

Untersuchung von FOSL1 im humanen Melanom



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

vorgelegt von
Daniela Haug
geb. am 11.07.1981 in Bad Homburg
Würzburg, Februar 2014

Angefertigt am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I
Biozentrum der Universität Würzburg
in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Svenja Meierjohann

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

1. Gutachter: PD Dr. Svenja Meierjohann
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Raabe

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Für
Martin, Beate und Johannes

Zusammenfassung

Bei Melanomen handelt es sich um die gefährlichste Form von Hautkrebs mit der höchsten Mortalitätsrate. Deshalb sind Untersuchungen dieser Hautkrebsart von immenser Bedeutung. Es ist bekannt, dass der AP-1-Transkriptionsfaktorkomplex eine große Rolle für Melanomentstehung und -progression spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der AP-1 Komponente FOSL1 in Melanomen untersucht.

Hierbei konnte zunächst ermittelt werden, dass die FOSL1 Expression im humanen Melanom durch den MAPK-Signalweg vermittelt wird und von den Onkogenen BRAF und NRAS abhängig ist. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Stabilität von FOSL1 durch MAPK reguliert wird.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass FOSL1 in vielen Melanomzellen die Proliferation verstärkt und auch an Migration beteiligt ist. Da diese Prozesse zur Krebsprogression beitragen, deutet dies darauf hin, dass FOSL1 bei der Melanomentwicklung eine wichtige Funktion besitzt. Weiterhin konnten *SLUG*, *SNAI3*, *IL6* und *MMP14* als FOSL1-Zielgene identifiziert werden, deren Regulierbarkeit durch FOSL1, jedoch abhängig von der jeweiligen Zelllinie war. Somit konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass FOSL1 nicht nur, wie zuvor für Brustkrebszellen beschrieben, an Migration beteiligt ist, sondern auch zur Proliferation humaner Melanome beiträgt. Zukünftige Arbeiten werden zeigen, ob die identifizierten Gene für die FOSL1-vermittelte Migration und Proliferation verantwortlich sind.

Summary

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer with the highest mortality rate. Hence, the investigation of this type of cancer is of great importance. The AP-1 transcription factor complex is known to play a major role during initiation and progression of melanoma. This research was aimed at investigating the role of the AP-1 component FOSL1 in melanoma.

Initial determinations showed that in human melanoma the FOSL1 expression is mediated by the MAPK-signaling pathway and dependent on the oncogenes BRAF and NRAS. This finding is supported by the fact that the stability of FOSL1 is regulated by MAPK.

Furthermore, this research revealed that FOSL1 enhances proliferation in several cell lines and also contributed to migration. Since these processes contribute to cancer progression, FOSL1 even seems to play an important role in melanoma development. Moreover, *SLUG*, *SNAI3*, *IL6* and *MMP14* were identified to be target genes of FOSL1. However, the FOSL1-dependent regulation of these genes differed between the cell lines.

Thus, this investigation provides evidence that FOSL1 does not only promote migration, which was described previously in breast cancer, but it also contributes to proliferation of human melanoma. Experiments in the future will unravel if the identified genes are responsible for the FOSL1-mediated migration and proliferation.

Abkürzungsverzeichnis

AKT = Proteinkinase B
AP1 = Activator Protein 1
ATF = activating and transcription factor
bFGF = basic fibroblast growth factor
BSA = bovine serum albumin
CDK4 = cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A = cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
EGF = epidermal-growth-factor
EMT = epithelial mesenchymal transition
ERK = extracellular-signal regulated kinases
FAK = focal adhesion kinase
FRA1 = FOS-related antigen 1
FOSL1 = FOSL-like protein 1
GBR2 = growth factor receptor binding protein-2
GPCR = G-protein-coupled receptor
HER = humaner EGF-Rezeptor
HGF/SF = hepatocyte growth factor/scatter factor
MAPK-Signalweg = mitogen-activated protein kinase Signalweg
MC1R = Melanocortin-1-Rezeptor
MET = mesenchymal-epithelial transition
MEK = mitogen extracellular signal-regulated kinase
MMP = Metalloproteinase
NCLC = non-small cell lung cancer
 α -MSH = melanocyte-stimulating hormone
PI3K-Signalweg = phosphoinositide-3-kinase
PDK1 = 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PTEN = phosphatase and tensin homologue

Rb-Signalweg = Retinoblastom-Protein-Signalweg

RGP = radial growth phase

RhoA = Ras homolog gene family, member A

RTK = Rezeptortyrosinkinase

SCLC = small cell lung cancer

SOS = son of sevenless

SRC Kinase = Sarcoma Kinase

STAT5 = signal transducer and activator of transcription 5

TGF- β = transforming growth factor β

TF = Transkriptionsfaktor

TWIST = Twist-related protein 1

VGP = vertical growth phase

Xmrk = *Xiphophorus* melanoma receptor kinase

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Entstehung und Entwicklung von Melanomen	1
1.1.1 Stadien der Melanomentstehung	1
1.1.2 Die Genetik von erblich bedingten Melanomen.....	3
1.1.3 Die Genetik von spontan entstehenden Melanomen und die damit zusammenhängenden Signalwege.....	5
1.1.4 Rezeptortyrosinkinasen und ihre Bedeutung in der Tumorgenese	8
1.2 Das Xiphophorus-Melanom-Modell	10
1.2.1 Das Xiphophorus-Modell.....	10
1.2.2 Das Onkogen Xmrk.....	11
1.2.3 Der HERmrk-Rezeptor	12
1.3 FOSL1 in der Tumorgenese	16
1.3.1 Der AP1-Komplex	16
1.3.2 FOSL1 bei der Entstehung und Entwicklung von Tumoren.....	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien.....	21
2.1.2 Verwendete Zelllinien.....	26
2.1.3 Bakterienstämme	26
2.1.4 Plasmidkonstrukte.....	27
2.1.5 Oligonukleotide	27

2.1.6	Marker.....	29
2.1.7	Kits.....	29
2.1.8	Inhibitoren.....	29
2.1.9	Antikörper und Sekundärreagenzien.....	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen.....	30
2.2.2	Stimulation eukaryontischer Zellen.....	31
2.2.3	Zellzahlbestimmung.....	32
2.2.4	Proliferationsassays.....	32
2.2.5	Softagar Assay.....	36
2.2.6	siRNA Transfektion.....	32
2.2.7	Virale Infektion.....	33
2.2.8	Boydenkammerassay.....	34
2.2.9	Proteinbiochemische Methoden.....	35
2.2.9.1	Aufschluss eukaryontischer Zellen zur Gewinnung zellulärer Proteine.....	35
2.2.9.2	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....	36
2.2.10	Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.2.11	Western Blot Analyse.....	37
2.2.11.1	Protein-Transfer auf Nitrozellulose-Membran.....	37
2.2.11.2	Immunologische Detektion.....	38
2.2.12	Molekularbiologische DNA-Methoden.....	39
2.2.12.1	Real-Time PCR.....	39
2.2.12.2	Klonierung.....	40
2.2.12.3	Ligation.....	41
2.2.12.4	Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	41
2.2.12.5	Kolonie-PCR.....	42
2.2.13	Molekularbiologische RNA-Methoden.....	41
2.2.13.1	RNA-Extraktion.....	43

2.2.13.2 cDNA-Synthese	43
3. Ergebnisse	44
3.1 FOSL1 in HERmrk-transgenen Melanozyten.....	44
3.1.1 Die Protein- und mRNA Expression von FOS Proteinen in HERmrk-transgenen Mausmelanozyten	44
3.1.2 Expression der mRNA von FOSL1 in Abhängigkeit von unterschiedlichen Melanom-relevanten Signalwegen.....	47
3.2 Die Rolle von FOSL1 im humanen Melanom.....	51
3.2.1 Die Expression von FOS Proteinen in humanen Melanomzelllinien in Abhängigkeit vom MAPK- und PI3K- Signalweg	51
3.2.2 Die Untersuchung der Proliferation, Migration und Koloniebildung von humanen Melanomzellen	53
3.3 Potentielle Zielgene von FOSL1	57
4. Diskussion	64
5. Fazit und Ausblick.....	74
Literaturverzeichnis.....	75
Anhang A – Zusätzliche Ergebnisse	84
Lebenslauf	87
Danksagung	88
Eidesstattliche Erklärung.....	89

1. Einleitung

1.1 Entstehung und Entwicklung von Melanomen

1.1.1 Stadien der Melanomentstehung

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird jeder dritte Tumor als Hautkrebs diagnostiziert. Grundsätzlich unterscheidet man beim Hautkrebs zwischen Basaliomen, Spinaliomen und Melanomen. Obwohl Melanome mit 132.000 Fällen wesentlich seltener auftreten als Basaliome (Abb. 1 a) und Spinaliome (Abb. 1 b) mit 2-3 Millionen, handelt es sich bei Melanomen (Abb. 1 c) um die Form von Hautkrebs mit der höchsten Mortalität (<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>). Seit Mitte 1960 nahm die Anzahl der an Melanomen Erkrankten um 3-8% bei Menschen mit europäischen Wurzeln zu. Darüber hinaus ist besonders in den letzten Jahrzehnten ein starker Anstieg der Inzidenz von Melanomen zu beobachten. Dies verdeutlicht, dass die genauere Erforschung dieser Krebserkrankung zur Entwicklung neuer Therapieformen von immenser Wichtigkeit ist (Beddingfield, 2003; Armstrong 2004; Thompson *et al.*, 2005).

