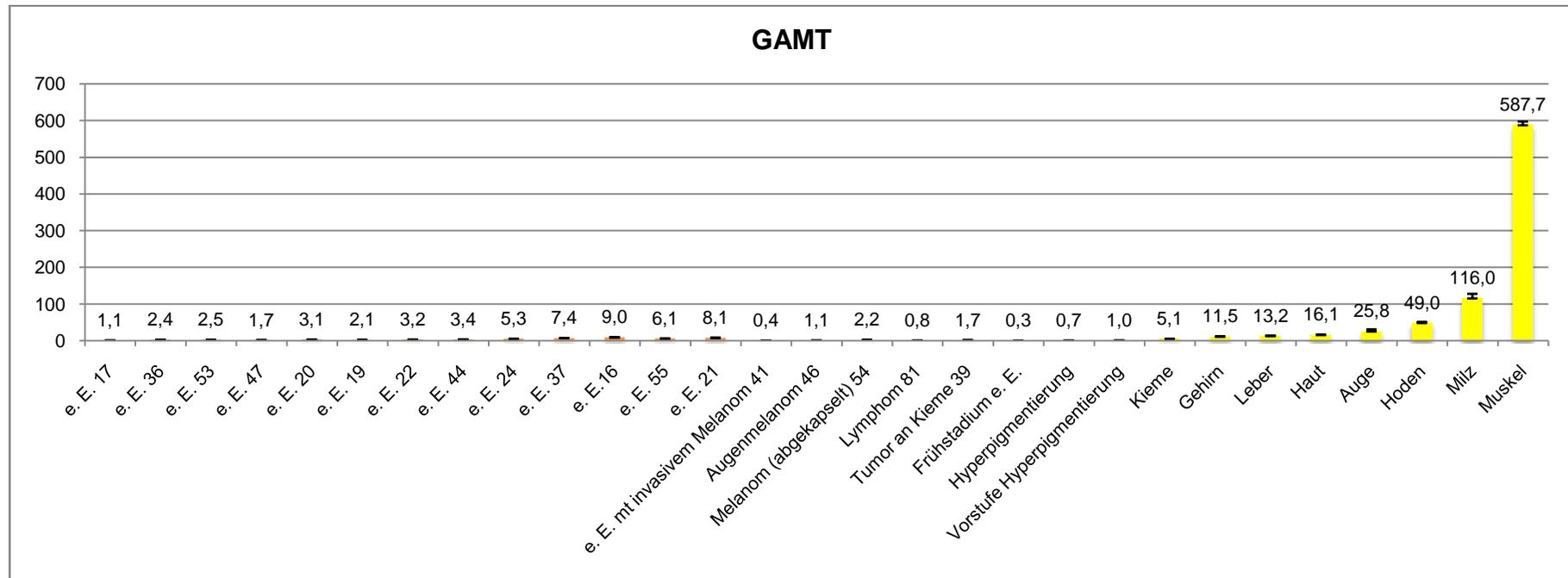


Abb. 15: Expression von GAMT in verschiedenen Geweben

GAMT ist im Frühstadium des exophytischen Erythrophoroms, bzw. in hyperpigmentierter Haut und dessen Vorstufe weniger exprimiert als in gesunder Haut. Hier ist die Expression gegenüber der Vorstufe der hyperpigmentierten Haut um das 16-fache gesteigert. In Lymphomen, Melanome und einer großen Anzahl an exophytischen Erythrophoromen ist die Expression von GAMT nur geringfügig gesteigert. In einigen exophytischen Erythrophoromen scheint die Expression in etwa der der gesunden Haut zu entsprechen, bzw. in den exophytischen Erythrophoromen 16, 15 und 21 scheint sie geringfügig erhöht. Im Muskel

dagegen wird GAMT mit einer 587-fachen Steigerung gegenüber der Vorstufe der Hyperpigmentierung reichlich exprimiert. Weitere Einzelwerte von exophytischen Erythrophoromen und Lymphomen scheinen diesen Trend einer eher niedrigen bis unveränderten Expression im Vergleich zu gesunder Haut zu bestätigen (Abb.15).

4.2.3 Expression von GM2A

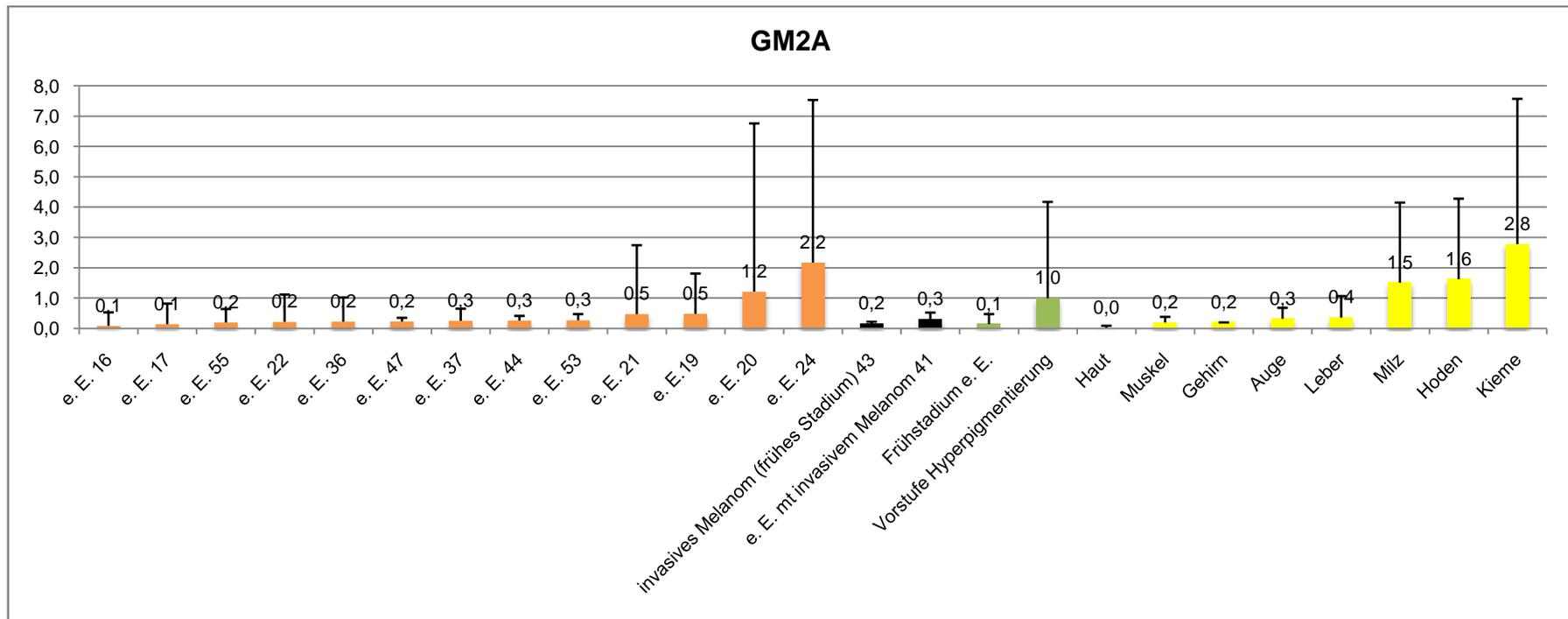


Abb. 16: Expression von GM2A in verschiedenen Geweben

GM2A wird im Frühstadium des exophytischen Erythrophoroms, bzw. in hyperpigmentierter Haut und vor allem dessen Vorstufe höher exprimiert als in gesunder Haut. In der Mehrheit der exophytische Erythrophorome wird GM2A niedriger als in der Vorstufe der Hyperpigmentierung, jedoch höher als in gesunder Haut exprimiert, mit Ausnahme des exophytische Erythrophorom 20, welches in welchem GM2A im gleichen Maße wie in der Vorstufe der Hyperpigmentierung vorkommt, bzw dem exophytischen Erythrophorom 24, bei welchem sich eine zweifach gesteigerte Expression findet. Die Expression von GM2A in Melanomen ist im Vergleich zur Vorstufe der Hyperpigmentierung erniedrigt. In Milz, Hoden findet sich gegenüber der Vorstufe der Hyperpigmentierung eine 1,5- bzw. 1,6-fache Steigerung der Expression und in der Kieme sogar eine 2,8-fache (Abb. 16).

4.2.4 Expression von MAPK3

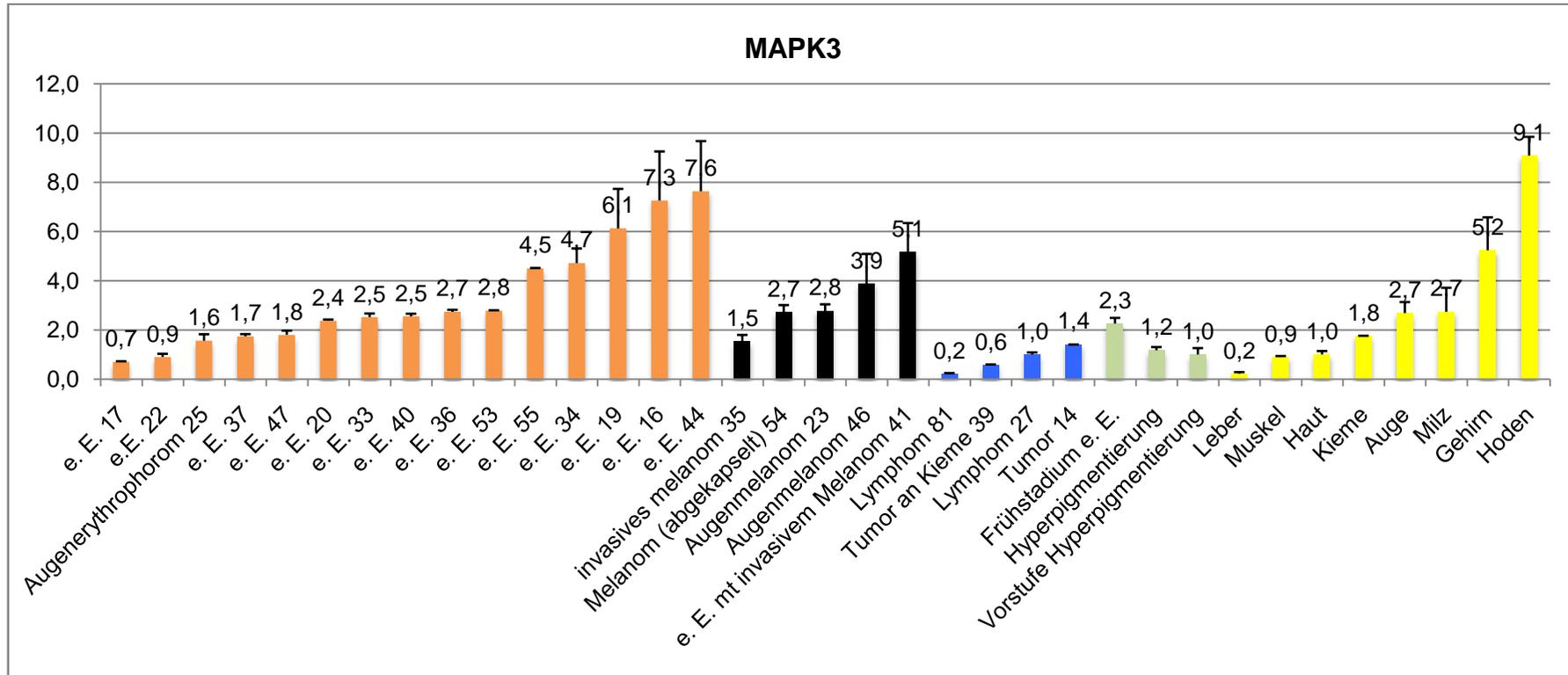


Abb. 17: Expression von MAK3 in verschiedenen Geweben

Die Expression von MAPK3 in gesunder Haut entspricht der Expression im Frühstadium des Exophytischen Erythrophoroms, bzw. hyperpigmentierter Haut und dessen Vorstufe. Im exophytischen Erythrophorom ist dies ebenfalls der Fall, bzw. in einigen Tumoren ist die Expression geringfügig gesteigert. Bei den exophytischen Erythrophoromen 55 und 34 beträgt die

Steigerung sogar das vierfache, bzw. bei dem exophytischen Erythrothorom 19 das sechsfache und bei den exophytischen Erythrothoromen 16 und 44 das siebenfache. Auch die Expression von MAPK3 in den Melanomen ist leicht, bzw. im exophytische Melanom mit invasivem Melanom um das fünffache gesteigert. In Lymphomen ist MAPK3 geringer bis gleich hoch exprimiert wie in gesunder Haut. In Gehirn und Hoden ist MAPK3 fünf- bzw. neunfach höher exprimiert als in der Haut. Auch in Kieme, Auge und Milz ist die Expression leicht erhöht, in Leber und Muskel dagegen leicht erniedrigt (Abb. 17).