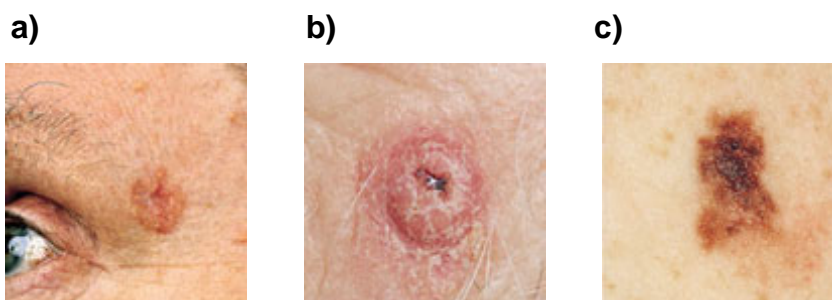


Abb. 1. Die drei unterschiedlichen Hautkrebsarten

- (1 a) das Basaliom
- (1 b) das Spinaliom
- (1 c) das Melanom

<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>

Melanome entstehen durch die maligne Transformation von Melanozyten, die Pigmente synthetisieren. Diese Melanozyten befinden sich größtenteils in der Basalschicht der Epidermis, kommen aber auch im menschlichen Auge vor. Sie produzieren Melanine, die für die Pigmentierung von Haar- und Hautzellen verantwortlich sind. Durch die epidermalen Keratinozyten wird die Homöostase der Melanozyten kontrolliert. Keratinozyten sezernieren unter UV-Strahlung Faktoren, die Differenzierung, Proliferation, Überleben und Mortalität von Melanozyten regulieren, was zur Initiation der Melaninproduktion führt (Thompson *et al.* 2005; Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Durch diesen Prozess kommt es zur Hautbräunung bei Sonneneinstrahlung. Somit dient dieser Mechanismus dazu, die Haut vor der UV-Strahlung zu schützen. Die maligne Transformation von Melanozyten entsteht durch eine gestörte Signaltransduktion in diesen Zellen und führt zur Entwicklung von malignen Melanomen (Thompson *et al.*, 2005; Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Die Phasen der Melanomentstehung von der malignen Transformation der Melanozyten bis zum malignen Melanom sind in Abb. 2 dargestellt. Dieser Prozess ist zwar mehrphasig, aber es werden nicht immer alle Stadien durchlaufen. Die Naevi, also eine Ansammlung von Melanozyten, die in der ersten Phase - der Transformation – auftreten, sind meist gutartig. Jedoch können aus diesen Naevi in der „radial growth phase“ (RGP) Melanome entstehen. Für diese sogenannten RGP-Melanome ist eine erhöhte Proliferation charakteristisch. In dieser Phase kommt es zum lateralen Wachstum der Melanozyten, das jedoch auf die Epidermis beschränkt bleibt. In der „vertical growth phase“ (VGP) erfolgt die Invasion der Melanozyten in die Dermis. Hierbei kommt es zur Infiltration von Lymph- und Blutgefäßen. Dadurch kann ein metastasierendes malignes Melanom, das sich über das lymphatische und vaskuläre System schnell ausbreiten kann, entstehen (Balch *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Miller & Mihm 2006; Gray-Schopfer, 2007).

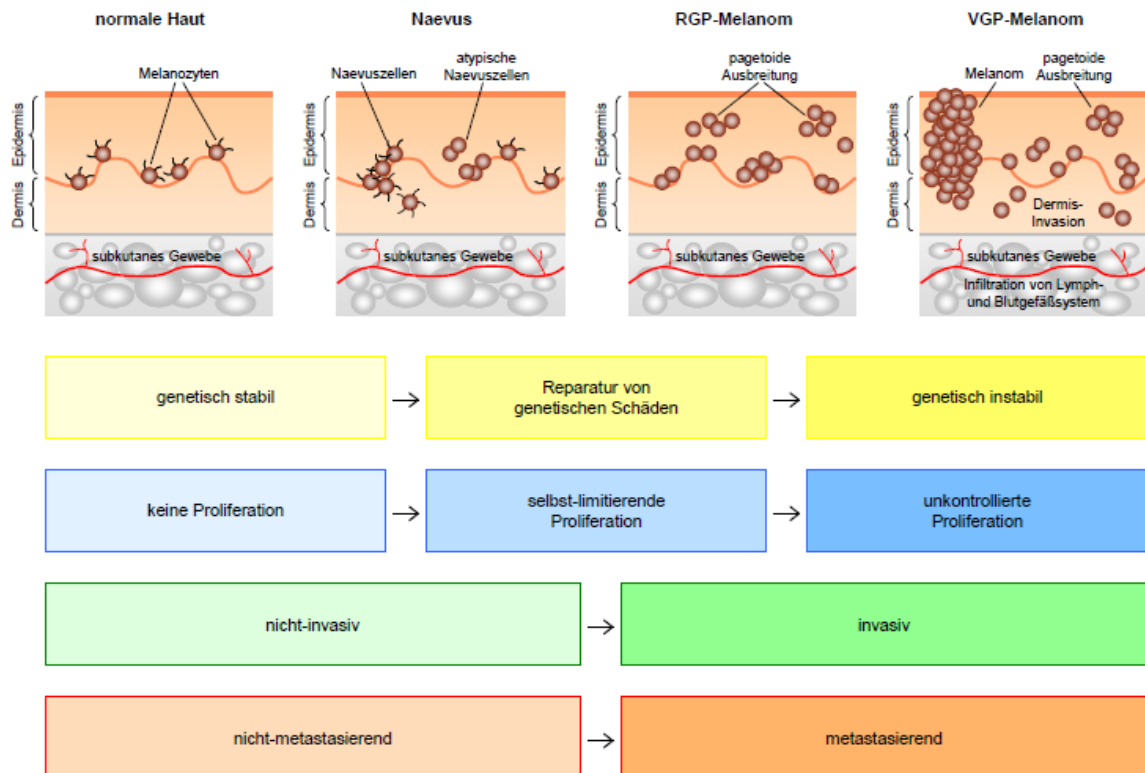


Abb. 2. Entstehung eines malignen Melanoms aus transformierten Melanozyten. Während dieses Prozesses kommt es zu einer Abnahme der genetischen Stabilität der Zellen; jedoch nehmen Proliferation, Invasivität und die Bildung von Metastasen zu (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

1.1.2 Die Genetik von erblich bedingten Melanomen

Melanome entstehen bis zu 90% sporadisch und bis zu 10% durch Vererbung bedingt (familiär). Letztere entstehen durch Mutationen in den Zellen der Keimbahn und können somit von einer Generation zur nächsten weitervererbt werden. An der Entstehung von familiären Melanomen ist in 30-40% der Fälle eine Mutation des Tumorsuppressorgens „cyclin-dependent kinase inhibitor 2A“ (*CDKN2A*) beteiligt (Bishop *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005; High & Robinson, 2007).

Weitere Suszeptibilitätsgene außer *CDKN2A* sind der Melanocortin Rezeptor 1 (*MCR1*) und ein Onkogen, die „cyclin dependent kinase 4“ (*CDK4*).

CDKN2A kodiert für 2 Proteine: p14^{ARF} („alternative reading frame“), welches den p53 Signalweg verstärkt und p16, das eine entscheidende Rolle im Retinoblastom-Protein (Rb-) Signalweg spielt (Hussusian *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994; Zuo *et al.*, 1996; Tucker & Goldstein *et al.*, 2003). p16 inhibiert die CDK4/6 vermittelte Phosphorylierung und Inaktivierung von Rb (Serrano *et al.*, 1993; Chin, 2003). p14^{ARF} hemmt indirekt die Degradierung von p53 (Zhang *et al.*, 1998; Chin, 2003). Somit können beide Produkte von *CDKN2A* einen Arrest der Zellen am Kontrollpunkt G1-S des Zellzyklus auslösen. Damit wird der Übergang von Zellen mit DNA-Schäden, die zur Entstehung von Krebs und Immortalität beitragen, in die S-Phase verhindert. Ist jedoch *CDKN2A* wie in den betroffenen familiären Melanome mutiert, können p14^{ARF} und p16 den oben beschriebenen G1-S-Arrest nicht mehr auslösen (Zhang *et al.*, 1998; Chin, 2003). Das Risiko der Melanomentstehung ist bei einer *CDKN2A* Mutation um das 70-fache erhöht (Sharpless & Chin, 2003; Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Durch Mutationen von CDK4 wird die Phosphorylierung von Rb unterbunden. Dadurch kommt es zu keinem G1-S-Arrest während des Zellzyklus – die Zellen beginnen unkontrolliert zu proliferieren (Udayakumar *et al.*, 2010).

Der humane MC1R ist ein „G-protein-coupled receptor“ (GPCR) und wird auf epidermalen Melanozyten exprimiert. Dieser Rezeptor wird von seinem Liganden, dem „melanocyte-stimulating hormone“ (α -MSH) gebunden, dessen Bildung durch vermehrte UV-Licht-Exposition verstärkt wird. Die Aktivierung des MC1R führt zu einer G-Protein-stimulierten cAMP Bildung in den Melanozyten. Dadurch wird die Aktivität des Melanin synthetisierenden Enzyms Tyrosinase erhöht. In humaner Haut und Haaren findet man zwei Formen von Melanin – das Eumelanin, ein schwarz-braunes Pigment, und das rot-gelbliche Pheomelanin. Durch *MC1R*-Expression wird vermehrt Eumelanin gebildet, welches die Haut vor schädlichen UV-Strahlen schützt. Bestimmte Mutationen des MC1R führen dagegen zu einer verstärkten Bildung von Pheomelanin und somit zu einem sehr viel geringeren Schutz der Haut gegenüber UV-Strahlen (Busca & Ballotti, 2000; Chin, 2003; Wildlund & Fisher, 2005).

1.1.3 Die Genetik von spontan entstehenden Melanomen und die damit zusammenhängenden Signalwege

Ein Melanom kann spontan entstehen, wenn es in den Melanozyten zur Akkumulation von Abnormalitäten oder Mutationen in bestimmten Signalwegen kommt. Die Mutation entsteht zunächst in einem Melanozyt und wird dann an die nächste Generation weitergegeben. Wie in vielen genetischen und epidemiologischen Studien gezeigt wurde, sind UV-Strahlen an der Entstehung dieser somatischen Mutationen maßgeblich beteiligt (Clark *et al.*, 1984; Miller & Mihm 2006; Invry *et al.*, 2006; Maddodi & Setaluri, 2008). Besonders die Kombination von ständiger intensiver UV-Licht-Bestrahlung und Sonnenbränden im Kindesalter erhöhen das Risiko für eine Melanomentwicklung im Erwachsenenalter. Darüber hinaus stellen auch eine helle Hautfarbe, rote Haare und das Vorhandensein von multiplen benignen (gutartigen) oder dysplastischen Naevi (Muttermalen) ein erhöhtes Risiko dar, an Melanomen zu erkranken (Armstrong & Kicker, 2001; Chin, 2003). Ultraviolette Strahlen fördern maligne Veränderungen in der Haut, indem sie direkt mutagene DNA-Veränderungen auslösen. Außerdem stimulieren sie die Produktion von Wachstumsfaktoren in der Haut. Hierbei wird die natürliche Immunabwehr der Haut geschwächt und es werden verstärkt reaktive Sauerstoffspezies produziert. Diese Veränderungen ermöglichen es den Melanozyten, sich der Kontrolle durch die Keratinozyten zu entziehen. Dadurch wird die Apoptose der Melanozyten gehemmt und ihre Proliferation induziert (Thompson *et al.*, 2005; Gray Schopfer *et al.*, 2007).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der MAPK-Signalweg (mitogen-activated protein kinase pathway) eine wichtige Rolle bei der Melanomentwicklung spielt. Wie in Abb. 3 dargestellt ist, werden hierbei Wachstumsfaktorsignale durch Rezeptor-tyrosinkinasen (RTK) an der Zelloberfläche übermittelt. Diese RTKs werden durch die Bindung des Liganden (z.B. Wachstumsfaktoren) autophosphoryliert und assoziieren durch unterschiedliche Adaptorproteine (z.B. GRB2) mit RAS. Das aktivierte RAS löst eine Phosphorylierungskaskade aus, die RAF, MEK und ERK beinhaltet. Das zuletzt

phosphorylierte ERK transloziert zum Nukleus. Dort aktiviert es Transkriptionsfaktoren (TF), wie zum Beispiel die TFs des AP1-(activator protein 1) Komplexes, die bei der Proliferation eine wichtige Rolle spielen. Mehrere Komponenten des ERK Signalwegs (RTK-Gene, *NRAS* und *BRAF*) sind Protoonkogene, die durch Mutationen oder Amplifikationen in malignen Melanomen aktiviert werden (Dahl & Guldborg, 2007; Chin, 2003). Beim MAPK-Signalweg liegen N-RAS Mutationen in ca. 15% und BRAF Mutationen in etwa 66% der Melanome vor (Takata & Saida *et al.*, 2006). Aktivierende NRAS und BRAF Mutationen führen zu Veränderungen in zellulären Prozessen, wodurch Proliferation, verminderte Apoptose, Überleben und Adhäsion in der extrazellulären Matrix und der Verlust der Keratinozyten-gesteuerten Kontrolle ausgelöst werden (Becker *et al.*, 2006).

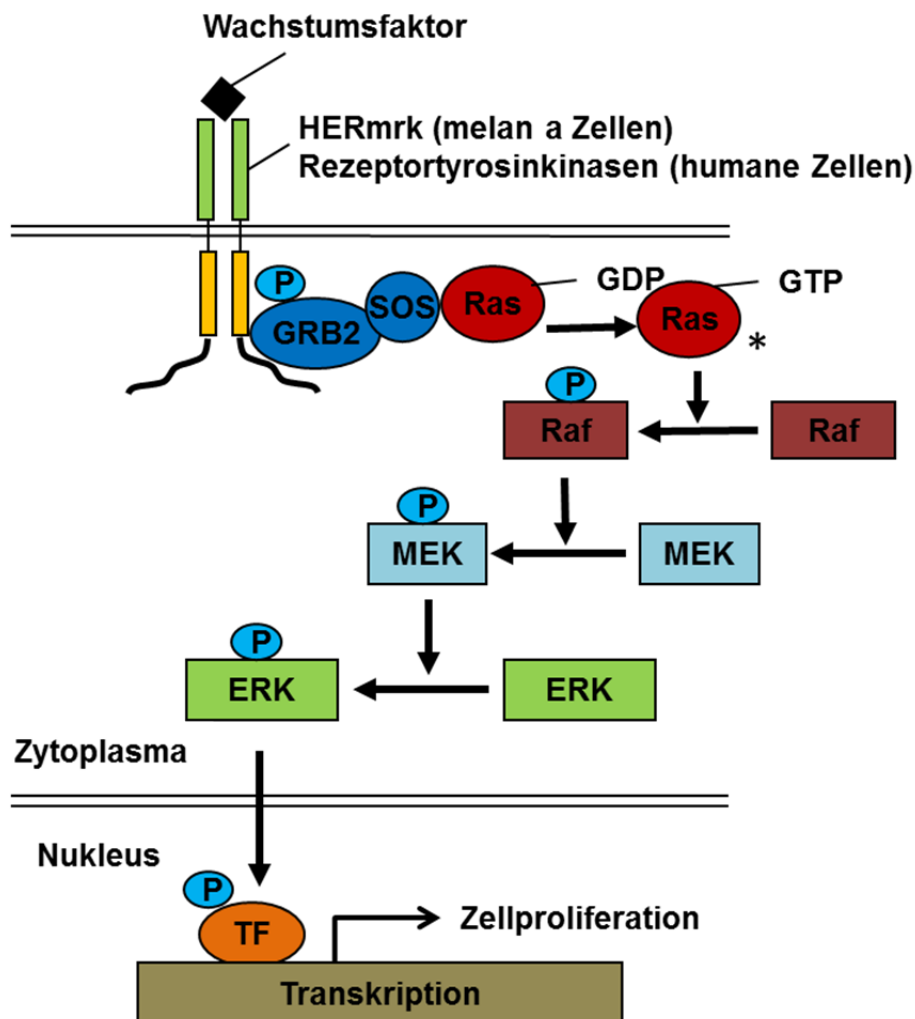


Abb. 3. Der MAPK-Signalweg – einer der Hauptsignalwege in der humanen Melanomentstehung. Durch die Bindung einer RTK wird der Ligand autophosphoryliert und assoziiert mit RAS. Das aktivierte RAS (mit einem * gekennzeichnet) leitet eine Phosphorylierungskaskade von RAF, MEK und ERK ein und aktiviert im Nucleus Transkriptionsfaktoren, die für die Zellproliferation entscheidend sind (Dahl & Gulberg, 2007). P, Phosphat; restliche Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

Darüber hinaus spielt eine Hyperaktivierung des PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase) Signaltransduktionswegs eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von sporadischen Melanomen. Wie Abb. 4 entnommen werden kann, sorgt eine Mutation im Gen des Tumorsuppressors PTEN (phosphatase and tensin homologue) dafür, dass die negative Regulation des PI3K/AKT Signalwegs außer Kraft gesetzt wird, was wiederum starke Proliferation und Überlebenssignale auslöst (Dahl & Gulberg,

2007). Mutationen von *PTEN* findet man in bis zu 20% der Melanome. Mutationen im Gen, das für PI3K kodiert (*PIK3CA*), treten in weniger als 5% der Melanome auf. Im Gegensatz dazu sind Amplifikationen der Proteinkinase B (PKB, auch AKT genannt) in 40-60% der Melanome zu finden (Dahl & Gulberg, 2007).