4.2.5 Expression von NID1 (1 of 2)

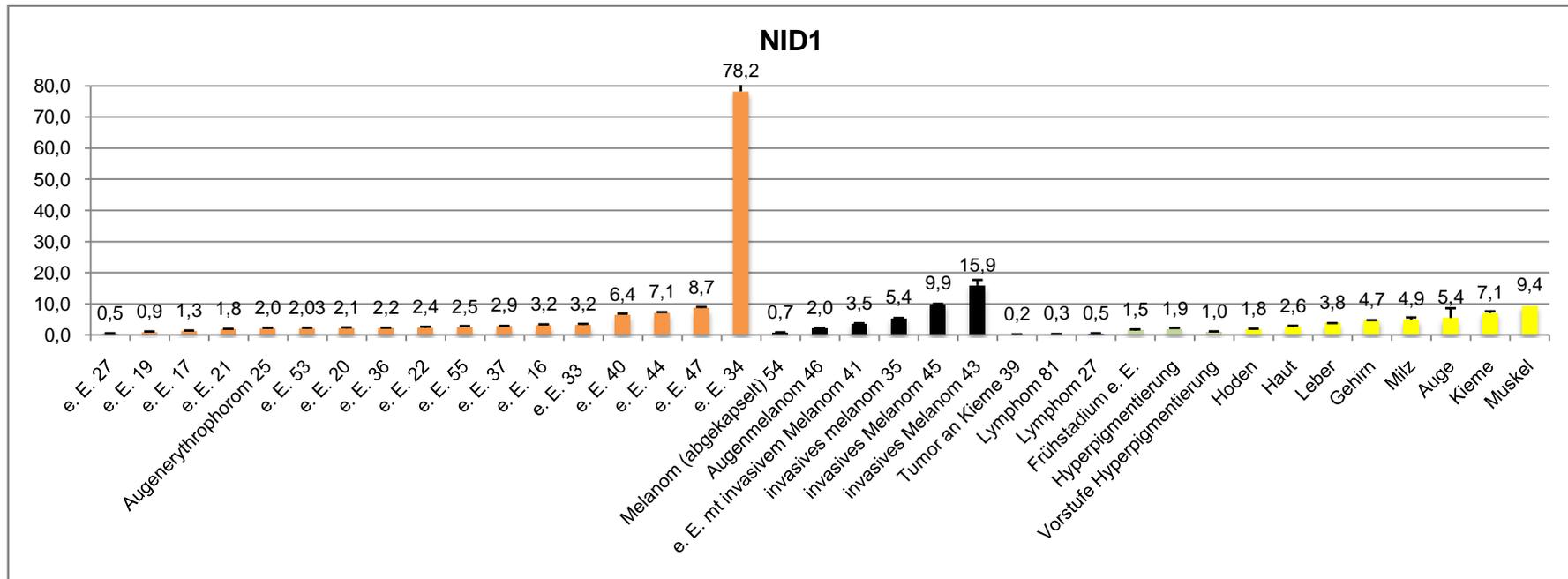


Abb. 18: Expression von NID1 in verschiedenen Geweben

Die Expression von NID1 im Frühstadium des exophytischen Erythrophoroms, bzw. in hyperpigmentierter Haut und deren Vorstufe entspricht in etwa der Expression gesunder Haut bzw. ist geringfügig erniedrigt. Selbes gilt für exophytische Erythrophorome, wobei hier allerdings das exophytischen Erythrophorom 34 mit einer deutlichen 78-fachen Überexpression von NID1 heraussticht. Auch die exophytischen Erythrophorome 40, 44 und 47 sind sechs-, bzw. sieben- und achtfach überexprimiert. In Melanomen ist die Expression gleich, bzw. leicht gesteigert im Vergleich zu gesunder Haut. Hier fallen das

invasive Melanom 35 mit einer fünffachen Steigerung, das invasive Melanom 45 mit einer neunfachen Steigerung und das invasive Melanom 43 mit einer 15-fachen Steigerung auf. In Lymphomen hingegen scheint die Expression erniedrigt, bzw. im Tumor 14 um das 15-fache gesteigert. Im Muskel finden sich auch in gesundem Gewebe mit einer neunfach höheren Expression die höchsten Werte von NID1. Auch in Leber, Gehirn, Milz, Auge und Kieme ist die Expression gegenüber Haut, bzw. der Vorstufe der Hyperpigmentierung leicht erhöht (Abb. 18).

4.2.6 Expression von PDIA4

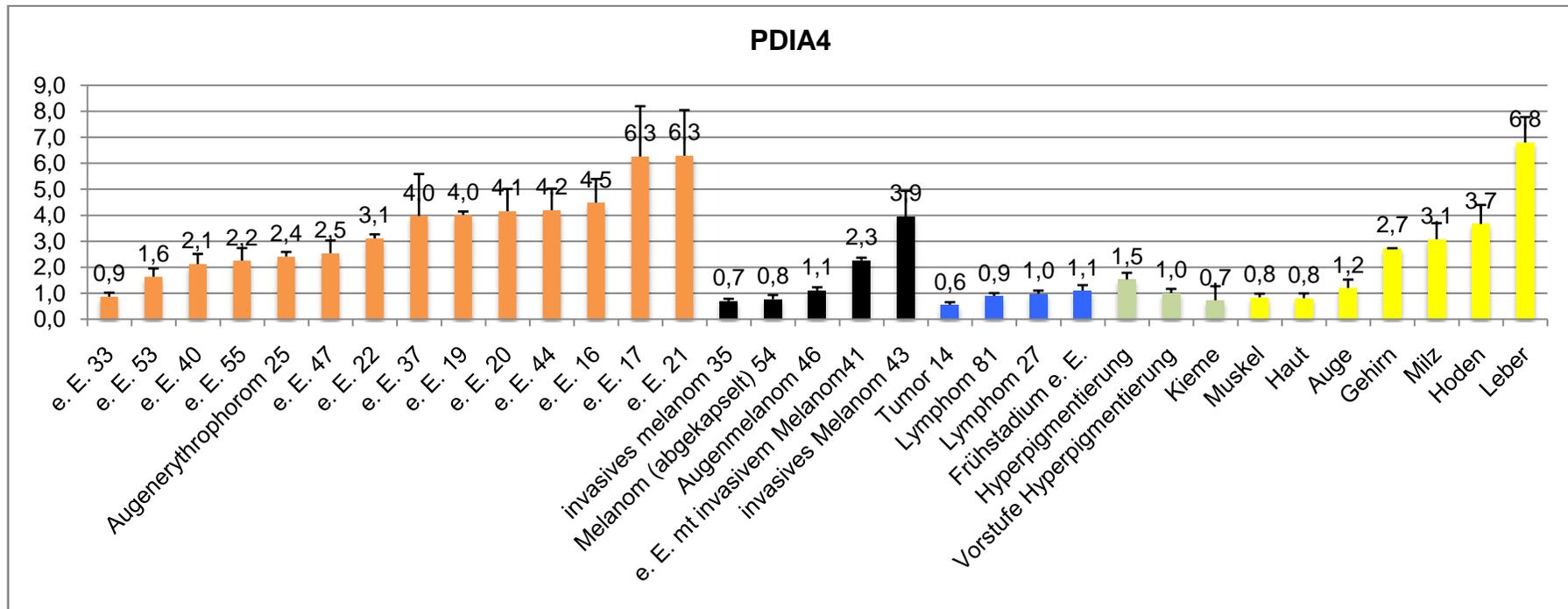


Abb. 19: Expression von PDIA4 in verschiedenen Geweben

Die Expression von PDIA4 im Frühstadium von exophytischen Erythrophoromen, bzw. in hyperpigmentierter Haut und deren Vorstufe verhält sich in etwa gleich wie in gesunder Haut. In exophytischen Erythrophoromen ist die Expression dagegen um das zwei- bis sechs-fache gesteigert. Ähnlich verhält es sich in den Melanomen in welchen die Expression von PDIA4 bis um das dreifache gesteigert ist. Bei den Lymphomen hingegen wird PDIA4 etwas weniger, bzw. gleich hoch exprimiert wie in

gesunder Haut. Vor allem in der Leber wird PDIA4 mit einer sechsfachen Steigerung in den Normalgeweben am höchsten exprimiert. Auch in Gehirn, Milz und Hoden kommt PDIA4 häufiger vor als in der Haut. In Kieme und Muskel dagegen verhält es sich ähnlich wie in der Haut (Abb. 19).

4.2.7 Expression von RASL11B

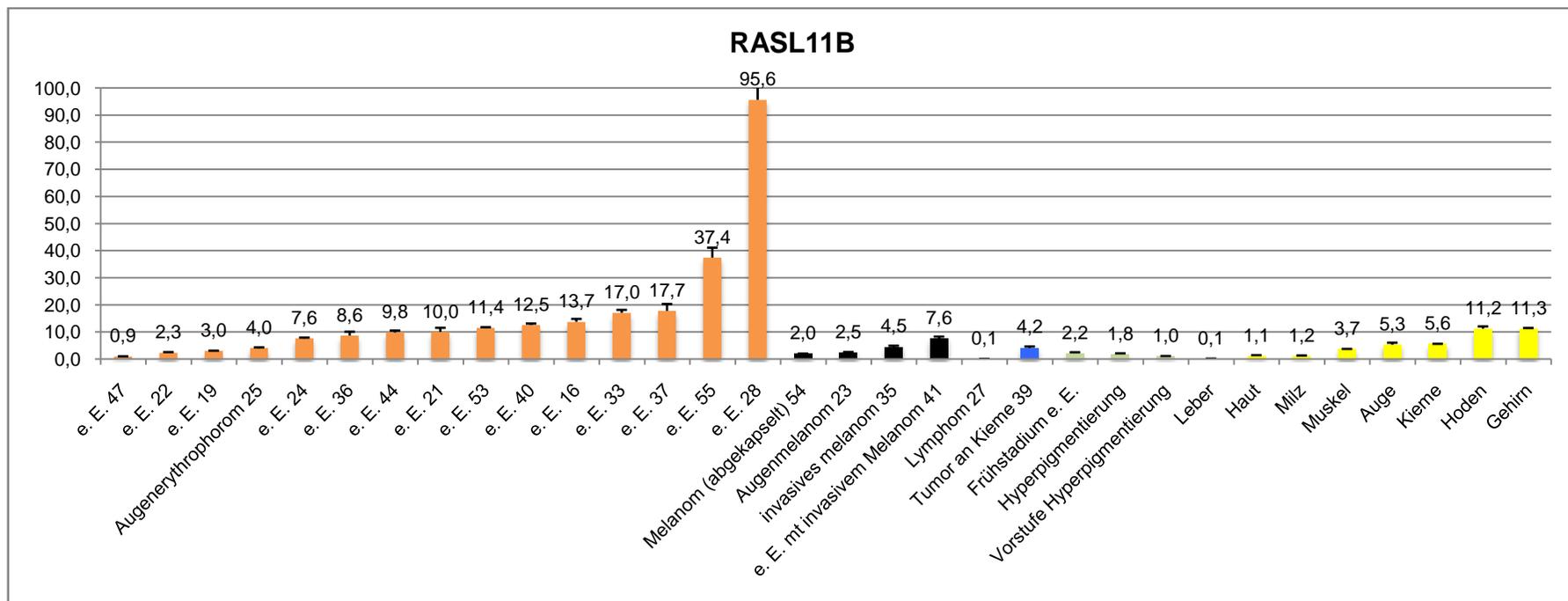


Abb. 20: Expression von RASL11B in verschiedenen Geweben

RASL11B ist im Frühstadium des exophytischen Erythrophoroms, bzw. in hyperpigmentierter Haut und dessen Vorstufe gleich hoch exprimiert wie in gesunder Haut. In Melanomen ist die Expression geringfügig bzw. im invasivem Melanom 35 um das vierfache und im exophytischen Erythrophorom mit invasivem Melanom 41 um das siebenfache gesteigert. Im Lymphom dagegen kommt PDIA4 in geringeren Mengen vor. In exophytischen Erythrophoromen ist RASL11B deutlich höher exprimiert als in gesunder Haut. Dabei findet sich in den meisten exophytischen Erythrophoromen eine sieben- bis 17-fache Steigerung der Expression. Im exophytischen Erythrophorom 55 findet sich sogar eine 37-fache, bzw. im exophytischen Erythrophorom 28 eine 95-fache Steigerung. In Hoden und Gehirn wird RASL11B ebenfalls elffach höher exprimiert als in der Haut. Auch in Milz, Muskel, Auge und Kieme findet sich eine leicht gesteigerte Expression von RASL11B gegenüber der Haut. Lediglich in der Leber sind nur geringe Mengen von RASL11B exprimiert (Abb. 20).

2.4.8 Expression von SLC24A5

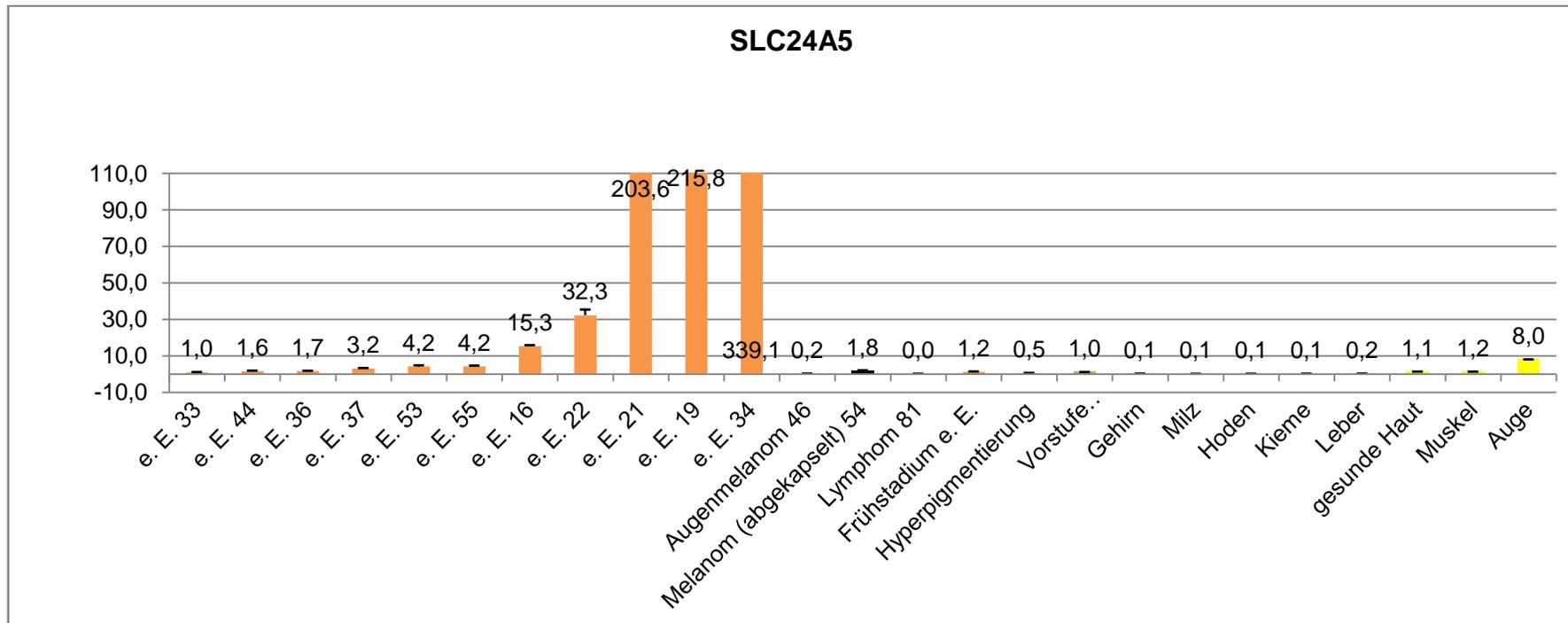


Abb. 21: Expression von SLC24A5 in verschiedenen Geweben

Die Expression von SLC24A5 in Haut, hyperpigmentierter Haut, deren Vorstufe und dem Frühstadium des exophytischen Erythroplakoms unterscheidet sich nicht wesentlich. Selbes gilt auch für Melanome. Bei der Mehrzahl der exophytischen Erythroplakome wird SLC24A5 leicht, bzw. deutlich vermehrt exprimiert, verglichen mit gesunder Haut. Im exophytischen Erythroplakom 16 wird SLC24A5 16-fach, im exophytischen Erythroplakom 22 32-fach, im exophytischen Erythroplakom 21

203-fach, im exophytischen Erythrothrom 19 215-fach und im exophytischen Erythrothrom 34 sogar 339-fach exprimiert. In sämtlichen anderen Organen wird SLC24A5 sehr niedrig exprimiert, außer im Auge. Hier ist die Expression gegenüber der Vorstufe der Hyperpigmentierung um das achtfache gesteigert (Abb. 21).

2.4.9 Expression von SPP1 (Opn)

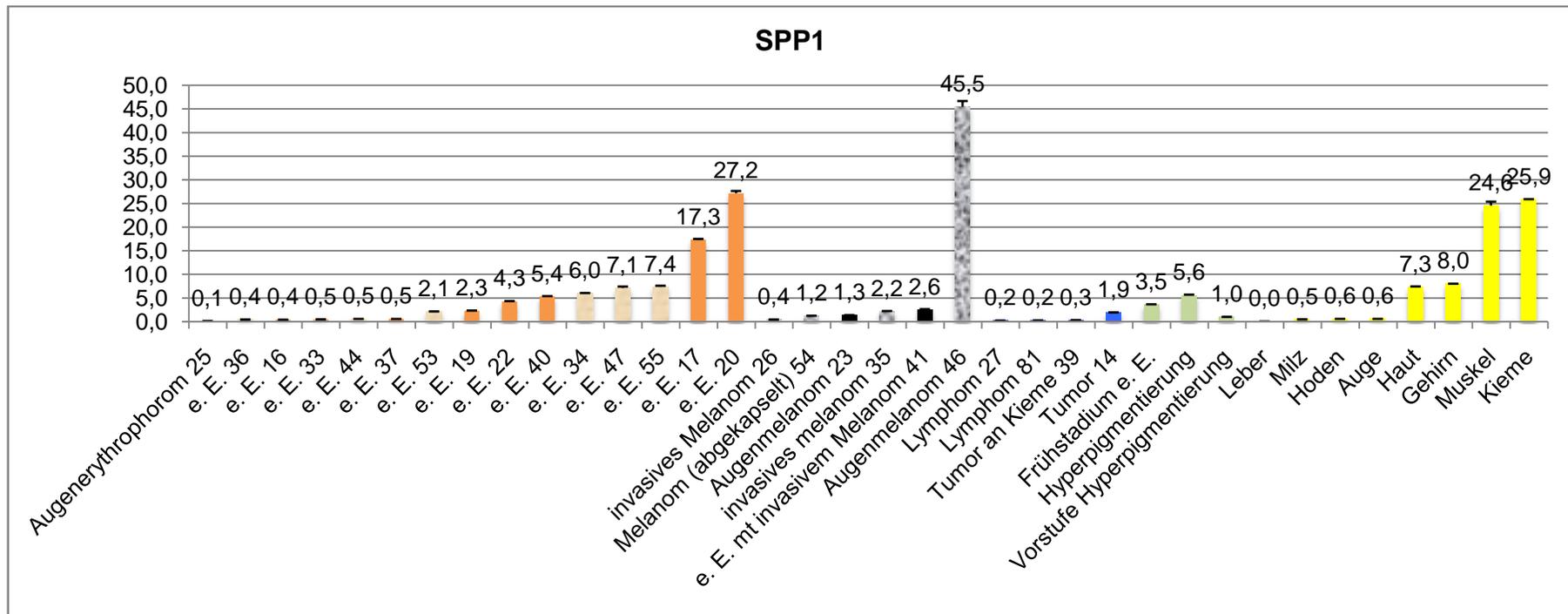


Abb. 22: Expression von SPP2 in verschiedenen Geweben (gemusterte Graphen stehen für p53 -/-)

Die Expression von SPP2 ist im Frühstadium des exophytischen Erythrophoroms und hyperpigmentierter Haut, bzw. deren Vorstufe gegenüber gesunder Haut leicht erniedrigt. In einem Großteil der exophytischen Erythrophorome wird SPP2 etwas niedriger, bzw. gleich hoch exprimiert wie in der Vorstufe der Hyperpigmentierung. Bei den exophytischen Erythrophoromen 22, 40, 34, 47 und 55 ist die Expression um das vier- bis siebenfache gesteigert. In den exophytischen Erythrophoromen 17 und 20 beträgt die Steigerung sogar das 17- bzw. 27-fache. Die Expression von SPP2 in den Melanomen entspricht in etwa der Expression von SPP2 in der Vorstufe der Hyperpigmentierung. Eine Ausnahme bildet hierbei jedoch mit einer 45-fachen Expressionssteigerung das Augenmelanom 46. Die Expression in den Lymphomen hingegen ist dagegen erniedrigt. Im Tumor 14 verhält sich die Expression in etwa wie in der Vorstufe der Hyperpigmentierung. In Muskel und Kieme ist die Expression gegenüber der Vorstufe der Hyperpigmentierung um das 24- bis 25-fache gesteigert, wohingegen die Expression im Gehirn etwa der Haut entspricht. In Leber, Milz, Hoden und Auge dagegen ist die Expression von SPP2 sehr niedrig (Abb. 22).

2.4.10 Expression von TACC2

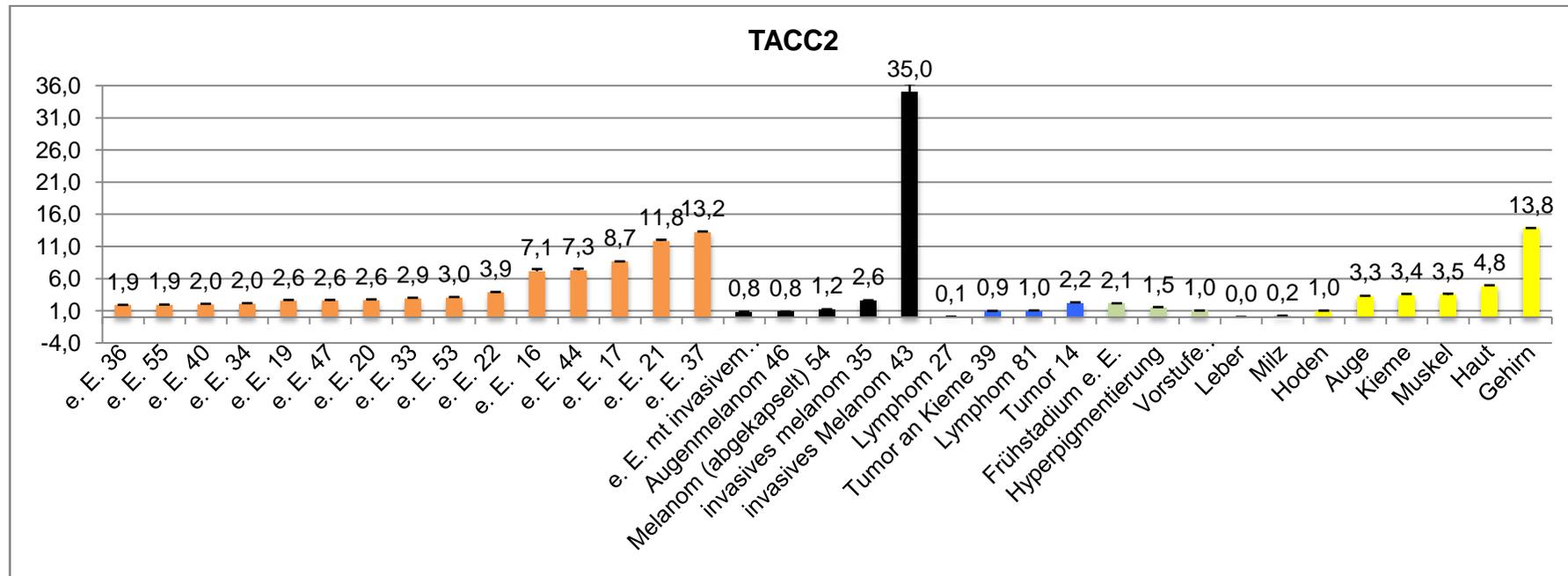


Abb. 23: Expression von TACC2 in verschiedenen Geweben

Die Expression von TACC2 ist in der Haut im Vergleich zur Hyperpigmentierung und dessen Vorstufe, sowie dem Frühstadium des exophytischen Erythroplakoms leicht erhöht. Dabei unterscheidet sich die Expression in den Kontrolltumoren nicht wesentlich von der Vorstufe der Hyperpigmentierung. Auch in den Melanomen ist die Expression nicht verändert, außer im invasiven Melanom 43. Hier ist die Expression um das 35-fache gesteigert. In den exophytischen Erythroplakomen ist die Expression von TACC2 leicht gesteigert. Dies betrifft vor allem das exophytische Erythroplakom 16 und 44 mit einer

siebenfachen Steigerung, das exophytische Erythrothrom 17 mit einer achtfachen Steigerung, das exophytische Erythrothrom 21 mit einer elffachen Steigerung und das exophytische Erythrothrom 37 mit einer 13-fachen Steigerung. Bei den Testgeweben ist die Expression im Gehirn mit einer 13-fachen Steigerung gegenüber der Vorstufe der Hyperpigmentierung am höchsten (Abb. 23).

4.2.11 Expression von ZFAND5 (2 of 2)

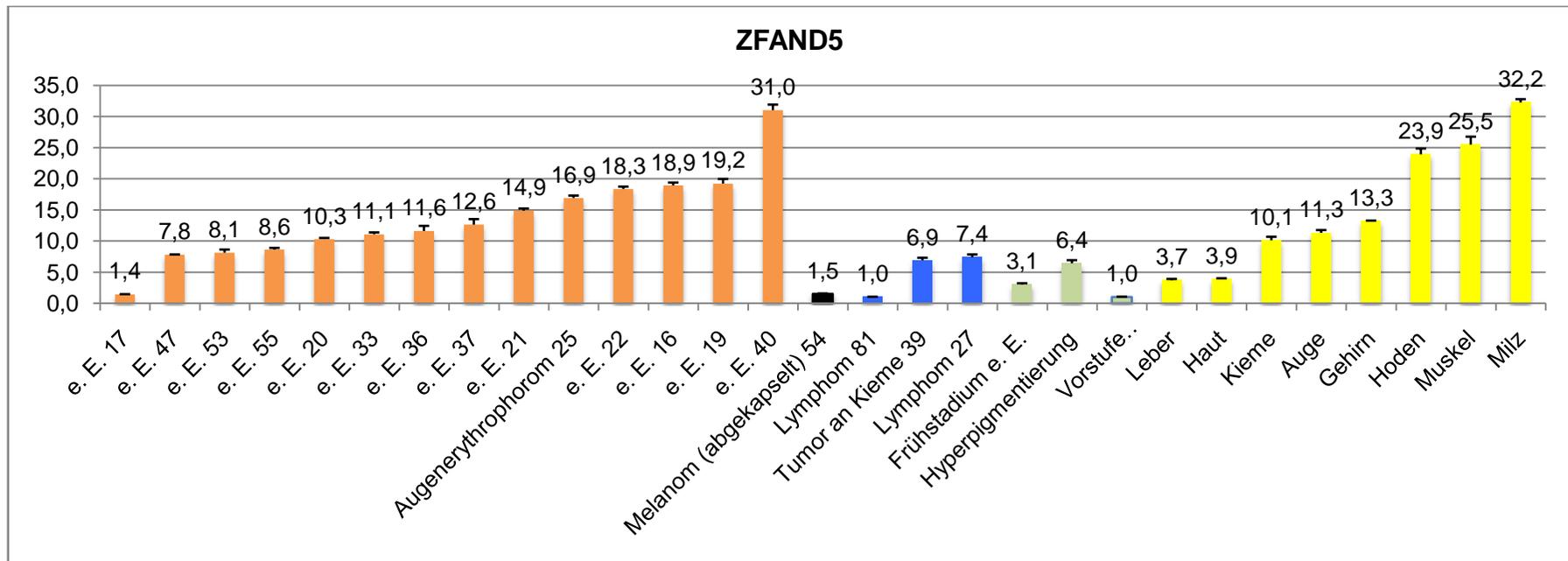


Abb. 24: Expression von ZFAND5 in verschiedenen Geweben

Die Expression von ZFAND5 in der Vorstufe der Hyperpigmentierung ist gegenüber der Hyperpigmentierung erniedrigt. In gesunder Haut und dem Frühstadium des exophytischen Erythrochorom ist die Expression leicht gesteigert. In den Kontrolltumoren verhält sich die Expression wie in der Vorstufe der Hyperpigmentierung, bzw. um das sechs- bis siebenfache gesteigert. Auch im Melanom ist die Expression unverändert. In den exophytischen Erythrochoromen zeigt sich dagegen eine deutliche Steigerung um das acht- bis 19-fache. Im exophytischen Erythrochorom 40 findet sich sogar eine 31-fache Steigerung. In den Normalgeweben findet sich in den Organen Kieme, Auge und Gehirn eine zehnfach bis 13-fach höhere Expression gegenüber der Vorstufe der Hyperpigmentierung. Noch höher ist diese in Hoden und Muskel mit einer 23-, bzw. 25-fachen Steigerung. In der Milz ist die Expression mit einer 32-fachen Steigerung am höchsten (Abb. 24).

5. Diskussion

5.1 Expression von G6PC

Wie erwartet, ist in der Leber der höchste Wert an G6PC zu finden, da hauptsächlich in diesem Organ und unter anderem auch in den Nieren die Gluconeogenese statt findet, für welche G6PC ein essentielles Enzym darstellt. Auch die relativ hohen Werte von G6PC in der Milz sind plausibel, da für Erythrozyten, welche hauptsächlich im Knochenmark und im Kindesalter auch in der Milz gebildet werden, Glucose ein essentieller Energielieferant darstellt.