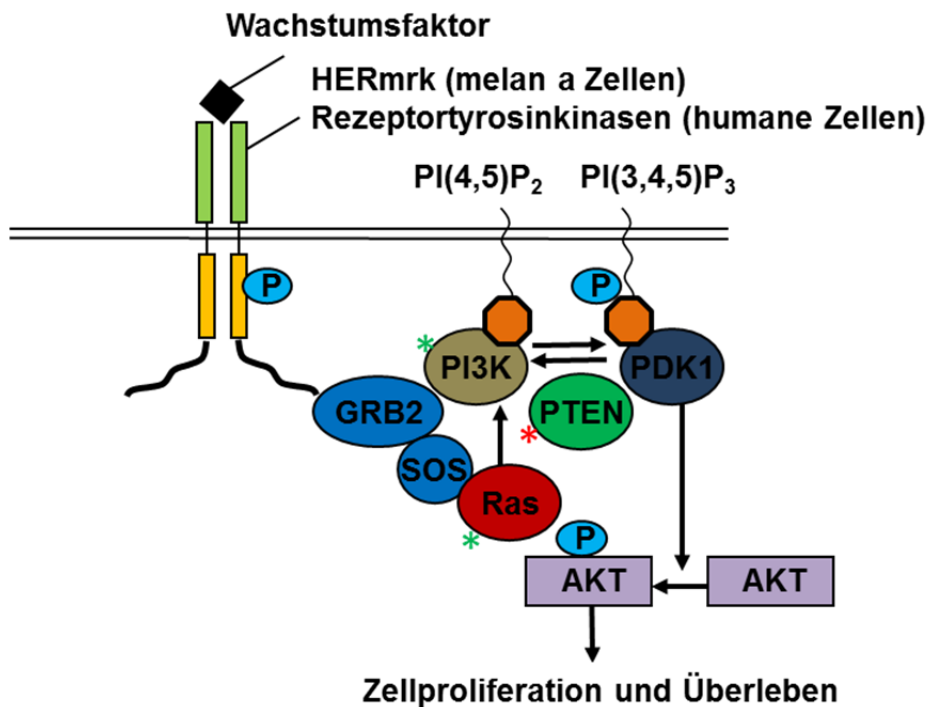


Abb. 4: PI3K-Signalweg – einer der Hauptsignalwege in der humanen Melanomentstehung. Durch eine Phosphorylierungskaskade wird AKT phosphoryliert, was Proliferation und Überleben der Zellen beeinflusst (Dahl & Gulberg, 2007). * in Melanomen häufig aktiviert; * in Melanomen häufig inaktiviert; P, Phosphat; ● Phosphatidylinositolbisphosphat; restliche Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

1.1.4 Rezeptortyrosinkinasen und ihre Bedeutung in der Tumorgenese

Bei der Entwicklung von vielzelligen Organismen spielen RTKs eine wichtige Rolle, weshalb ihre Aktivität strenger Kontrolle unterliegen muss. Durch die Bindung eines Liganden an die RTK werden eine Dimerisierung und dadurch eine Autophosphorylierung des Rezeptors ausgelöst. Dies wiederum führt zur Aktivierung der Rezeptoren. An spezifischen Phosphotyrosinen können unterschiedliche

Substrate andocken und dadurch intrazelluläre Signalkaskaden auslösen (Schlessinger, 2000). Wenn die RTKs konstitutiv aktiv sind und dadurch eine permanente Signalinduktion stattfindet, können Krankheiten entstehen (Robertson *et al.*, 2000).

Eine permanente Aktivierung der RTKs kann durch eine Trunkierung der extrazellulären Domäne ausgelöst werden. Beispiele hierfür sind eine in malignen Gliomen vorkommende EGF-(epidermal-growth-factor) Rezeptor-Variante und die viralen Onkogene v-kit und v-ErbB. v-kit ist eine mutierte und trunkierte Mutation von c-Kit; bei v-ErbB handelt es sich um eine Mutation des EGF-Rezeptors, der Sequenzen in der Ligandenbindungsektodomäne fehlen (Besmer *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 1997; Boissan *et al.*; 2000). Laisney *et al.* (2012) zeigten außerdem, dass autokrine oder parakrine Loops auf predimerisierte onkogene EGFRs einwirken und dadurch zu deren protumorigenetischen „signalling“.

Darüber hinaus kann eine Überexpression von RTKs, die durch modifizierte Transkriptionsregulation oder Genamplifikation hervorgerufen wurde, ebenfalls zur konstitutiven Aktivierung von RTKs führen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist HER2, der humane EGF-Rezeptor 2. Dieser Rezeptor steuert das Zellwachstum, Differenzierung und Überleben und ist im Brustkrebs oft amplifiziert oder überexprimiert (Rana *et al.*, 2012).

Außerdem können RTKs auch durch aberrante Ligandenproduktion aktiviert werden – v.a. in Tumoren (Sunbaram, 2013).

In den meisten Melanomzellen sind im Vergleich zu normalen Melanozyten die bFGF Expressionslevel erhöht, wodurch es zu einer konstitutiv autokrinen Stimulierung des bFGF-Rezeptors in den Melanozyten kommt. Dies führt wiederum zur Begünstigung der Melanomentstehung (Hirobe *et al.*, 2013).

Außerdem können Mutationen in allen funktionalen Domänen zur Erhöhung der RTK-Aktivität führen. Bei diesen funktionellen Domänen handelt es sich um die Regionen der Substratbindung, die Kinasedomäne, den Transmembranbereich und die Extrazellulärdomänen (Sternberg & Gullick, 1989; Songyang *et al.*, 1995; Webster *et al.*, 1996; Webster & Donoghue, 1996; Anderson *et al.*, 1998).

Als ein Beispiel für derartige Mutationen kann das Melanom-induzierende Onkogen „*Xiphophorus melanoma receptor kinase*“ (Xmrk) genannt werden. Die RTK Xmrk löst die Entstehung von malignen Melanomen in Fischen der Gattung *Xiphophorus* aus und wird daher als Modellsystem in der Melanomforschung verwendet (Anders *et al.*, 1984; Dimitrijevic *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2001; Meierjohann *et al.*, 2006a; Meierjohann & Schartl, 2006).

1.2 Das *Xiphophorus*-Melanom-Modell

1.2.1 Das *Xiphophorus*-Modell

Die meisten Arten der Gattung *Xiphophorus* eignen sich sehr gut für die Züchtung im Labor. In diesen Fischen kann durch selektive Züchtung die Entstehung von malignen Melanomen ausgelöst werden. Das klassische Kreuzungsschema aus den 20er Jahren verdeutlicht, wie *Xiphophorus*-Hybride mit malignen Melanomen gezüchtet werden können (Gordon, 1927; Kosswig, 1928) (Abb. 5). Grundlegend hierfür ist, dass zwischen dem dominanten, Tumor-induzierten Locus (*Tu*) und dem regulatorischen Locus (*R*), der vermutlich für die Repression von *Tu* verantwortlich ist, ein Ungleichgewicht besteht. *Tu* und *R* sind in *X. maculatus* (Platyfisch, Spiegelkärpfling) auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Daher können beide Loci separiert werden, indem man *X. maculatus* mit der Spezies *X. hellerii*, bei welcher *Tu* und *R* nicht vorhanden sind, kreuzt.

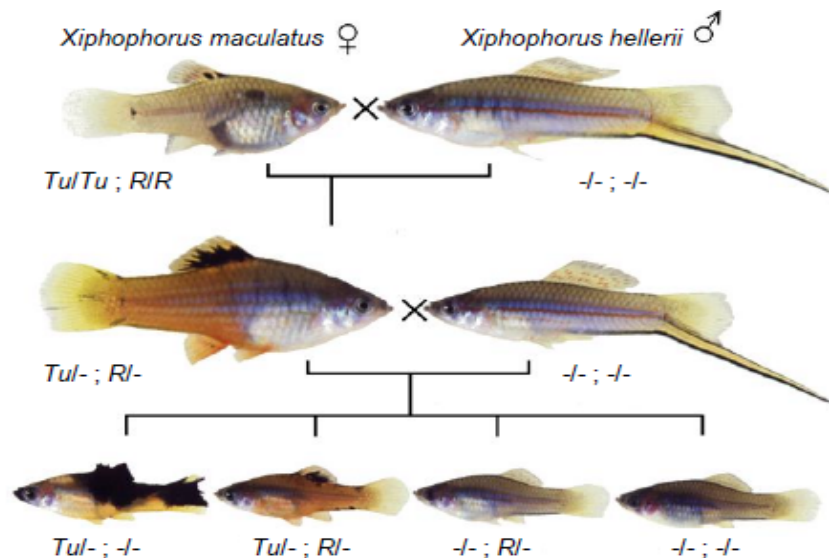


Abb. 5. Klassisches Kreuzungsschema von *X. maculatus* mit *X. hellerii*. Hierbei entstehen Nachkommen mit malignen Melanomen ($Tu/-/-$), benignen Läsionen ($Tu/-; R/-$) bzw. ohne veränderten Phänotyp ($-/-; -/-$) (Meierjohann & Schartl, 2006).

Durch Kreuzung von *X. maculatus* mit *X. hellerii* entstehen in der F1-Generation Nachkommen, die heterozygot für *Tu* und *R* sind. Diese Fische entwickeln durch den Verlust von einer *R*-Kopie benigne Pigmentzell-Läsionen. Kreuzt man diese Fische mit *X. hellerii*, haben 25% der Nachkommen keine Kopie mehr von *R* und sind heterozygot für *Tu*. In diesen ($Tu/-/-$) Fischen ist *Tu* außer Kontrolle. Das bedeutet, dass *Tu* überexprimiert wird und es zur Entfaltung seiner onkogenen Potentials kommt.