Schon in der Vorstufe der hyperpigmentierten Haut, so wie dem Frühstadium des exophytischen Erythrophoroms, wird G6PC sehr viel niedriger exprimiert, als in gesunder Haut. Selbes gilt auch für sämtliche Tumorgewebe. Dies deutet darauf hin, dass Tumore, trotz einem deutlich erhöhten Energiebedarf, welcher hauptsächlich durch Glucose gedeckt wird (Warburg, 1920), die Fähigkeit zur Gluconeogenese verlieren, was folglich bedeutet, dass Tumore auf Energielieferanten aus dem Organismus angewiesen sind. Hierzu passt auch die These von Warburg (1925), dass Tumore ihren Energiebedarf lediglich über zwei Mechanismen decken: durch Atmung und Gärung. Dabei werden während der Atmung organische Stoffe zu Wasser und Kohlenstoffdioxid verbrannt, während bei der Gärung aus Glucose Laktat entsteht. Warburg zeigte, dass die Aufnahme von Glucose in Tumoren immens gesteigert ist. Folglich werden aus 100cc Blut im Tumor durchschnittlich 57g Glucose resorbiert, während im gesunden Gewebe nur 2-16g Glucose aufgenommen werden.

Da in Tumoren häufig Sauerstoffmangel herrscht, scheint dies auch ein plausibler Grund zu sein, weshalb die sauerstoffabhängige Gluconeogenese vermieden wird. Daher wird auch ein Großteil der Glucose, statt über die Glycolyse abgebaut zu werden, zu Laktat vergärt, um Sauerstoff einzusparen. Lediglich in drei Tumoren wurde G6PC sehr viel höher exprimiert, als in gesunder Haut. Hier wäre eine adäquate Sauerstoffversorgung durch eine gute Vaskularisierung ein möglicher Grund zur Gluconeogenese.

Da die Expression von G6PC in Lymphomen ebenfalls stark herabreguliert wird, kann angenommen werden, dass G6PC nicht durch Xmrk beeinflusst wird, sondern eine physiologische Reaktion auf den Metabolismus der Tumorzelle darstellt.

5.2 Expression von GAMT

Die Expression von GAMT ist im Muskel mit Abstand am höchsten. Dies ist nicht verwunderlich, da GAMT ein essentielles Enzym der Kreatinsynthese darstellt, welches die Vorstufe des Kreatinins ist und dieses wiederum ein bedeutender Energiezwischenspeicher im Muskel.

Vor allem in hyperpigmentierter Haut, deren Vorstufe und dem Frühstadium des exophytischen Erythrophorom, ist die Expression von GAMT erniedrigt. Dies deutet auf einen erhöhten Energiebedarf hin, da Energie in Form von ATP nicht als Kreatininphosphat zwischengespeichert wird, sondern damit direkt verbraucht werden kann. Eine ähnliche Situation lässt sich bei der Tumorkachexie beobachten. Hier wird Energie in jeglicher Form verbraucht und somit auch Muskelmasse abgebaut (Fearon et. al 2008). Daraus resultieren erniedrigte Kreatininwerte.

Die mangelhafte Speicherung von Energie deutet schon, ähnlich wie bei der G6PC, darauf hin, dass diese Tumore absolut auf Glucosezufuhr als Energiequelle angewiesen sind.

Mit einer reduzierten Kreatinsynthese durch einen Mangel an GAMT wird gleichzeitig die Aminosäure Methionin eingespart, welche für die Synthese des Kreatins aus Guanidinoacetat nötig ist. Methionin ist ein essentieller Bestandteil der Proteinbiosynthese, da Proteine immer mit dem einheitlichen Startcodon *AUG* beginnen. Dies ist für die vermehrte Wachstums- und Teilungsrate von Tumorzellen sicherlich nicht unerheblich, da somit eine gesteigerte Proteinbiosynthese möglich ist.

Die exophytischen Erythrophorome 37, 17, 55 und 21, in welchen GAMT ähnlich hoch wie in gesunder Haut exprimiert wird, besitzen völlig unterschiedliche Massen. Daher kann man nicht von der Größe des Tumors auf die Höhe der GAMT-Expression schließen.

Da die Expression von GAMT in Lymphomen, ähnlich wie in einigen Tumoren, herabreguliert wird im Vergleich zu gesunder Haut, kann angenommen werden, dass GAMT Xmrk-unabhängig exprimiert wird.

5.3 Expression von GM2A

GM2A wird in sämtlichen Geweben exprimiert. Aber vor allem in Kieme, Hoden und Milz wurden hohe Werte gefunden. Dies wird zum Teil auch durch Ergebnisse von Yamanaka bestätigt, welcher vor allem in Hoden und Nieren der Maus eine außerordentlich hohe Expression von GM2A fand (Yamanaka et al. 1994).

Das Gangliosidaktivator-Protein GM2A bindet GM2, ein Glycosphingolipid, welches dann mit Hilfe der Hexosaminidase A zu GM3 abgebaut wird. Ganglioside gehören zu den Tumormarkern TAA-Klasse-III (Tumorassoziierte Antigene). Dabei stellt den eigentlichen Tumormarker das LSA (lipidgebundene Sialinsäure) dar. Diese ist zu 98-99,5% an Proteine gebunden, der Rest dagegen an Lipiden und dabei hauptsächlich an Ganglioside. Tumorzellen bilden auf ihrer Oberfläche vermehrt Ganglioside, da diese zur Metastasierung notwendig sind aber auch verhindern, dass die Tumorzellen vom Immunsystem eliminiert werden. Dadurch resultiert ein erhöhter LSA-Spiegel im Serum, der nachgewiesen werden kann. LSA gehört folglich zu den nicht-gewebespezifischen Tumormarkern.

Da GM2A Ganglioside bindet und aus der Membran entfernt, ist es denkbar, dass durch die vermehrte Expression vom GM2A der Serumspiegel des LSA in Form von GM3 steigt und damit auch die Eigenschaft also Tumormarker erklärt. Des Weiteren erfasste Seifert 1966 GM3 als Hauptgangliosid in Meningeomen.

Dies scheint also auch auf exophytische Erythrophone und Melanome zuzutreffen, da hier und auch bereits in der Vorstufe der Hyperpigmentierung GM2A höher exprimiert wird als in gesunder Haut. Tumormarker sind mittels RT-PCR schon ab 10^3 Tumorzellen nachweisbar (Neumaier, 2005). Allerdings ist dies in der Klinik für die Krebsfrüherkennung eher weniger von Nutzen, da durch sämtliche Einflüsse, wie Entzündungen, Nikotinkonsum oder Gravidität, der Spiegel von Tumormarkern beeinflusst wird (Meden, 2006).

Einzelwerte über die Expression von GM2A in Lymphomen zeigen eine sehr niedrige Expression, welche mit der Expression von GM2A in gesunder Haut korreliert. Dies deutet darauf hin, dass GM2A Xmrk-abhängig hochreguliert wird.

5.4 Expression von MAPK3 (ERK1)

Die relativ hohen Expressionswerte von MAPK3 im Hoden lassen sich dadurch erklären, dass dort durch die Spermatogenese eine relativ hohe Zellteilung stattfindet. Da MAPK3 im Zellzyklus durch die Regulation der Expression von Cyclin D1, einem Protein, welches eine Schlüsselrolle im Zellzyklus besitzt, eine immens wichtige Rolle spielt, ist dies also nicht verwunderlich (Welsh et al., 2002).

Dass MAPK3 (ERK1) in den Zellen des exophytischen Erythrophone und Melanoms höher exprimiert wird als in gesunder Haut, ergibt durchaus einen Sinn, da MAPK3, nachdem es aktiviert wurde, in den Zellkern wandert und dort Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Diese lagern sich dann, zusammen mit anderen Proteinen, an regulatorische Sequenzen der DNA an und beeinflussen somit Wachstum, Differenzierung und Entwicklung der Zelle (Schenk, Snaar-Jagalskar, 1999). Da Tumorzellen eine gesteigerte Proliferation zeigen, ist auch eine höhere Transkriptionsrate nötig, die so unter anderem erreicht werden kann.

Aktiviertes ERK1/2 findet allerdings auch im Zytoplasma eine Menge von Substraten. Hierzu zählen unter anderem Membranproteine, Kernproteine,

Proteine des Zytoskeletts und diverse Proteinkinasen (Roux, Blenis, 2004). So konnte Lee 2004 nachweisen, dass die erythropoetin-abhängige Zelldifferenzierung von embryonalen Stammzellen zu Astrozyten mit einer Aktivierung der ERK-Kinase assoziiert ist.

Des Weiteren moduliert ERK die Aktivität des Transkriptionsfaktors MITF, welcher wiederum die Expression des antiapoptotischen Protein Bcl-2 reguliert und damit das Überleben von Melanomzellen induziert (MCGill et al., 2002).

ERK scheint ebenso ein Rolle bei der Metastasierung zu spielen (Hsu et al. 2006, Zayzafoon et al. 2004).

Zusammenfassend betrachtet führt eine Überexpression an MAPK3 (ERK1) folglich zu vermehrtem Wachstum, Zelldifferenzierung und Metastasierung.

Da die Expression von MAPK3 in Lymphomen sich nicht bedeutend von der Expression in gesunder Haut unterscheidet, kann angenommen werden, dass die Expression von MAPK3 von Xmrk reguliert wird. Dies bestätigt frühere Befunde von Wellbrock und Scharl (2001). Sie zeigten, dass die RAS/RAF/MAPK-Kaskade durch Xmrk initiiert wird. Die erhöhte Expression auf Proteinebene ist offensichtlich auf eine feedforward-Autoregulation zurück zu führen.

5.5 Expression von NID1

Entactin bindet an Laminin, Kollagen und andere bioaktive Matrixmoleküle der Basalmembran und spielt damit eine Rolle in der Zelladhäsion (Yamada, 1992). So wird eine Erkennungssequenz für ein Integrin, welches bei der Adhäsion von Mamakarzinomzellen eine Rolle spielt, auf der Entaktinsequenz diskutiert (Chakravarti, 1990). Dabei führten Entaktin-Antikörper zu einer geringeren Zelladhäsion. Dies deutet daraufhin, dass eine niedrigere Expression von NID1 zu einer verminderten Zelladhäsion führen würde und damit einen Tumor zu invasivem Wachstum und Metastasierung befähigen könnte. Allerdings trifft eine niedrigere NID1-Expression nur für sehr wenige Tumore in dieser Studie

zu, während die Mehrheit der Tumore NID1 in gleichem Maße, wie gesunde Haut exprimiert, bzw. in einigen ist die Expression gesteigert, gegenüber gesunder Haut. Vor allem für die exophytischen Erythrophorome kann somit nicht invasives Wachstum bestätigt werden. Allerdings müssen Zellen, welche aus einem Zellverband abwandern die Fähigkeit ausbilden, an Extrazellulärmatrix zu binden, um zu metastasieren, zB. eine Bindung an Zelladhäsionsmoleküle von Endothelzellen bei hämatogener Metastasierung (Wagener, 1999). Da Entactin eben auch mit der Extrazellulärmatrix in Verbindung steht, könnte ergo die teilweise höhere Expression von NID1 in einigen Tumoren erklärt werden.

Auffallend ist die niedrige Expression von NID1 in den nicht durch Xmrk induzierten Tumoren. Im histologischen Schnitt des Lymphoms 81 ist ein enorm invasives Wachstum zu erkennen. Dies spricht dafür, dass eine niedrige Expression von NID1 mit einem invasivem Wachstum korreliert. Da in den Lymphomen die Expression gegenüber den anderen Tumoren auffallend niedrig ist, kann angenommen werden, dass Xmrk die Expression von NID1 beeinflusst.

Zhou zeigte 1993 dass Entactin auch eine wichtige Rolle im Immunsystem übernimmt. Es aktiviert den respiratorischen Burst in Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten, wodurch diese Antikörper gegen LRI (leukocyte response integrin) und IAP (integrin-associated protein) bilden. IAP wiederum, welches dieselbe Funktion wie das LRI besitzt, wird von Blasenkrebszellen exprimiert, um eine Phagozytose durch Makrophagen zu vermeiden (Chan, 2009). Daher wäre eine niedrige Expression von NID1 für Tumorzellen eher günstig.

Des Weiteren spielen die Bestandteile der Basalmembran eine Rolle in der Zelldifferenzierung, wie in der Differenzierung von Muskelzellen (Flöttmann, 2011). Hierzu passt das Ergebnis der relativ hohen Expression an NID1 im Muskel.

5.6 Expression von PDIA4

Die relativ hohe Expression von PDIA4 in der Leber ist nicht weiter verwunderlich, da die Leber als größtes Stoffwechselorgan eine große Menge an Proteinen synthetisiert, bzw. umbaut und daher auch eine größere Anzahl an Chaperonen zu korrekten Faltung der Proteine benötigt.

PDIA4 wird in Melanomen und vor allem in exophytischen Erythrophenomenen deutlich höher exprimiert, als in gesunder Haut. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Tumore eine vermehrte Stoffwechselaktivität mit einer erhöhten Teilungsrates aufweisen. Dadurch findet eine gesteigerte Proteinbiosynthese statt, um das Wachstum zu ermöglichen. Um die neu synthetisierten Proteine zu falten, sind wiederum Chaperone nötig. Dies bestätigte Li et al. 1991. Bei einer kompetitiven Hemmung von PDIA4 wird das Zellwachstum verringert.

Dass die Expression in Melanomen im Durchschnitt nicht so hoch ist, wie in exophytischen Erythrophenomenen, könnte sich dadurch erklären lassen, dass das Größenwachstum von exophytischen Erythrophenomenen exzessiver ausgeprägt ist als, bei Melanomen. Dabei scheint die Expression von PDIA4 in Xmrk-unabhängigen Lymphomen sich nicht von der Expression in gesunder Haut zu unterscheiden. Also kann vermutet werden, dass der Effekt der höheren Expression von PDIA4 Xmrk-abhängig auftritt.

5.7 Expression von RASL11B

Die etwas höhere Expression von RASL11B im Gehirn und Hoden bestätigen das Ergebnis von Stolle et al. 2007. Sie fanden die höchsten Expressionswerte von RASL11B unter anderem in menschlichem Uterus, Hoden, Gehirn, Nieren, Makrophagen und der Plazenta.

Stolle et al. zeigte ebenfalls, dass sich die Expression von RASL11B gegensätzlich zu dem sehr ähnlichen Gen RASL11A verhält. Dies zeigte sich in Makrophagen, in welchen sich eine Hoch-Regulation in RASL11B ergab, während in RASL11A eine Herab-Regulation zu finden war. Louro et al. fand 2004 eine erniedrigte Expression von RASL11A in Prostatatumorzellen. Das

hier ermittelte Ergebnis der Überexpression von RASL11B in den Tumorzellen des exophytischen Erythrophoroms und des Melanoms könnte auch auf Makrophagen in der Tumorbiopsie zurückzuführen sein, da Tumore für das Immunsystem einen Entzündungsherd darstellen und damit vermehrt Makrophagen vorhanden sind.