1.2.2 Das Onkogen Xmrk

Xmrk (*Xiphophorus melanoma receptor kinase*) entstand aus einer Tandemgen Duplikation des *Xiphophorus EGFR* Gens, welches dem korrespondierenden Protoonkogen und dem Fischortholog des humanen EGFR entspricht. Die onkogenen Eigenschaften von Xmrk entstehen durch zwei aktivierende Mutationen in der extrazellulären Domäne des Wachstumsfaktor-Rezeptors, die nach der Duplikation der Protoonkogene auftreten. Aufgrund von zwei Aminosäure-Austauschen kommt es zu einer Liganden-unabhängigen intrazellulären Signalübertragung. Das aktivierte Xmrk Protein sendet dauerhaft Wachstum-

faktorsignale aus, die eine Reihe von zellulären Antworten hervorrufen, die den neoplastischen Phänotyp von Melanomzellen bestimmen (Meierjohann & Scharf, 2006).

1.2.3 Der HERmrk-Rezeptor

Da Xmrk aufgrund seiner Dimerisierung permanent aktiv ist, ist es schwierig zwischen dem aktiven und dem inaktiven Zustand des Rezeptors zu unterscheiden. Deshalb wurde eine Chimäre, deren extrazelluläre Xmrk Domäne durch den orthologen Bereich des humanen EGF-Rezeptors („HER“) ersetzt wurde, konstruiert. Bei dieser Chimäre kann Xmrk nun Liganden-abhängig induziert werden, was die Untersuchung von Xmrk-spezifischen Signalwegen erleichtert (Wellbrock *et al.*, 1998, 1999, 2002; Meierjohann *et al.*, 2006; Teutschbein *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurden murine Melanozyten mit mittlerer Expressionsstärke des HERmrk-Rezeptors verwendet (genannt „HERmrk^{me}“ oder „Hm^{me}“, s. auch Leikam *et al.*, 2008).

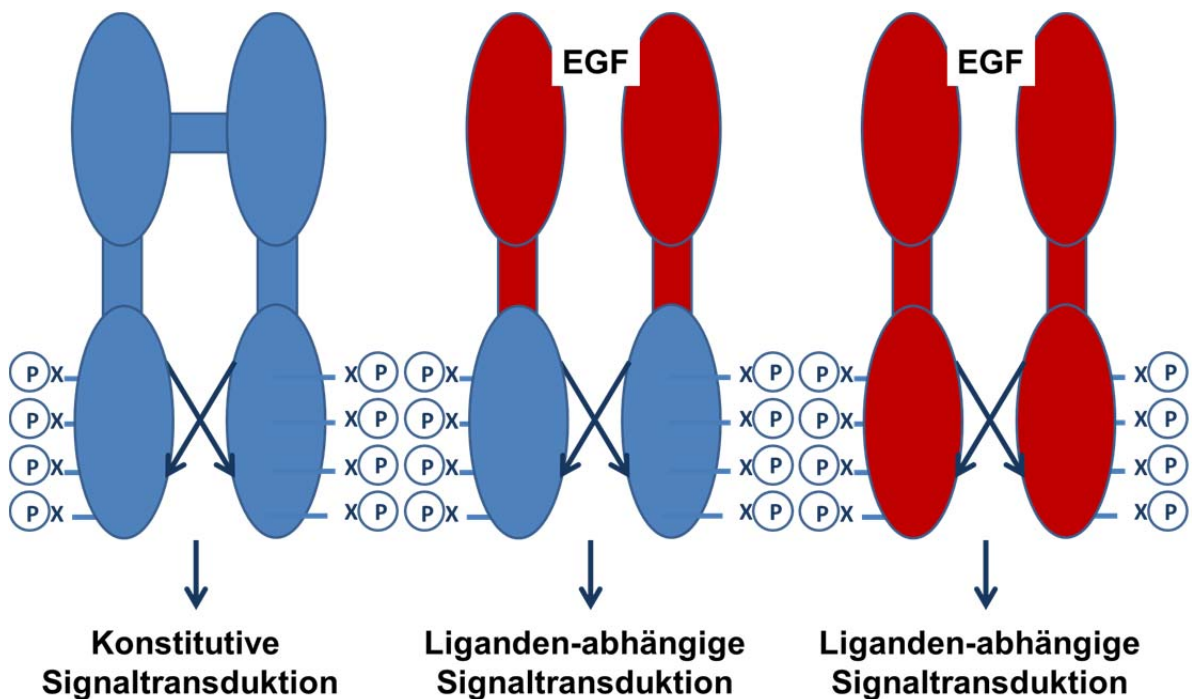


Abb. 6. HERmrk – eine Chimäre aus Xmrk und HER.

- Eine Liganden-unabhängige Dimerisierung von Xmrk und eine konstitutive Signaltransduktion des Rezeptors werden durch Mutationen in der extrazellulären Domäne ausgelöst.
- HERmrk entsteht aus dem intrazellulären Teil von Xmrk (mrk) und dem extrazellulären Teil des humanen EGF-Rezeptors (HER). Die Signaltransduktion wird durch Stimulierung des Rezeptors mit humanem EGF induziert.
- Bindet der Ligand EGF an den humanen EGF-Rezeptor (HER), wird dieser aktiviert und es kommt zur Signaltransduktion.

Die intrazellulären Interaktionspartner, und damit auch die Signaltransduktion, entsprechen denen des ursprünglichen Rezeptors Xmrk. Dieser vermittelt sein onkogenes Signal durch Signalwege wie die RAS/RAF/MAPK- und PI3K/AKT-Kaskade, die in humanen Melanomen oftmals dereguliert sind (Abb. 7). Der PI3K/AKT-Signalweg wird durch eine Aktivierung von STAT 5 (signal transducer and activator of transcription 5) aktiviert, was die Proliferation und antiapoptotische Signale begünstigt. Die Aktivierung des RAS/RAF/MAPK-Signalwegs durch Xmrk führt zu verstärkter Proliferation und Differenzierung. Darüber hinaus aktiviert Xmrk, wie in Abb. 7 dargestellt, die Tyrosinkinase Fyn, wodurch einerseits verstärkt MAP-Kinasen aktiviert werden, was wiederum eine verstärkte Proliferation und

Differenzierung auslöst. Andererseits vermittelt Fyn gemeinsam mit FAK (focal adhesion kinase) die Zellmigration (Meierjohann *et al.*, 2006).

Die Aktivierung von HERmrk bzw. Tyrosinkinase führt zu einer Aktivierung des RAS/RAF/MAPK-Signalwegs, was wiederum eine verstärkte Expression der Metalloproteinasen (MMP) 1, 3, 9 und 13 auslöst (Meierjohann *et. al*, 2010). Die Rolle von MMP13 bei der Proliferation von Melanozyten und Melanomzellen kann mit nicht-klassischen MMP Funktionen außerhalb der Zellen und Zellzykluskontrolle in Zusammenhang gebracht werden. Die Signaltransduktions-„Events“, die für diesen Prozess verantwortlich sind, konnten bisher noch nicht geklärt werden. Möglicherweise könnten daran Matrix- und Oberflächenproteinen beteiligt sein und eine von MMP13 abhängige Spaltung stattfinden. In Plattenepithelkarzinomen generieren MMPs autokrine Schleifen, die verschiedene Rezeptoren der EGFR-Familie stimulieren und in den Zellen verstärkte Proliferation auslösen. Es wäre sehr gut möglich, dass derselbe Effekt auch in HERmrk Zellen auftritt, da verschiedene Substrate wie TGF- β (transforming growth factor β) oder Fibrinogen bereits bekannt sind (Deng *et. al*, 2000).