GTPasen vermitteln Signale mit mitogener Wirksamkeit (Wrba, 2001, S.158). Dies bestätigen im Prinzip die hohen Expressionswerte von RASL11B in exophytischen Erythrophoromen und Melanomen, da ein vermehrtes Wachstum auch eine erhöhte mitogene Aktivität benötigt.

Es besteht ein Zusammenhang zwischen Tyrosinkinase RAS-Proteinen. So steigt die Konzentration an der GTP-bindenden Form von RAS-Proteinen nach Bindung von Wachstumsfaktoren an den Tyrosinkinase-Rezeptor an (Wagener, 1999). Dies bestätigt die Vermutung, dass RASL11B durch Xmrk angeschaltet wird, was sich durch die hohe Expression von RASL11B in exophytischen Erythrophoromen, gegenüber der niedrigen Expression in Xmrk-unabhängigen Lymphomen, zeigt.

Die Expression an RASL11B in exophytischen Erythrophoromen ist deutlich höher, als in Melanomen. Dies lässt sich dadurch begründen, dass exophytische Erythrophorome eine deutlich größere Masse, als Melanome aufweisen. Dadurch benötigen exophytische Erythrophorome eine höhere Zellteilungsrate und damit auch mehr Mitosen und eine größere Menge an RASL11B.

5.8 Expression von SLC24A5

Die relativ hohe Expression von SLC24A5 in Auge und Haut, gegenüber sonstigen Organen, war zu erwarten. Dies zeigte Lamason et al. 2005, indem sie in Haut und Augen eine zehnfach höhere Expression, als in den übrigen Geweben fand. Ebenso fand sie in Melanomen der Maus eine 100-fach höhere Expression an SLC24A5, als in gesunder Haut. Eine derart hohe Expression konnte für Melanome in Medakas nicht nachgewiesen werden, wobei die

Auswahl an Melanomen mangels RNA stark eingeschränkt war. Dafür konnten in einigen exophytischen Erythrophoromen extrem hohe Mengen an SLC24A5 festgestellt werden.

Auch hier spricht wieder einiges für eine Aktivierung von SLC24A5 durch Xmrk, da in den Xmrk-unabhängigen Lymphomen die Expression von SLC24A5 vollständig ausbleibt.

SLC24A5 begünstigt letztendlich einen Calciumeinstrom. Dies führt in Melanosomen zu einer Beeinflussung der Melaninbildung und der Morphologie der Melanosomen, sowie der Aktivierung der Tyrosinase, mit welcher die Melaninbildung eingeleitet wird (Lamason et al. 2005). Also führt eine höhere Expression von SLC24A5 zu einer vermehrten Melaninsynthese. Nun hat Melanin die Eigenschaft 99,9% der UVA- und UVB-Strahlung des Sonnenlichts in Wärmeenergie umzuwandeln, was einen präventiven Einfluss auf die Hautkrebsentstehung hat (Meredith 2004). Allerdings könnte man auch argumentieren, dass vermehrtes Wachstum von pigmentierten Hautzellen auch eine vermehrte Synthese von Melanin benötigt. So fanden Klingmüller und Schmöckel 1971 in Melanomzellen frei im Zytoplasma liegende „Enzymketten aus wechselständigen Granula“, welche typisch für Prämelanosomen sind. Nun wurde vermutet, dass diese ursprünglich von einer Vesikelmembran umschlossen war. Dies spricht für eine übermäßige Melaninsynthese. Zudem zeigte Schachtschabel 1971, dass zwischen der Melaninsynthese und der Zellproliferation ein Zusammenhang besteht. Seinen Beobachtungen nach stieg der Melaningehalt mit zunehmender Zelldichte und verminderter Vermehrungsgeschwindigkeit stark an.

Neuere Studien haben ergeben, dass Calciumpumpen mit der Tumorprogression im Zusammenhang stehen. So scheint die Menge an Calciumtransportern in verschiedenen Tumorgeweben im Vergleich zu gesundem Gewebe abzuweichen. Dabei sind je nach Transporter Überexpressionen aber auch verringerte Expressionen zu finden. Dies hat für die zelluläre Signalweiterleitung, beispielsweise in Kern, Mitochondrien oder ER, weitreichende Folgen. Somit können Transkription, Translation und

Apoptose für einen Tumorstoffwechsel bedeutend verändert werden (Lee et al, 2011).

5.9 Expression von SPP1 (Opn)

Die Expression von SPP1 scheint in einigen exophytischen Erythrophenomenen, Melanomen und vor allem den Lymphomen, gegenüber gesunder Haut, erniedrigt zu sein. Dies bestätigt die These von Morimoto et al. 2002, nach welcher sich in der Promotorregion des SPP1 eine p53-Bindungsstelle befindet. Hierdurch soll letztendlich eine Hemmung des Tumorwachstums erreicht werden. Auffallend ist, dass die meisten exophytischen Erythrophenome, in welchen SPP1 herabreguliert ist, kein funktionsfähiges p53 vorhanden ist, wohingegen in den beiden exophytischen Erythrophenomen, mit einer Überexpression von SPP1, p53 vorhanden ist. Dies spricht dafür, dass die Expression von SPP1 durch p53 induziert wird. So scheint also p53 durch SPP1 das Tumorwachstum zu hemmen, womit eine niedrige Expression von SPP1 das Tumorwachstum verstärkt. Allerdings scheint dies in den exophytischen Erythrophenomen 17 und 20 fehlgeschlagen zu haben, da bei beiden Tumoren eine Überexpression von SPP1 vorliegt. Dieser Verdacht wird auch durch die relativ kleine Masse beider Tumore bestätigt. Eine Überexpression von SPP1 in Tumoren scheint nicht selten zu sein. So fand Schneider et al. 2004 in nicht-kleinzelligen Lungekarzinomen eine 20-fach höhere Expression von SPP1, gegenüber gesundem Lungengewebe. Auch andere Studien fanden eine erhöhte Expression von Osteopontin in Melanomen (Zhou et al. 2005). Zhou bestimmte die Expression mittels Microarrays. Möglicherweise ergeben unterschiedliche Techniken von Zellaufbereitungen zur Bestimmung der Expression, unterschiedliche Ergebnisse.

Osteopontin kann an das IGFBP-5 (insulinlike growth factor-binding protein-5) binden und somit die Proliferation stimulieren. Ebenfalls wirkt es antiapoptotisch (Denhardt et al. 2001). Auch dies erklärt eine höhere Expression von SPP1 in Tumoren.

Die Regulation von SPP1 scheint von Xmrk abhängig zu sein, da die Expression von SPP1 in Xmrk-unabhängigen Lymphomen deutlich stärker herabreguliert ist, als in Xmrk-induzierten Tumoren.

Osteopontin spielt auch eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen. So steigt die Menge an mRNA im Rattenhippocampus nach einer Ischämie stark an. Anschließend wandern Makrophagen ein (Lee et al. 1999). Giachelli et al. zeigte wiederum 1998, dass gegen Osteopontin gerichtete Antikörper das Einwandern von Makrophagen verhindern. Demnach wäre eine niedrige Expression von SPP1 für Tumore sinnvoll, um nicht vom Immunsystem phagozytiert zu werden.

5.10 Expression von TACC2

Die relativ hohe Expression von TACC2 im Gehirn ist nicht überraschend. Dies zeigte bereits eine Studie von Schuendeln et al. 2004.

Auffallend ist, dass die Expression von TACC2 gerade in frühen Stadien, wie der Hyperpigmentierung, deren Vorstufe und dem Frühstadium des exophytischen Erythrophoroms, gegenüber gesunder Haut, herab reguliert ist, während die Expression in den späteren Stadien der Tumore wieder zunimmt. Also scheint TACC2 vor allem in der frühen Phase der Tumorentstehung eine Rolle zu spielen.

Die eher niedrige Expression von TACC2 in den untersuchten Tumoren bestätigt die Vermutung von Chen et al. 2000, welcher in TACC2 ein mögliches Tumorsuppressorgen sah. In Zellen, in welchen zentrosomales TACC2 fehlt, resultiert eine fehlerhafte Chromosomenverteilung (Dou et al. 2004). TACC2 ist dabei von TTK (dual specificity protein kinase) abhängig, welches wiederum für die korrekte Ausrichtung der Chromosomen am Zentrosom bei der Mitose essentiell ist. Demnach führt ein Mangel an TACC2 zu einer fehlerhaften Mitose und Zellteilung.

TACC2 interagiert mit GAS42 und INI1, was die Vermutung aufkommen lässt, dass TACC2 die Transkription des SWI/SNF-Komplexes beeinflusst (Lauffart et al. 2003). Das würde bedeuten, dass TACC die Expression zahlreicher Gene reguliert und damit auch eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung spielt.

Gangiseti et al. identifizierte 2004 die Histon-Acetyltransferase als ein TACC2-bindendes Protein. Die Histon-Acetyltransferase führt dazu, dass Chromatin aufgelockert wird und Transkriptionsfaktoren leichter binden können. Ein Mangel an TACC2 könnte also zu einer verminderten Bindung von Transkriptionsfaktoren und zu einer mangelhaften Transkription führen.

Die Expression von TACC2 scheint von Xmrk nicht beeinflusst zu sein. Dies lässt die ebenfalls erniedrigte Expression von TACC2 in Xmrk-unabhängigen Lymphomen schließen.

5.11 Expression von ZFAND5

Während Scott et al. 1998 in menschlicher Milz eine eher niedrige Expression von ZFAND5 fand, scheint sich dies in Fischen etwas anders zu verhalten, da hier die höchste Expression von ZFAND5 in der Milz zu finden war. Dafür stimmt die etwas höhere Expression von ZFAND5 in Gehirn und Muskel und die niedrige Expression in der Leber mit den Ergebnissen von Scott überein.

ZFAND5 stellt ein Inhibitor für NFκB dar (Huang et al. 2004). NFκB wiederum ist als ein bedeutender Transkriptionsfaktor, durch dessen Aktivierung die Cyclooxygenase-2 verstärkt transkribiert wird. Dies hat für das Immunsystem weitreichende Folgen, da hierdurch über TNF-α und IL-1β vermehrt Prostaglandin E2 gebildet wird (Rivest et al. 2000). Daher lässt sich die Überexpression von ZFAND5 in exophytischen Erythrophoromen leicht erklären, da durch eine Inhibition von NFκB weniger Entzündungsmediatoren ausgeschüttet werden und sich dadurch der Tumor vor dem Immunsystem verbergen kann. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, weshalb hauptsächlich ulceröse Oberflächen von Hauttumoren häufig bakteriell besiedelt sind.

Es kann vermutet werden, dass ZFAND5 durch Xmrk angeschaltet wird, da die Expression von ZFAND5 in Xmrk-unabhängigen Lymphomen deutlich niedriger exprimiert wird, als in Xmrk-abhängigen exophytischen Erythrophenomenen. Allerdings scheint ZFAND5 auch in Lymphomen eine gewisse Rolle zu spielen, da diese hier ebenfalls höher exprimiert ist, als in gesunder Haut.

5.12 Fazit und Ausblick

Summa summarum kann man festhalten, dass die Expression der Gene GM2A, MAPK3, NID1, PDIA4, RASL11B, SLC24A5, SPP1 und ZFAND5 von Xmrk beeinflusst wird, während dies für die Gene G6PC, GAMT und TACC2 nicht zutrifft. Auf welche Art und Weise Xmrk dabei die Expression genannter Gene beeinflusst, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

In dem im Voraus angefertigten Microarray waren alle hier getesteten Gene überexprimiert. Dies konnte hier nicht durchweg bestätigt werden. Im Vergleich zu gesunder Haut werden GM2A, MAPK3, PDIA4, RASL11B, SLC24A5 und ZFAND5 in Tumoren höher exprimiert, wobei die Überexpression grob dem Ergebnis des Microarrays entspricht. Die Gene G6PC, GAMT, NID1, SPP1 und TACC2 werden dagegen verglichen mit gesunder Haut unverändert oder niedriger exprimiert, was dem Ergebnis des Microarrays widerspricht. Bezieht man sich jedoch auf das Frühstadium des exophytischen Erythrophenoms, bzw. hyperpigmentierter Haut und deren Vorstufe ändert sich das Ergebnis teils erheblich.

Bei allen getesteten Genen sind jeweils Ausreißer in beide Richtungen zu finden. Dabei fallen die exophytischen Erythrophenome 17 und 37 auf, da sie öfters als Ausreißer in beide Richtungen auftreten. Dabei handelt es sich bei dem exophytischen Erythrophenom 17 um einen kleinen Tumor, während das exophytische Erythrophenom 37 zu den größeren Exemplaren gehört. Ergo kann auch aus den Massen der Tumore kein Schluss auf die Genexpression gezogen werden. Bei allen anderen Ausreißern unterscheiden sich die Gewebe willkürlich. Allerdings fällt auch auf, dass die Expression sämtlicher Gene in der

Hyperpigmentierung, bzw. deren Vorstufe und dem Frühstadium des exophytischen Erythrophoroms gegenüber gesunder Haut erniedrigt ist. Die Genexpression in Tumoren scheint also sehr vom Stadium des Tumors abhängig zu sein. Zudem lässt sich die Expression verschiedener Gene in Tumoren nicht verallgemeinern. In jedem Tumor unterscheidet sich die Genexpression in gewisser Weise. Man kann annehmen, dass jeder Tumor einen eigenen Evolutionsweg beschreitet.

In Zukunft sollten zu Vergleichszwecken weitere Studien mit Melanomzelllinien durchgeführt werden, um die Beziehung der getesteten Gene mit Xmrk weiter zu prüfen. Hierzu ist beispielsweise die selektive Hemmung der Xmrk-Signalwege sinnvoll, um zu erfassen wie genau Xmrk Einfluss auf die getesteten Gene nimmt. Aber auch das Ausschalten der getesteten Gene dürfte in Hinsicht auf Proliferation, Apoptose, ect. interessante Ergebnisse liefern. Des Weiteren sind funktionelle Studien nötig, um die aufgestellte Thesen zu bestätigen.

Es hat sich gezeigt, dass die Genexpression in *Oryzias latipes* häufig mit der Expression in *Homo sapiens* übereinstimmt. Daher könnten Erkenntnisse dieser Art auch für die zukünftige Entwicklung neuer Medikamente für die Krebstherapie von Nutzen sein.