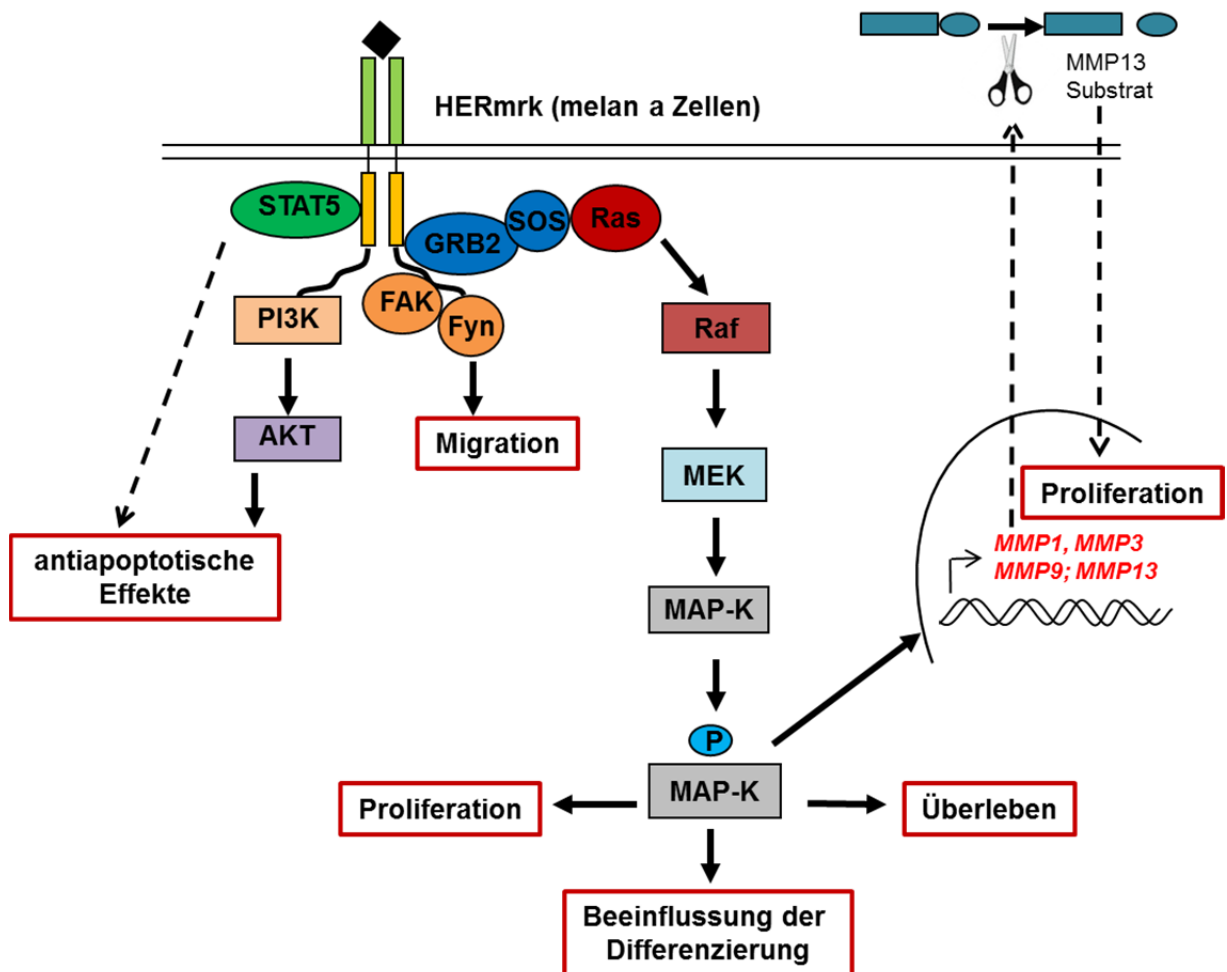


Abb. 7. Xmrk-abhängige Signalvermittlung. Über STAT5, Fyn, den MAPK- bzw. PI3K-Signalweg werden antiapoptotische Effekte, Überleben, Proliferation, Migration und die Hemmung der Differenzierung in HERmrk-Zellen verstärkt.

Die in dieser Arbeit verwendeten melan a HERmrk Mausmelanozyten sind stabil mit HERmrk transfiziert und exprimieren keinen endogenen EGF-Rezeptor. Daher eignen sie sich sehr gut zur Untersuchung der Xmrk-abhängigen Signaltransduktion (Wellbrock *et al.*, 2002).

1.3 FOSL1 in der Tumorgenese

1.3.1 Der AP1-Komplex

Der AP1-Komplex ist ein Transkriptionsfaktor, der vorwiegend aus Proteinen der JUN und FOS Familie besteht. Zu den JUN Proteinen gehören cJUN, JUNB und JUND, zu den FOS Proteinen FOSL1, FOSL2, cFOS und FOSB. Dieser Komplex bindet DNA-Zielsequenzen als JUN/JUN Homodimere oder JUN/FOS Heterodimere (Wagner, 2002). Die Transaktivierungspotentiale der verschiedenen JUN und FOS Proteine unterscheiden sich signifikant. cJUN, cFOS und FOSB zählen zu den starken Transaktivatoren, wohingegen JUNB, JUND, FOSL1 und FOSL2 nur ein schwaches Transaktivierungspotential aufweisen. JUN Proteine können als Homo- und Heterodimere vorliegen. Im Gegensatz dazu können FOS Proteine nicht homodimerisieren; sie bilden stabile Heterodimere mit JUN Proteinen und verstärken somit ihre DNA-Bindungsaktivität (Hess *et al.*, 2004). Durch diverse Stimuli wie Komplex aktiviert werden. Viele zelluläre Funktionen, einschließlich Proliferation, Differenzierung, Stressantworten und Apoptose werden durch AP-1 reguliert. Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass der AP1-Komplex an vielen unterschiedlichen pathogenen Prozessen, wie z.B. der Tumorgenese, beteiligt ist (Young *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 2004; Basbous *et al.*, 2007).

cJUN ist das am besten untersuchte AP1-Komplex Protein. Es ist an der transkriptionellen Aktivierung von FOSL1 beteiligt und spielt daher für die *FOSL1* Expression eine entscheidende Rolle. Außerdem ist cJUN in vielen *in vivo* und *in vitro* Umgebungen als Onkogen aktiv. In der Melanomforschung ist cJUN von großer Bedeutung, da es bei der Entstehung und Progression von humanen Melanomen eine wichtige Rolle spielt, indem es die AP1-Aktivität und damit Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Stressantworten reguliert. Diese Eigenschaften werden durch Zielgene wie *E-* und *N-Cadherin*, *SNAI1* und *MMP14* vermittelt (Young *et al.*, 2001; Basbous *et al.*, 2007; Spangler *et al.*, 2011).

1.3.2 FOSL1 bei der Entstehung und Entwicklung von Tumoren

Microarray Untersuchungen zeigten bereits, dass in HERmrk melan a Mausmelanozyten die FOSL1 Level hochreguliert sind. Außerdem zeigten erste Experimente bei diesen Studien, dass FOSL1 in den humanen Melanomzellen MelJuso und A375 nach einem FOSL1 Knock-down in geringerem Maß proliferieren und bei MelJuso Zellen auch die Migration durch den Knock-down vermindert wird (Teutschbein *et al.*, 2010).

In unterschiedlichen Krebsarten, wie beispielsweise Brust-, Darm- und Lungenkrebs, konnten erhöhte FOSL1 mRNA und Proteinlevel nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch eine erhöhte FOSL1 Transkription Invasion und Proliferation verstärkt werden, was wiederum die Krebsentstehung und -weiterentwicklung begünstigt (Young *et al.*, 2001; Young & Colburn, 2006). Darüber hinaus zeigten Shin *et al.*, dass FOSL1 in mamillären Epithelzellen für die RAS- und ERK2-induzierte „epithelial-mesenchymal-transition“ (EMT) verantwortlich ist (Shin *et al.*, 2010). Die EMT ist ein Prozess, der an der Induktion der Metastasierung beteiligt ist und im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird.

In vielen Krebszellen epithelialen Ursprungs findet die komplette oder teilweise EMT statt. Hierbei beginnt zunächst ein normales Epithelium auf einer Basalmembran zu proliferieren. Dadurch entstehen im nächsten Schritt Adenome. Weitere Transformationen, die durch epigenetische und genetische Veränderungen ausgelöst werden, führen zur Bildung eines Karzinoms *in situ*, das immer noch von einer intakten Basalmembran umgeben ist. Durch weitere Veränderungen können lokale Disseminationen von Karzinomzellen durch EMT induziert werden. Durch diesen Prozess wird die Basalmembran fragmentiert und es kommt zu einer Invasion der Krebszellen in Lymph- und Blutgefäße. Dies ermöglicht den passiven Transport in weiter entfernte Organe. An sekundären Organen können die Karzinomzellen extravasieren und bleiben entweder einzeln (Mikrometastasierung) oder sie bilden neue Karzinome durch mesenchymal-epithelial transition (MET) (Thiery, 2002).

In Melanozyten, die zwar nicht epithelialen Ursprungs sind, finden dennoch EMT-ähnliche Prozesse wie Migration, Invasion und Extravasation als statt (Gupta *et al.*, 2005; Shirley *et al.*, 2012).

Es ist bekannt, dass an der Induktion der EMT unter anderem die SNAIL-Proteine SNAIL1, SLUG (SNAIL2) und TWIST1 beteiligt sind (Casas *et al.*, 2011). Diese Transkriptionsfaktoren werden entwicklungsbiologisch in der Neuralleiste exprimiert und werden sowohl für die Mesoderm- als auch für die Neuralleistenbildung benötigt. Die Mesodermbildung wird durch den Verlust von SNAIL1, SLUG und TWIST1 blockiert, wohingegen die Neuralleistenbildung nur durch den Verlust von SLUG unterbunden werden kann. Somit spielt SLUG eine wichtige Rolle bei der Bildung der Neuralleiste (Shi *et al.*, 2011).

SNAIL1 ist das am besten untersuchte SNAIL-Protein und wird durch den RAS-RAF Signalweg aktiviert, wodurch es zu Zellproliferation und erhöhter Migration kommt (Kuphal *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist es in Melanomzellen stark hochreguliert (Massoumi *et al.*, 2009).