6.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist es ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse der Melanomentstehung und Tumorprogression zu gewinnen. Hierfür wurde ein Tiermodell transgener Medakas (*Oryzias latipes*) verwendet, welche als stabiles Transgen das Konstrukt mitf::xmrk besitzen. Diese Fische entwickelten Pigmentzelltumore, welche für eine Microarrayanalyse herangezogen wurden. Aus diesem Microarraydatensatz wurden 11 Gene ausgewählt, welche in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

Beobachtungen haben ergeben, dass sich bei transgenen Medakas, welche Xmrk exprimieren, verschiedene pigmentierte Hauttumore entwickeln. Diese Tumore wurden je nach ihrem verschiedenen Histiotyp klassifiziert und untersucht.

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie Xmrk die Transkription verschiedener Gene, welche in der Krebsentstehung und –progression eine wichtige Rolle spielen, beeinflusst, wurden pigmentierte Hauttumore transgener Medakas, so wie zu Vergleichszwecken hyperpigmentierte Haut transgener Medakas und Lymphome und gesunde Organe von Wildtyp-Medakas, untersucht.

Mit Hilfe von Real-time-PCR's wurden die folgenden Gene untersucht: G6PC, GAMT, GM2A, MAPK3, NID1, SLC24A5, SPP1, PDIA4, RASL11B, TACC2 und ZFAND5. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expression der Gene GM2A, MAPK3, NID1, PDIA4, RASL11B, SLC24A5 und ZFAND5 von Xmrk beeinflusst wird, während dies für die Gene G6PC, GAMT, SPP1 und TACC2 nicht zutrifft.

Im Vergleich zu gesunder Haut werden GM2A, MAPK3, PDIA4, RASL11B, SLC24A5 und ZFAND5 in Tumoren höher exprimiert. Die Gene G6PC, GAMT, NID1, SPP1 und TACC2 werden dagegen verglichen mit gesunder Haut unverändert oder niedriger exprimiert.

Die Bedeutung der erhöhten Genexpression lässt sich in vielen Fällen zurzeit nur theoretisch erfassen. Eine höhere Expression von SLC24A5 beispielsweise

lässt vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Melaninproduktion und der Zellproliferation besteht. Die Überexpression von GM2A weist dagegen auf eine Rolle von GM2A als Tumormarker hin. Dahingegen scheint die erniedrigte Expression von GAMT und G6PC Auskunft über den veränderten Stoffwechsel in Tumoren zu geben. Um diese Ergebnisse zu bestätigen und zu entschlüsseln wie genau Xmrk die Expression der getesteten Gene beeinflusst, sind allerdings noch weitere funktionelle Studien nötig. Generell kommt man zu dem Schluss, dass die Genexpression sich in jedem Tumor unterscheidet. Daher scheint jeder Tumor seinen eigenen Evolutionsweg zu beschreiten.

6.2 Summary

Target of this work is to get a better understanding in melanomagenesis and tumorprogression. Therefore a model of transgenic medakas (*Oryzias latipes*) was used, wich had the construct mitf::Xmrk as a stable, integrated transgen. Those fishes developed pigmentcelltumors that, wich where used in a microarrayanalysis. Of the results of this microarray 11 genes where chosen and analysed in this study.

Those transgenic medakas which got xmrk injected, but without a tumorsuppresorgen, developed various pigmented kinds of skin cancer. Those tumors were analysed equally to their histiotyps.

To get an idea, how Xmrk effects the transcription of several genes, which play an important role in tumor development and progression, pigmented skin cancer of transgenic medakas and for comparison, hyper pigmented skin of transgenic medakas and also lymphoma and healthy organs where tested.

The following genes where tested by real-time-PCR: G6PC, GAMT, GM2A, MAPK3, NID1, SLC24A5, SPP1, PDIA4, RASL11B, TACC2 and ZFAND5. It was noticed that the expression of the genes GM2A, MAPK3, NID1, PDIA4, RASL11B, SLC24A5 und ZFAND5 gets modified by Xmrk. In contrast the genes G6PC, GAMT, SPP1 and TACC2 didn't.

In comparison to healthy skin GM2A, MAPK3, PDIA4, RASL11B, SLC24A5 and ZFAND5 got higher expressed in tumors. Indeed the expression level of the genes G6PC, GAMT, NID1, SPP1 and TACC2 is the same or even lower than in healthy skin.

The meaning of the higher gen expression can currently just be theoretically conceived. The higher expression of SLC24A5 for example leads to guess that there is a link between the production of melanin and cell proliferation. The overexpression of GM2A shows that GM2A plays maybe a role as an tumor marker. However the lower expression of G6PC and GAMT gets references about the metabolism in cancer. To fix this results and get an better

understanding how Xmrk affects the expression of this genes, additional functional studies are necessary.

The result is that gene expression differs in each tumor. A common conclusion is not possible. It appears that each tumor goes its own evolutionary way.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

Alvarez, E., Northwood, I. C., Gonzalez, F. A., Latour, D. A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., and Davis, R. J. (1991). Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J. Biol. Chem.* 266 (33), 22159-63

Baccarini-Contrì, M., Taparelli, F., Pasquali-Ronchetti, I. (1994). Osteopontin is a constitutive component of normal elastic fibers in human skin and aorta. *Matrix Biol.* 14, 553-560

Becker, Holzmeier (2008). Krebsatlas. Abteilung Epidemiologie von Krebserkrankungen, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg. http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_2.html

Beckmann Isabell-Anett (2010). Der blaue Ratgeber. Hautkrebs. *deutsche Krebshilfe eV.*

Bos JL. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49 (17), 4682-9

Braun-Falco O. und Burg G. (1972). Zur Enzym-Histochemie des malignen Melanoms - Untersuchungen an Primärtumoren und Metastasen. *Archives of Dermatological Research* 246 (4), 303-316

Brown Raymond S (2005). Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol.* 15 (1), 94-8

Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, Gill H, Presti J, Chang HY, van de Rijn M, Shortliffe L, Weissman IL (2009). Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 106 (33), 14016–14021

Chen, H.M., Schmeichel, K.L., Mian, I.S., Lelièvre, S., Petersen, O.W., Bissell, M.J. (2000). AZU-1: a candidate breast tumor suppressor and biomarker for tumor progression. *Mol. Cell Biol.* 11 (4), 1357–1367

Cheng S, et al. (2010). Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2 (TACC2)

in human breast cancer, expression pattern and clinical/prognostic relevance. *Cancer Genomics Proteomics* 7 (2), 67-73

Cheng Keith C., Victor A. (2006). The role of SLC24A5 in skin color. *Experimental Dermatology* 15 (10), 836–838

David T. Denhardt¹, Cecilia M. Giachelli², Susan R. Rittling (2001). Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 723–49

Dou, Z., Ding, X., Zereshki, A., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, F., Sun, J., Huang, H., Yao, X. (2004). TTK kinase is essential for the centrosomal localization of TACC2. *FEBS Letters* 572 (1), 51-56

Durkin, M. E., Chakravarti, S., Bartos, B. B., Liu, S.-H., Friedman, R. L., Chung, A. E. (1988). Amino acid sequence and domain structure of entactin: homology with epidermal growth factor precursor and low density lipoprotein receptor. *J. Cell Biol* 107 (6 Pt 2), 2749-56

Fearon K. C. (2008). Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem. *Eur J Cancer.* 44, 1124-1132

Flöttmann Ricarda (2011). Die Rolle von Entactin-1 und -2 bei der Skelettmuskelzell-differenzierung. *Dissertation, Medizinischen Fakultät der Charité, Universitätsmedizin Berlin*

Gangisetty, O., Lauffart, B., Sondarva, G.V., Chelsea, D.M., Still, I.H (2004). The transforming acidic coiled coil proteins interact with nuclear histone acetyltransferases. *Oncogene* 23 (14), 2559-63

Garnett, M.J. & Marais, R. (2004). Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 6 (4), 313-9

Ghosh Abhijit, Shieh Jeng-Jer, Pan Chi-Jiunn and Chou Janice Yang (2004). Histidine 167 Is the Phosphate Acceptor in Glucose-6-phosphatase- β Forming a Phosphohistidine Enzyme Intermediate during Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 12479-12483

Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ, Chou JY (2004). Histidine 167 is the phosphate acceptor in glucose-6-phosphatase-beta forming a phosphohistidine enzyme intermediate during catalysis. *J. Biol. Chem.* 279 (13), 12479-83

Goldberger Rf, Epstein Cj, Anfinsen Cb (1963). Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.* 238, 628-635

He B, Mirza M, Weber GF (April 2006). An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells. *Oncogene* 25 (1): 2192–2202

Hishiya, A., Ikeda, K., Watanabe, K. J. (2005). A RANKL-inducible gene Znf216 in osteoclast differentiation. *J Recept Signal Transduct Res.* 25 (3), 199-216

Hishiya, A., Iemura, S., Natsume, T., Takayama, S., Ikeda, K., Watanabe, K. (2006) A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *EMBO J.* 25 (3), 554–564

Husmann Gabriele, Kaatsch Peter, Katalinic Alexander, Bertz Joachim, Haberland Jörg, Kraywinkel Klaus, Wolf Ute (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe

Huang, J., Teng, L., Li, L., Liu, T., Li, L., Chen, D., Xu, L.G., Zhai, Z., Shu, H.B. *J. Biol.* (2004). ZNF216 Is an A20-like and I κ B kinase gamma-interacting inhibitor of NF κ B activation. *J Biol Chem.* 279 (16), 16847-53

Hsu Ming-Chuan, Chang Hui-Chiu, Hung Wen-Chun (2005). HER-2/neu Represses the Metastasis Suppressor RECK via ERK and Sp Transcription

Factors to Promote Cell Invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4718-25

Ide T, Brown-Endres L, Chu K, Ongusaha PP, Ohtsuka T, El-Deiry WS, Aaronson SA, Lee SW (2009). GAMT, a p53-inducible modulator of apoptosis, is critical for the adaptive response to nutrient stress. *Mol Cell*. 36 (3), 379-92

Ide Takao, Brown-Endres Lauren, Chu Kiki, Ongusaha Pat P., Ohtsuka Takao, El-Deiry Wafik S., Aaronson Stuart A. and Lee Sam W. (2009). GAMT, a p53-Inducible Modulator of Apoptosis, Is Critical for the Adaptive Response to Nutrient Stress, *Molecular Cell*. 36 (3), 379-392

Kalluri Raghu (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* 3, 422-433

Karadag, A., Fisher, L.W. (2006). Bone Sialoprotein Enhances Migration of Bone Marrow Stromal Cells Through Matrices by Bridging MMP-2 to alpha(v)beta(3)-Integrin. *J. Bone Miner. Res.* 21 (10), 1627-36

Karin M. (1994). Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcriptional factors. *Curr Opin Cell Biol* 6 (3), 415-24

Kaufmann R., Tilgen W., Garbe K. (1998). Diagnostische und therapeutische Standards in der Dermatologischen Onkologie: Malignes Melanom. *Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie ADO*.

Kohri, K., Suzuki, Y., Yoshida, K., Yamamoto, K., Amasaki, N., Yamate, T., Umekawa, T., Iguchi, M., Sinohara, H., Kurita, T. (1992). Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding urinary stone protein, which is identical to osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 859-864

Klingmüller G., Schmoeckel Chr (1971). Frei im Cytoplasma liegende Melanin-synthetisierende Membranordnungen beim malignen Melanom. *Archives of Dermatological Research* 241 (2), 115-121

Klima, H., Tanaka, A., Schnabel, D., Nakano, T., Schroder, M., Suzuki, K., Sandhoff, K. (1991). Characterization of full-length cDNAs and the gene coding for the human GM2 activator protein. *FEBS Lett.* 289, 260-264

Koivu J, Myllylä R, Helaakoski T, Pihlajaniemi T, Tasanen K, Kivirikko KI.(1987). A single polypeptide acts both as the beta subunit of prolyl 4-hydroxylase and as a protein disulfide-isomerase. *J. Biol. Chem.* 262, 6447-6449

Laisney Juliette AGC, Braasch Ingo, Walter Ronald B, Meierjohann Svenja, Scharl Manfred (2010). Lineage-specific co-evolution of the Egf receptor/ligand signaling system. *BMC Evolutionary Biology* 10:27

Lamason Rebecca L., Mohideen Manzoor-Ali P.K., Mest Jason R., Wong Andrew C., Norton Heather L., Aros Michele C., Juryne Michael J., Mao Xianyun, Humphreville Vanessa R., Humbert Jasper E., Sinha Soniya, Moore Jessica L., Jagadeeswaran Pudur, Zhao Wei, Ning Gang, Makalowska Izabela, McKeigue Paul M., O'Donnell David, Kittles Rick, Parrahttp Esteban J., Mangini Nancy J., Grunwald David J., Shriver Mark D., Canfield Victor A., Cheng Keith C. (2005). SLC24A5, a Putative Cation Exchanger, Affects Pigmentation in Zebrafish and Humans. *Science* 310 (5755), 1782-1786

Lauffart, B., Gangisetty, O., Still, I.H (2003). Molecular cloning, genomic structure and interactions of the putative breast tumor suppressor TACC2. *Genomics* 81(2), 192-201

Lee J., Davis F., Roberts-Thomas S., Monteith G. (2011). Remodeling of Ca²⁺ signaling in Tumorigenesis: The role of Ca²⁺ transport. *Cell Physiology* 136

Lee Michael J., Gergely Fanni, Jeffers Kim, Peak-Chew Sew Yeu & Raff Jordan W. (2001). Msps/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour. *Nature Cell Biology* 3, 643 – 649

Lee Mun-Yong, Shin Soon-Lim, Choi Yun-Sik, Kim Eun-Jeong, Cha Jung-Ho, Chun Myung-Hoon, Lee Sang Bok and Kim Seong Yun (1999). Transient upregulation of osteopontin mRNA in hippocampus and striatum following global forebrain ischemia in rats. *Neuroscience Letters* 271 (2), 81-84

- Lee Sang Min, Nga Nguyen Thi Hong, Park Mi Hee, Kim Kyung Soon, Cho Kyoung Joo, Moon Dong Cheul, Kim Hak Yong, Yoon Do Young, Hong Jin Tae (2004). EPO receptor-mediated ERK kinase and NF- κ B activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320 (4), 1087-1095
- Lee, A.S. (1991). Competitive inhibition of a set of endoplasmic reticulum protein genes (GRP78, GRP94, and ERp72) retards cell growth and lowers viability after ionophore treatment. *Mol. Cell. Biol.* 11 (7), 3446-53
- Lei, K.-J., Shelly, L. L., Pan, C.-J., Sidbury, J. B., Chou, J. Y. (1993). Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science* 262, 580-583
- Li SC, Nakamura T, Ogamo A, Li YT (1979). Evidence for the presence of two separate protein activators for the enzymic hydrolysis of GM1 and GM2 gangliosides. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 10592-10595
- Louro R., Nakaya H.I., Paquola A.C., Martins E.A., da Silva A.M., Verjovski-Almeida S. and Reis E.M. (2004). RASL11A, member of a novel small monomeric GTPase gene family, is down-regulated in prostate tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 618–627
- Mahuran DJ (1999-10-8). Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses. *Biochimica Biophysica Acta* 1455 (2-3), 105-138
- Mamoru Satoh, Atsuyoshi Shimada, Hiromi Keino, Akiko Kashiwai, Naoko Nagai, Shinsuke Saga and Masanori Hosokawa(2005). Functional characterization of 3 thioredoxin homology domains of ERp72. *Cell Stress Chaperones* 10 (4), 278-84
- Meden Harald (2006). Krebs in Brust, Ovar oder Gebärmutter Tumormarker richtig nutzen!. *Medical Tribune* 41 (15)
- Meierjohann S, Scharl M (2006). From Mendelian to molecular genetics: the Xiphophorus melanoma model. *Trends in Genetics* 22 (12), 654-661

Meredith, Paul; Riesz, Jennifer. Radiative Relaxation Quantum Yields for Synthetic Eumelanin. *Photochemistry and photobiology*. 79 (2), 211–216

Merlino, Glenn (2011). Interferon- γ links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. *Nature* 469, 548–553

Mocigemba Andrea (2005). Bedeutung von konstitutiv aktiviertem ERK1/2 und Galectin-3 für den malignen Phänotyp neuraler Tumorzellen. Dissertation *Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät, Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*

Morimoto, I., Sasaki, Y., Ishida, S., Imai, K., Tokino, T. (2002). Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 270-278

Mukhopadhyay Arnab, Vij Shubha, and Tyagi Akhilesh K. (2003). Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (16), 6309-6314

Neumaier M. (2005). Tumormarker. Institut für klinische Chemie, Universität Heidelberg

Olsen DR, Nagayoshi T, Fazio M, Mattei MG, Passage E, Weil D, Timpl R, Chu ML, Uitto J (June 1989). Human nidogen: cDNA cloning, cellular expression, and mapping of the gene to chromosome 1q43. *Am. J. Hum. Genet.* 44 (6), 876-85

Orton Richard J., Sturm Oliver E., Vyshemirsky Vladislav, Calder Muffy, Gilbert David R. and Kolch Walter (2005). Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem. J.* 392, 249–261

Pézeron Guillaume, Lambert Guillaume, Dickmeis Thomas, Strähle Uwe, Rosa Frédéric M., Mourrain Philippe (2008). Ras11b Knock Down in Zebrafish Suppresses One-Eyed-Pinhead Mutant Phenotype. *Plos one* 3 (1), e1434.

Pu, J. J., Li C, Rodriguez M. and. Banerjee D (2001). Cloning and structural characterization of ECTACC, a new member of the transforming acidic coiled coil (TACC) gene family: cDNA sequence and expression analysis in human microvascular endothelial cells. *Cytokine* 13 (3), 129-37

Quillen Ellen E., Shriver Mark D. (2008). SLC24A5: exchanging genetic and biochemical knowledge. *Pigment Cell & Melanoma Research* 21 (3), 344-345

Raff Jordan W. (2002). Centrosomes and cancer: lessons from a TACC. *Trends in Cell Biology* 12 (5), 222-225

Roux Philippe P., Blenis John (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68 (2), 320-244

Rivest S. et al. (2000): How the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 223 (1), 22-38

Sabbioni, Elena Miotto, Angelo Veronese, Angela Angusti, Roberta Gafà, Stefano Manfredini, Fabio Farinati, Takako Sasaki, Giovanni Lanza and Massimo Negrini (2007). Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer, *Molecular Cancer* 6 (17)

Sasaki, T., Göhring, W., Pan, T.C., Chu, M.L., Timpl, R. (1995). Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands. *J. Mol. Biol.* 254 (5), 892-9

van Schaftingen E, Gerin I (2002). The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J.* 362, 513-532

Schneider, S., Yochim, J., Brabender, J., Uchida, K., Danenberg, K.D., Metzger, R., Schneider, P.M., Salonga, D., Hölscher, A.H., Danenberg, P.V. (2004). Osteopontin but not osteonectin messenger RNA expression is a prognostic marker in curatively resected non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 10 (5), 1588-96

Schnetkamp, P. P. M. (2004). The SLC24 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger family: vision and beyond. *Pflugers Arch.* 447, 683-688

Schittek Birgit, Sinnberg Tobias und Meier Friedegund (2006). Biologie des Melanoms: Signaltransduktionsmoleküle als Zielstrukturen für die Melanomtherapie. *Onkologie aktuell* Teil1, 13-30

Schuendeln, M.M., Piekorz, R.P., Wichmann, C., Lee, Y., McKinnon, P.J., Boyd, K., Takahashi, Y., Ihle, J.N. (2004). The centrosomal, putative tumor suppressor protein TACC2 is dispensable for normal development, and deficiency does not lead to cancer. *Mol. Cell. Biol.* 24 (14), 6403-9.

Schulze, A. (2003). Creatine deficiency syndromes. *Molec. Cell Biochem.* 244, 143-150

Standal T, Borset M, Sundan A (2004). Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp. Oncol.* ;26 (3), 179-84

Stolle, K., Schnoor, M., Fuellen, G., Spitzer, M., Cullen, P., Lorkowski, S. (2007). Cloning, genomic organization, and tissue-specific expression of the RASL11B gene. *Biochem. Biophys. Acta* 1769 (7-8), 514-524

Stromnes Ingunn M & Goverman Joan M (2007). Osteopontin-induced survival of T cells. *Nature Immunology.* 8, 19-20

Sunder-Plassmann M., Bernheimer H. (1974). Ganglioside in Meningiomen und Hirnhäuten. *Acta Neuropathol.* (Berlin) 27, 289-297

Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CA, Sodek J (2002). Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 17 (1), 1486–1497

Ulazzi, L., Sabbioni, S., Miotto, E., Veronese, A., Angusti, A., Gafà, R., Manfredini, S., Farinati, F., Sasaki, T., Lanza, G., Negrini, M (2007). Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer. *Mol. Cancer* 28; 6-17

Ulazzi Linda, von Gierke Silvia (1929). Hepato-nephromegalia glykogenica (Glykogenspeicherkrankheit der Leber und Nieren). *Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie* 82, 497-513

Vetter Ingrid R. and Wittinghofer Alfred (2001). The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science* 294 (5545), 1299-1304

Weisbart Richard H. (1992). an antibody that binds a neutrophil membrane protein, ERp72, primes human neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Implications for ERp72 in the Signal Transduction Pathway for Neutrophil Priming¹. *The journal of immunology* 148 (12), 3958-3963

Wellbrock C., Scharf M. 2001. Multiple binding sites in the growth factor receptor Xmrk mediate binding to p59^{fyn}, GRB2 and Shc. *Eur. J. Biochem.* 260, 275-283

Wendeler, M., Hoernschemeyer, J., Hoffmann, D., Kolter, T., Schwarzmann, G., Sandhoff, K. (2004). Photoaffinity labelling of the human GM2-activator protein. Mechanistic insight into ganglioside GM2 degradation. *Eur. J. Biochem.* 271 (3), 614-27

Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC (2010). Melanocortin- 1-receptor and risk of cutaneous melanoma: A meta-analysis and estimates of population burden. *International Journal of Cancer*. Accepted manuscript online: 2 DEC

Xie, Z., Moy, L. Y., Sanada, K., Zhou, Y., Buchman, J. J., Tsai, L.-H. (2007). Cep120 and TACCs control interkinetic nuclear migration and the neural progenitor pool. *Neuron* 56, 79-93

Yamada, Y., Kleinman, H.K(1992). Functional domains of cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4 (5), 819-823

Yamanaka S, Johnson ON, Lyu MS, Kozak CA, Proia RL (1994). The mouse gene encoding the GM2 activator protein (Gm2a): cDNA sequence, expression, and chromosome mapping. *Genomics* 24 (3), 601-4

Yoshihiko Yamada and Hynda K. Kleinman (1992). Functional domains of cell adhesion molecules. *Cell Biology* 4 (5), 819-823

Zhou, M., Brown, E.J. J. (1993). Leukocyte response integrin and integrin-associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *Exp. Med.* 178 (4), 1165-74

Zhou Youwen, Dai Derek L , Martinka Magdalena , Su Mingwan , Zhang Yi , Campos Eric, Dorocicz Irene , Tang Liren , Huntsman David , Nelson Colleen , Ho Vincent and Li Gang (2005). Osteopontin Expression Correlates with Melanoma Invasion. *Journal of Investigative Dermatology* 124, 1044–1052

Zayzafoon Majd, Abdulkadir Sarki A., McDonald Jay M. (2003). Notch Signaling and ERK Activation Are Important for the Osteomimetic Properties of Prostate Cancer Bone Metastatic Cell Lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 3662-3670

Bücher:

Berg J, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemistry. 5th edition. *W H Freeman* (2002)

Jansohn Monika: Gentechnische Methoden. 4. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag* (2006)

Mendelsohn, Howley, Israel, Gray, Thompson. The Molecular Basis of Cancer. 3. Auflage, *Elsevier Science* (2008)

Rodden Robinson Tara: Genetik für Dummies. 1. Auflage, *John Wiley And Sons Ltd* (2006)

Volkenandt M., Plewig G.: MANUAL Maligne Melanome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 5. Auflage. *Tumorzentrum München* (2000)

Voigt H., Kleeberg U. R.. Malignes Melanom. Berlin, *Springer-Verlag* (1986)

Wagener, Molekulare Onkologie - Entstehung und Progression maligner Tumoren, Stuttgart, *Georg-Thieme-Verlag* (1999)

Internetquellen:

www.biocarta.com

www.bmb.msu.edu

www.derma.de/82.0.html

www.ensembl.org

www.genecards.org

www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

www.opm.phar.umich.edu

www.wikipedia.de

www.wikigenes.de

7.2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
°C	Grad Celcius

cDNA	complementary DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic
EGF	Epidermal-Growth-Factor acid
ERK	extracellular signal-regulated kinase
G6PC	Glucose-6-Phosphatase
GAMT	Guanidinoacetat-N-Methyltransferase
GM2A	GM2-gangliosid-activator
H	Stunde
H ₂ O	Wasser
HER	Humaner EGF-Rezeptor
KCl	Kaliumchlorid
MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3
mM	Millimol
min	Minute
Mitf	Mikroptalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NID1	Entactin
RASL11B	RAS-like, family 11, member B
P53	protein disulfide isomerase family A, member 4
PCR	Protein 53
PDIA4	Polymerase chain reaction
RAF	rapidly growing fibrosarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

rpm	Rounds per minute
S	Sekunde
SLC24A5	solute carrier family 24 member 5
SPP1	Osteopontin
Tab	Tabelle
TACC2	transforming acidic coiled-coil-containing protein 2
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris/EDTA
U	Units
UV	Ultraviolettes (Licht)
Xmrk	Xiphophorus Melanom Rezeptor Kinase
ZFAND5	zinc finger, AN1-type domain 5

7.3 Ergebnisse des Microarrays

ID_1	A_mea n	M1_a 3 X19 Haut(Mela nom) 2109 07	M2_a 3 X19 Haut(Mela nom) 2109 07	M1_b3 M1_b3 Melano m(Haut)21090 7	M2_b 3 X20 Mela nom(Haut) 2109 07	W1_a3 W1_a3 Haut(M elanom)21090 7	W2_a3 W2_a3 Haut(M elanom)21090 7	W1_b3 W1_b3 Melano m(Haut)21090 7	W2_b3 W2_b3 Melano m(Haut)21090 7	MW Melano m/Haut	Fold change Melano m/Haut	directi on	Acc.	Unigen eID	Description
1322	11,88	4,81	4,40	4,87	4,34	0,027 3151	0,035 76565	0,1	0,1	4,61	24,35	up	BJ718 329	Ola.6 826	Transcribed locus, moderately similar to XP_413812.1 PREDICTED: similar to solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 5 [Gallus gallus]
2904	10,67	2,87	2,86	3,59	3,44	0,302 04431	0,513 91863	0,478 30548	0,882 97668	3,19	9,11	up	BJ746 983	Ola.2 076	
2992	11,37	1,69	3,97	3,59	3,23	0,1	25717	0,304 13007	0,227 39451	3,12	8,71	up	BJ489 085	Ola.4 327	Transcribed locus
3696	10,81	4,23	1,15	3,51	3,26	0,1	0,1	0,1	0,1	3,04	8,20	up	BJ534 650	Ola.4 329	Transcribed locus, moderately similar to NP_036925.1 guanidinoacetate methyltransferase [Rattus norvegicus]
6512	10,20	3,03	3,43	2,69	2,89	0,904 20561	0,073 81703	0,1	0,1	3,01	8,07	up	BJ512 316	Ola.4 352	Transcribed locus
4043	11,64	2,99	3,19	2,47	3,39	0,08	86114	0,1	0,1	3,01	8,05	up	BJ715 586	Ola.4 224	Transcribed locus
3460	8,93	2,51	2,27	3,89	2,62	0,122 8142	0,376 50602	0,273 21278	0,225 92593	2,82	7,08	up	BJ744 556	Ola.7 417	Transcribed locus, strongly similar to NP_958815.1 LUC7-like isoform b; sarcoplasmic reticulum protein LUC7B1; LUC7 (S. cerevisiae)-like [Homo sapiens]
4087	10,14	1,86	3,11	3,01	2,37	0,295 20588	0,252 23112	0,357 56364	1	2,59	6,01	up	BJ522 291	Ola.5 375	Transcribed locus, strongly similar to NP_001023.1 ribosomal protein S29; 40S ribosomal protein S29 [Homo sapiens]
3063	10,80	3,24	2,38	2,17	1,80	0,202 03269	0,435 22663	0,802 87515	1	2,40	5,27	up	BJ747 086	Ola.6 321	Transcribed locus, moderately similar to XP_222163.1 PREDICTED: similar to myosin, light polypeptide 6, alkali,