SLUG ist zwar weniger gut untersucht als SNAIL1, jedoch ist es in vielen Krebsarten wie z.B. Prostata- oder Lungenkrebs hochreguliert (Alves *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist dieses Protein an der Induktion von Zellbewegungen und an der EMT beteiligt (Chen *et al.*, 2009). Vannini *et al.* zeigten, dass eine Herabregulierung von SLUG im Melanom zu einer verstärkten Effektivität der Zytostatika Cisplatin und Fotemustin führt (Vannini *et al.*, 2007). Außerdem reguliert der ERK-FOSL1/cJUN-Signalweg die Migration von Brustkrebszellen durch die anhaltende Expression von SLUG (Chen *et al.*, 2009). Darüber hinaus zeigten Shirley *et al.*, dass SLUG eine wichtige Rolle bei der Melanomentstehung zukommt, wobei die genauen Mechanismen noch zu untersuchen sind (Shirley *et al.*, 2012).

SNAIL3 ist ein weiteres SNAIL Protein, dessen mRNA im Lungenkarzinom und humanen Melanom verstärkt exprimiert wird und am Prozess der EMT beteiligt ist (Katoh & Katoh, 2003; Katoh & Katoh, 2005).

Beim Prozess der EMT spielen die Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin und N-Cadherin eine wichtige Rolle. Für viele Krebsarten, wie beispielsweise Haut-, Brust-, Lungen- und Darmkrebs ist beschrieben, dass zu Beginn der EMT durch Mutationen von E-Cadherin dessen Level sinken. N-Cadherin hingegen wird oft stark hochreguliert (Thiery, 2002). In vielen Tumorarten ist der teilweise Verlust der E-Cadherin Expression mit Krebswachstum und einer schlechten Prognose assoziiert (Casas *et al.*, 2011). Jedoch zeigten Untersuchungen im Brust- und Darmkrebs, dass SLUG zwar als „EMT-Inducer“ fungiert, aber dass dieser Prozess nicht immer an eine Herabregulierung von E-Cadherin gekoppelt ist (Alves *et al.*, 2009).

Wie bereits in Kapitel 1.3.2 erwähnt spielt cJUN eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des AP1-Komplexes. Darüber hinaus ist dieses Protein für die E-Cadherin gesteuerte Zell-Zell-Adhäsion und Migration im humanen Melanom verantwortlich, die bei der EMT von Bedeutung sind. Die Metalloproteinase MMP14, die den ERK-Signalweg aktiviert und damit zur Tumorigenese beiträgt, wurde bereits als Zielgen von cJUN identifiziert (Kajanne *et al.*, 2007; Spangler *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2010; Ulasov *et al.*, 2013).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

FOSL1 ist in verschiedenen Krebsarten, wie beispielsweise Lungen-, Brust- und Darmkrebs hochreguliert. Jedoch ist über die Bedeutung und Wirkung von FOSL1 im humanen Melanom wenig bekannt (Young *et al.*, 2001; Young & Colburn, 2006). Microarray Untersuchungen zeigten bereits, dass in melan a HERmrk Mausmelanozyten nach Stimulierung des HERmrk-Rezeptors die FOSL1 Level hochreguliert werden. Eine verminderte FOSL1 Expression führt in der Melanomzelllinie MelJuso zu reduzierter BrdU-Inkorporation und Migration (Teutschbein *et al.*, 2010).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von FOSL1 in weiteren Zelllinien zu untersuchen und dabei Tumor-Parameter wie Proliferation, Koloniebildung im Soft-Agar und Invasion zu überprüfen.

Weiterhin sollten Zielgene von FOSL1 identifiziert werden, um ein besseres Verständnis für die Rolle des Transkriptionsfaktors in der Melanomentstehung zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt.

DMEM-Komplettmedium

DMEM Medium + L-Glutamin

10% FCS

1% Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml)

200 nM TPA

1,2 nM Cholera toxin

DMEM-Hungermedium

DMEM Medium + L-Glutamin

2,5% dialysiertes FCS

1% Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml)

RPMI-MM-Medium:

RPMI 1640

20% FCS

1% Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml)

1% Natriumpyruvat (Sodium Pyruvate MEM (100 mM))

1% nicht-essentielle Aminosäuren (10 mM)

0,1% HEPES

RPMI-Hungermedium

RPMI 1640 Medium

2,5% dialysiertes FCS

1% Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml)

D10-Medium:

DMEM Medium + L-Glutamin

10% FCS

1% Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml)

Einfriermedium

Grundmedium (z.B. DMEM) ohne Zusätze

20% FCS

10% DMSO

PBS+/-EDTA

0,4% NaCl

0,01% KCl

0,89% Na₂HPO₄

0,012% KH₂PO₄

(0,01% EDTA (0,5M))

NP40-Puffer:

20 mM HEPES; pH 7,8

500 mM NaCl

5 mM KCl

5 mM MgCl₂

Lysepuffer

Zum NP40-Puffer werden die folgenden Protease- und Phosphataseinhibitoren in die für den jeweiligen Ansatz benötigte Menge Lysepuffer frisch zugesetzt:

10 µg/ml Leupeptin

10 µg/ml Aprotinin

1 mM PMSF

200 µM Na₃VO₄

0,1 M NaF

Sammelgel:

250 mM Tris-Cl; pH 6,8 5% (w/v)

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)

0,1% (w/v) SDS

0,1% (w/v) APS

0,1% (w/v) TEMED

Trenngel:

375mM Tris-Cl, pH 8,8

7,5-12% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid)

0,1% (w/v) SDS

0,1% (w/v) APS

0.05% (w/v) TEMED

5x Laemmli-Puffer:

312,5 mM Tris-Cl; pH 6,8

10% SDS

50% Glycerin

0.005% Bromphenolblau

25% β -Mercaptoethanol

5x SDS-Laufpuffer

250 mM Tris pH 8

192 M Glycin

0,5% SDS

1x Waschpuffer:

125 mM Tris pH 8

960 mM Glycin

0,1% Tween

Stripping-Puffer:

62,5 mM Tris pH 6,7

100 mM β -Mercaptoethanol

2% SDS

50x TAE:

2 M Tris-Essigsäure ; pH 7,7

0,1 M EDTA

5x-Transfer-Puffer

125 mM Tris

960 mM Glycin

20% Methanol

6x Ladepuffer:

50% Glycerin

100 mM EDTA; pH 7,5

1% SDS

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol

LB-Medium:

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

ad 1l destilliertes Wasser

LB-Agarplatten:

Diese werden wie das LB-Medium hergestellt; jedoch wird zusätzlich 15 g Bacto-Agar hinzugefügt. Zur Selektion auf Ampicillin-Resistenz werden nach dem Abkühlen unter 60°C 100 µg/ml Ampicillin hinzugefügt.

Reprofastpuffer

100 mM (NH₄) SO₄

200 mM TRIS

100 mM KCl

1% Triton

1% BSA (Bovine Serum Albumine)

dNTPs (100 mM)

250 µl dATP

250 µl dCTP

250 µl dGTP

250 µl dTTP

2.1.2 Verwendete Zelllinien

Maus-Melanozyten

melan a Hm^{me} Zellen

melan a Wildtyp Zellen

Maus-Melanomzellen

384.1 (von einem spontanen Melanom aus HGF-CDK4-Mäusen)

1068 (von einem transplantierten HGF-CDK4 Melanom)

1276 (von einem transplantierten HGF-CDK4 Melanom) (Tormo *et al.*, 2006)

Ein spezieller Dank gilt der AG Tüting an der Universität Köln, die diese Maus-Melanomzellen zur Verfügung gestellt hat.

Humane Melanomzellen

A375

MelIm

MelHo

SK-MEL28

Zellen für virale Transfektion

293 TD

Ein spezieller Dank gilt hier der AG Gessler an der Universität Würzburg, die diese 293 TD Zellen zur Verfügung gestellt haben.

2.1.3 Bakterienstämme

Für die Transfektionen wurden *Escherichia coli* NEB 5-alpha verwendet.