																	smooth muscle and non-muscle [Rattus norvegicus]
4065	9,64	1,14	3,28	2,62	2,51	0,057 6	0,029 52468	0,403 75427	0,975 16237	2,39	5,24	up	BJ538 825	Ola.4 834		Transcribed locus	
1787	10,32	2,46	1,58	2,62	2,45	0,369 03269	0,072 4605	0,554 15631	1	2,28	4,84	up	AU16 9944	Ola.5 77		Transcribed locus	
7133	10,72	1,18	2,50	2,51	2,51	0,1	0,097 59278	1	1	2,17	4,51	up	BJ721 027	Ola.2 286		Transcribed locus, moderately similar to XP_509126.1 PREDICTED: similar to PYM protein [Pan troglodytes]	
2854	9,81	1,88	2,48	1,63	2,61	0,356 54197	0,498 8764	0,365 73966	0,713 70968	2,15	4,44	up	BJ732 228	Ola.8 65		Transcribed locus, strongly similar to NP_032114.1 growth arrest specific 7 [Mus musculus]	
589	11,13	1,72	2,27	2,14	2,46	0,580 9535	0,885 1	0,639 71429	0,140 1	2,14	4,42	up	BJ744 986	Ola.5 961		Transcribed locus, weakly similar to NP_034429.1 GM2 ganglioside activator protein [Mus musculus]	
194	12,05	2,15	2,32	1,62	2,46	0,1	0,639 51582	0,801 99831	0,140 80732	2,14	4,40	up	BJ536 025	Ola.4 836		Transcribed locus	
3198	10,91	2,69	2,45	1,81	1,59	0,1	0,910 27644	0,1	0,1	2,14	4,39	up	BJ507 653	Ola.6 68		Transcribed locus	
1795	11,35	2,18	1,77	1,54	2,94	0,03	0,01	0,1	0,1	2,11	4,31	up	AU16 9040	Ola.7 76		Transcribed locus	
3621	10,07	2,38	1,40	2,27	2,12	0,515 42746	0,363 1248	0,625 18854	1	2,04	4,12	up	BJ718 275	Ola.2 463		Transcribed locus, strongly similar to NP_036082.1 mitogen activated protein kinase 3 [Mus musculus]	
7194	11,30	1,66	1,27	2,74	2,38	0,672 33252	0,522 01011	0,434 69084	1	2,01	4,03	up	BJ742 038	Ola.3 823		Transcribed locus, strongly similar to XP_512278.1 PREDICTED: death- associated protein kinase 3 [Pan troglodytes]	
2898	9,48	1,89	1,59	2,16	1,93	0,259 12722	0,545 52184	0,641 43426	0,532 81853	1,90	3,72	up	BJ722 461	Ola.1 967		Transcribed locus, weakly similar to NP_001002830.1 RAS-like family 11 member B [Rattus norvegicus]	
3265	11,18	2,51	0,87	2,14	1,88	0,963 37308	0,1	0,770 49709	0,179 29424	1,85	3,60	up	BJ026 990	Ola.2 361		Transcribed locus, moderately similar to XP_520293.1 PREDICTED: similar to GLE1-like, RNA export mediator	
5720	9,98	1,90	2,04	1,86	1,55	0,088 10044	1	0,1	0,1	1,84	3,57	up	BJ514 582	Ola.2 102		Transcribed locus, moderately similar to XP_520293.1 PREDICTED: similar to GLE1-like, RNA export mediator	

2984	8,61	3,40	2,21	1,08	0,18	-	0,169	0,073	0,708	0,358	1,63	3,09	up	BJ503 032	Ola.4 122	isoform 1 [Canis familiaris] Transcribed locus, moderately similar to NP_005691.2 dipeptidylpeptidase III isoform 1; dipeptidylpeptidase III [Homo sapiens]
3608	8,67	0,83	1,14	1,97	2,56		0,065	0,053	0,032	0,804	1,62	3,08	up	BJ716 845	Ola.2 078	Transcribed locus
6600	9,11	1,87	1,91	1,33	1,39		0,318	0,505	0,072	1	1,62	3,08	up	BJ726 450	Ola.6 763	Transcribed locus, weakly similar to XP_419010.1 PREDICTED: similar to U11/U12 snRNP 48K [Gallus gallus]
2920	9,92	2,02	1,70	1,63	1,11		0,439	0,326		1	1,61	3,06	up	BJ728 283	Ola.2 480	Transcribed locus, moderately similar to XP_418019.1 PREDICTED: similar to hypothetical protein 2810027J07; cDNA sequence BC025615 [Gallus gallus]
8337	9,40	0,75	0,26	2,57	2,61		1	0,900	0,352	0,420	1,55	2,92	up	BJ539 774	Ola.6 093	Transcribed locus, weakly similar to NP_650528.1 CG6126-PA [Drosophila melanogaster]
3767	9,35	2,09	0,84	1,69	1,44		0,689	0,395	0,1	0,1	1,52	2,86	up	BJ740 591	Ola.6 331	Transcribed locus, moderately similar to NP_990860.1 adenylosuccinate lyase [Gallus gallus]
5791	8,67	0,92	3,45	1,27	0,22		0,570	0,183	0,935	0,717	1,47	2,76	up	BJ724 320	Ola.3 939	Transcribed locus, moderately similar to XP_513197.1 PREDICTED: similar to thioredoxin family Trp26 [Pan troglodytes]
6649	9,99	2,04	1,13	1,33	1,31		0,379	0,083	0,1	0,444	1,45	2,74	up	BJ727 669	Ola.8 005	Transcribed locus
5373	9,39	1,91	1,65	1,32	0,90		0,400	0,348		0,726	1,44	2,72	up	BJ026 496	Ola.2 287	Transcribed locus, moderately similar to NP_116011.1 multi-PDZ-domain-containing protein [Homo sapiens]
5634	12,26	0,93	1,44	1,72	1,65		0,055	0,025	0,1	0,1	1,44	2,71	up	Yeast tRNA	0	
4457	9,09	2,63	1,62	0,60	0,86		0,090	0,370		0,820	1,43	2,69	up	BJ740 750	Ola.5 883	
2491	8,48	2,09	1,55	0,73	1,27		0,198	0,045	0,077	0,204	1,41	2,66	up	AU17 0427	Ola.5 73	Transcribed locus

3639	10,07	1,78	0,90	1,52	1,30	0,373 35704	0,462 5629	0,963 53225	0,819 23331	1,37	2,59	up	BJ017 250	Ola.2 892	Transcribed locus, moderately similar to NP_689753.2 sec1 family domain containing 2; syntaxin binding protein 1-like 1 [Homo sapiens]
611	9,14	0,74	2,85	0,48	1,41	0,1	0,256 7256	0,115 89404	1	1,37	2,59	up	BJ715 639	Ola.6 636	
1582	10,51	2,18	0,60	1,26	1,41	0,566 93988	0,1	0,953 67412	0,213 5506	1,36	2,57	up	BJ535 795	Ola.4 316	Transcribed locus, weakly similar to XP_421193.1 PREDICTED: similar to double substrate-specificity short chain dehydrogenase/reductase 2 [Gallus gallus]
4909	9,03	1,89	2,45	0,86	0,16	0,211 489	0,292 77389	0,910 50584	0,656 48855	1,34	2,53	up	BJ730 766	Ola.8 509	Transcribed locus, weakly similar to NP_084154.1 tubulin-specific chaperone d [Mus musculus]
3695	9,86	1,78	0,62	1,57	1,37	0,422 48099	0,481 05263	0,973 1	68421	1,33	2,52	up	BJ508 458	Ola.4 322	Transcribed locus, weakly similar to XP_413747.1 PREDICTED: similar to lipidosin; bubblegum; very long-chain acyl-CoA synthetase [Gallus gallus]
7397	9,80	1,60	1,03	2,02	0,67	0,225 22015	0,568 54931	1	0,1	1,33	2,51	up	AB00 9568	Ola.7 7	OIGRK-C
4021	8,65	0,49	0,39	2,57	1,85	0,056 90789	0,058 40297	0,916 98113	0,590 11026	1,32	2,50	up	BJ504 410	Ola.3 692	Transcribed locus
2639	9,70	1,33	1,73	1,34	0,90	0,1	0,553 31564	0,146 26413	0,1	1,32	2,50	up	BJ746 354	Ola.4 319	Transcribed locus
531	10,48	0,49	1,09	1,33	2,27	0,1	0,543 3952	0,091 00719	0,597 26135	1,29	2,45	up	AY60 9382	Ola.4 427	ZFP313 protein
7294	9,48	1,39	1,12	1,43	1,20	0,431 11333	0,075 3012	0,592 1	59259	1,29	2,44	up	BJ740 439	Ola.6 558	Transcribed locus, weakly similar to XP_415959.1 PREDICTED: similar to outer hair cell motor protein prestin [Gallus gallus]
4669	9,79	1,70	0,49	1,61	1,27	0,329 45932	0,1	1	1	1,27	2,41	up	BJ718 582	Ola.2 285	Transcribed locus
5653	8,87	2,06	0,69	1,17	0,95	0,415 12271	0,757 30714	0,403 1	36134	1,22	2,32	up	AU17 1770	Ola.4 89	Transcribed locus
880	8,90	2,25	0,66	0,04	1,92	0,372 52774	0,065 77181	0,156 86275	1	1,22	2,32	up	BJ489 085	Ola.4 327	Transcribed locus

3030	9,03	0,88	1,09	1,46	1,43	0,362	0,400	0,734		1,22	2,32	up	BJ741 803	Ola.5 366	Transcribed locus, strongly similar to XP_414657.1 PREDICTED: similar to Glucosamine-6-phosphate isomerase (Glucosamine-6-phosphate deaminase) (GNPDA) (GlcN6P deaminase) (Oscillin) [Gallus gallus]
5434	11,65	1,02	0,92	1,70	1,19	0,1	0,1	0,500	0,400	1,21	2,31	up	BJ508 218	Ola.3 824	Transcribed locus, strongly similar to XP_512019.1 PREDICTED: similar to Guanine nucleotide-binding protein G(olf), alpha subunit (Adenylate cyclase-stimulating G alpha protein, olfactory type) [Pan troglodytes]
792	8,81	1,65	1,59	0,53	2,09	0,518	0,502	0,341	1	1,20	2,29	up	BJ746 983	Ola.2 076	
6174	9,60	1,68	1,34	1,02	0,66	0,381	0,352	0,698	1	1,18	2,26	up	BJ530 992	Ola.4 763	Transcribed locus
8101	8,40	0,47	0,82	1,34	2,05	0,067	0,240	0,312	0,661	1,17	2,25	up	AB00 1741	Ola.7 9	Gi1 alpha subunit
1848	9,85	0,72	2,25	0,41	1,22	0,081	0,645	0,465	1	1,15	2,22	up	BJ737 355	Ola.2 079	Transcribed locus
3008	9,48	0,86	0,60	1,63	1,46	0,477	0,273	0,770	0,1	1,14	2,20	up	BJ530 179	Ola.4 748	Transcribed locus
1791	8,92	1,89	2,04	0,02	0,53	0,335	0,163	0,747	1	1,11	2,16	up	AU17 1752	Ola.6 77	Transcribed locus, weakly similar to XP_517996.1 PREDICTED: similar to protocadherin gamma subfamily C, 5 isoform 2 precursor [Pan troglodytes]
567	8,59	1,12	0,90	0,79	1,59	0,503	0,573	0,182	0,335	1,10	2,14	up	BJ026 723	Ola.5 371	Cellular nucleic acid binding protein, partial
1922	10,26	1,66	1,89	0,58	0,25	0,392	0,242	0,749	1	1,10	2,14	up	BJ495 703	Ola.4 010	Transcribed locus
6337	8,73	0,36	1,81	1,49	1,41	0,1	0,305	0,952	0,744	1,09	2,13	up	D896 27	Ola.4 471	Cytoplasmic actin OICA1
3321	8,48	1,91	1,09	0,38	0,97	0,418	0,606	0,716	0,302	1,09	2,12	up	BJ492 690	Ola.3 791	Transcribed locus
4904	8,56	1,63	2,20	0,51	0,02	0,293	0,258	0,593	0,592	1,08	2,12	up	BJ748 610	Ola.8 319	Transcribed locus, weakly similar to XP_541662.1 PREDICTED: similar to

951	10,01	1,12	0,25	0,52	2,13	1	1	0,602	0,565	51046	46727	1,00	2,00	up	BJ747	Ola.6
															086	321

Transcribed locus, moderately similar to XP_222163.1 PREDICTED: similar to myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle [Rattus norvegicus]

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred Scharl für die Chance danken, meine Dissertation in der Physiologischen Chemie I, zu diesem äußerst interessanten Projekt, anzufertigen. Vor allem danke ich ihm für die unendliche Geduld in jeglicher Hinsicht, die optimale Betreuung und auch die Möglichkeit, trotz Doktorarbeit das Studium nicht zu kurz kommen zu lassen.

Ebenso danke ich Conny, die mir vor allem beim Einarbeiten mit Rat und Tat zur Seite stand und sich nicht scheute, Probleme so lange ausdiskutieren, bis auch die letzten Unklarheiten beseitigt waren. Auch Peter und Susanne möchte ich danken, da sie jederzeit für alle Probleme ein offenes Ohr hatten. Genauso möchte ich Petra für ihre unermüdliche Unterstützung danken, insbesondere für die Rechenstütze. Ein großer Dank geht auch an Fabian und Maria, die mir stets mit ihrem Fachwissen zur Seite standen. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern der PC I für die nette, entspannte Arbeitsatmosphäre und Ratschläge, wenn wieder einmal etwas nicht klappen wollte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Familie, insbesondere dem Kauer-Clan, für die unermüdliche Unterstützung und Ermunterung in allen Lebenslagen bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum	10.01.1985
Geburtsort	Mutlangen
Familienstand	Ledig

Werdegang:

Seit 10/2011	Assistenzarztstätigkeit in der Praxis für Zahnheilkunde, Dres. Fabritius & Mühlfriedel, Traunreut
4/2011 – 9/2011	Assistenzarztstätigkeit in der Praxis für Kinder und Jugendliche, Dr. Schnelle, Traunstein
10/2008 - 2011	Doktorarbeit in der physiologische Chemie, Biozentrum Universität Würzburg
03/2006 - 11/2010	Studium der Zahnmedizin, Universität Würzburg
09/2004 - 03/2006	Studium der Biochemie, Ruhr-Universität Bochum
09/2002 -06/2004	Agnes-von-Hohenstauffenschule Schwäbisch Gmünd
09/1995 - 06/2002	Franz-von-Asissi-Realschule, Waldstetten

Traunstein, 10/2011

A. Hol