2.1.4 Plasmidkonstrukte

Plasmidkonstrukte

Name	Herkunft
pBabeH2cGFG zeo	Toni Wagner, Physiologische Chemie, Universität Würzburg
pPAX2	AG Gessler, Entwicklungsbiochemie, Universität Würzburg
CMV-VSVg	AG Gessler, Entwicklungsbiochemie, Universität Würzburg
p201-iEP	AG Gessler, Entwicklungsbiochemie, Universität Würzburg
pLV-mU6-EF1 α -green	biosetta, Catnr. SORT-B08

2.1.5 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Sequenz
FOSL1 p201_5'-Nhe1	gcgcGCTAGCATGTTCCGAGACTTCGGGGA
FOSL1 p201_3'-BamH1	gcgcggatccTCACAAAGCGAGGAGGGTTG

Synthetische Oligonukleotide für quantitative real-time PCR

Name	Sequenz	Gensymbol
Actin_up	5'gct aca gct tta cca cca	<i>Aktin</i>
Actin_down	5'aag gaa ggc tgg aag agt gc	<i>(Mus musculus)</i>
FOSL1_up	5' gag acc gac aaa ttg gag ga	<i>FOSL1</i>
FOSL1_down	5' tgg aga aag gga gat gca ag	<i>(Mus musculus)</i>
S14_up	5'ctcaggtggctgaaggagag	<i>S14</i>
S14_down	5'gcagccaacatagcagcata	<i>(Homo sapiens)</i>
FOSL1_up	5' agc tgc aga agc aga agg ag	<i>FOSL1</i>
FOSL1_down	5' gga gtt agg gag ggt gtg gt	<i>(Homo sapiens)</i>
FOSL2_up	5'ctctgtcatcaagcccatca	<i>FOSL2</i>
FOSL2_down	5'agtgggggagttcaaggagt	<i>(Homo sapiens)</i>
cFOS_up	5'agaatccgaagggaaggaa	<i>cFOS</i>
cFOS_down	5'cttctcctcagcaggttg	<i>(Homo sapiens)</i>

FOSB_up	5'tactccacaccaggcatgag	<i>FOSB</i>
FOSB_down	5'gctctgccttttcctctca	<i>(Homo sapiens)</i>
SLUG_up	5'gggtctgaaagcttgactg	<i>SLUG</i>
SLUG_down	5'agctaccaatggcctctct	<i>(Homo sapiens)</i>
SNAI1_up	5'tagggtgctggaaggtaaa	<i>SNAI1</i>
SNAI1_down	5'ggttcttctgcgctactgct	<i>(Homo sapiens)</i>
SNAI3_up	5'gtggtagggttgtggcagt	<i>SNAI3</i>
SNAI3_down	5'gccattgtaccctcaaaga	<i>(Homo sapiens)</i>
TWIST1_up	5'ccagcttgagggtctgaatc	<i>TWIST1</i>
TWIST1_down	5'gtccgcagctctacgaggag	<i>(Homo sapiens)</i>
ECad_up	5'acctgaggctttggattcct	<i>E-Cadherin</i>
ECad_down	5'tggacagggaggatttgag	<i>(Homo sapiens)</i>
NCad_up	5'tggatgaagatggcatgg	<i>N-Cadherin</i>
NCad_down	5'aggtggccactgtgcttac	<i>(Homo sapiens)</i>
IL6_up	5'gcctccctgccccagtacc	<i>IL6</i>
IL6_down	5'tgcctctttgctgctttcacacatg	<i>(Homo sapiens)</i>
MMP2_up	5'acctagcacatgcaatacctgaacacc	<i>MMP2</i>
MMP2_down	5'caccagtgcctgggccgaag	<i>(Homo sapiens)</i>
MMP9_up	5'gccattcacgtcgtccttat	<i>MMP9</i>
MMP9_down	5'ttgacagcgacaagaagtgg	<i>(Homo sapiens)</i>
MMP14_up	5'gctcacgcttggcacgtatgccattc	<i>MMP14</i>
MMP14_down	5'gaggccctgaatggcatacgtgccaa	<i>(Homo sapiens)</i>
CyclinE1_up	5'atcctccacagttgcaccag	<i>CyclinE1</i>
CyclinE1_down	5'aggggacttaaacgccactt	<i>(Homo sapiens)</i>
pRS forw	5'cccttgaacctcctcgttcgacc	<i>pRetrosuper</i>
pRS Seq	5'gctgacgtcatcaaccgct	<i>(Homo sapiens)</i>

Enzyme

Name	Hersteller
Restriktionsenzyme	Fermentas
T4 DNA Ligase	NEB
DNA-Polymerasen (Taq)	Eigenherstellung durch AG Gessler, Entwicklungsbiochemie, Universität Würzburg

2.1.6 Marker

Marker

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

2.1.7 Kits

Kits

Name	Anwendung	Hersteller
Pure Yield™ Pasmid Minipräp System	DNA-Aufreinigung	Promega
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	DNA-Aufreinigung	Promega
TriFast peq Gold	RNA-Aufreinigung	peq Lab

2.1.8 Inhibitoren

AG1478 (EGF-Inhibitor)	Merck
LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor)	Merck
PD184352 (MEK-Inhibitor)	Thermo Scientific
PLX4720 (BRAF-Inhibitor)	axon Medchem
U0126 (MEK-Inhibitor)	Cabiochem

2.1.9 Antikörper und Sekundärreagenzien

β-Aktin Antikörper (C4)	Santa Cruz, Maus, 43 kDa; 1:10000
ECL Lösung 1: SuperSignal® West Pico	Thermo Scientific
Stable Peroxide Solution	
ECL Lösung 2: SuperSignal® West Pico	Thermo Scientific

Luminol/Enhancer Solution

FOSL1 Antikörper für humane Zellen (c-12) Santa Cruz, Maus, 43 kDa; 1:500

FOSL1 Antikörper für Mauszellen (N-17) Santa Cruz, sc-183, Kaninchen;
43 kDa; 1:1000

FOSL2 Antikörper (Q20) Santa Cruz, sc-604, Kaninchen;
43 kDa, 1:500

Sekundärantikörper Ziege anti Maus Thermo Scientific

Sekundärantikörper Ziege anti Kaninchen Biorad

α -Tubulin Sigma, Maus, 55 kDa, 1:10000

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen

Die verwendeten Zelllinien sind im Abschnitt 2.1.1 aufgelistet. Die verschiedenen Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen wie folgt kultiviert:

Maus-Melanozyten:

Sowohl die Wildtyp melan a als auch die melan Hm^{me} Zellen wurden in DMEM-Komplettmedium kultiviert. Zur Stimulierung dieser Zellen wurde humanes EGF (100 ng/ml) verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden diese Zellen für 2 Tage mit DMEM-Hungermedium gehungert und an Tag 2 die Inhibitoren bzw. das humane EGF hinzugefügt.

Humane Melanomzelllinien (MelIm, MelHo, SK Mel-28 und A375):

Die Kultivierung dieser Tumorzellen erfolgte in D10-Medium.

Maus-Melanomzellen:

Diese von der Arbeitsgruppe Tütting in Köln zur Verfügung gestellten Zelllinien (384.1, 1068, 1274) müssen in RPMI-MM (Maus-Melanom)-Medium kultiviert werden. Diese Maus-Melanomzellen wurden für das Experiment 2 Tage in RPMI-Hungermedium gehungert, wobei an Tag 1 der MEK-Inhibitor U0126 hinzugefügt wurde und die Zellen dann nach weiteren 24 h abgeerntet wurden. Als Kontrolle wurden melan a Zellen verwendet, die für 2 Tage in DMEM-Hungermedium kultiviert werden mussten.

Sowohl die Maus- als auch die humanen Zellen wurden den physiologischen Bedingungen entsprechend bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

Die Zellen wurden mit PBS+EDTA gewaschen und anschließend subkultiviert.

Um die Zellen längerfristig lagern zu können, wurden ca. 4×10^6 Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in 1 ml Einfriermedium durch langsames, kontinuierliches Abkühlen auf -80°C tiefgefroren. Dann wurden sie bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Die tiefgefrorenen Zellen wurden erneut kultiviert, indem sie zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut und zur Verdünnung des zytotoxischen DMSO in 5 ml Medium gewaschen und dann ausgesät wurden. Dabei wurden die Zellen in 10 ml Medium auf 10 cm-Schalen gegeben. Die Zellen wurden stets für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert.

2.2.2 Stimulation eukaryontischer Zellen

Zur Stimulation wurden die melan a Hm^{me} Zellen mit 100 ng/ml humanem EGF pro ml Medium für eine definierte Zeit (2, 4, 8, 24 h) behandelt. Außerdem wurden unbehandelte Zellen als Kontrollen nach 1 und 24 h abgeerntet. Diese Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (5 min, 10.000 rpm), wobei die Zellen mit 1x PBS gewaschen wurden. Die Zellpellets wurden anschließend wie zuvor beschrieben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.4 Proliferationsassays

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens der Melanomzellen wurde mit dieser Methode das Wachstum dieser Zellen ermittelt. Zunächst wurde 2x mit PBS gewaschen, die Zellen ausgezählt und dann je 2 ml Zellsuspension mit D10 bzw. DMEM-Komplettmedium in der gewünschten Konzentration ausgesät. Das Medium wurde alle 48 Stunden gewechselt und an den Tagen 2, 4 (bzw. 5) und 7 die Zellen ausgezählt.

2.2.6 siRNA Transfektion

Zunächst wurden die humanen Melanomzelllinien mit einer ca. 80%igen Konfluenz von 10 cm Schalen abgelöst, auf 1×10^5 Zellen/ml auf 6-Well-Platten ausgezählt und über Nacht bei 37°C im Zellbrutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden 95 µl Optimem-Medium in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und 0,5 µg der entsprechenden siRNA (40 pmol) hinzugefügt. In einem weiteren Eppendorfgefäß wurden zu 88 µl Optimem 12 µl x-treme Gene Reagenz hinzugegeben. Die verdünnte siRNA muss innerhalb von 5 min zu dem Optimem-x-treme-Gene-Gemisch hinzugegeben werden. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 15-20 min bei Raumtemperatur. Nun wurde das Medium von den zu behandelnden Melanomzellen entfernt und 500 µl des Transfektionsgemischs hinzugefügt und für 8 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Überstand entfernt und 2 ml frisches D10 Medium zu den Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden 48, 72 oder 96 h nach der Transfektion abgeerntet.

2.2.7 Virale Infektion

Zunächst wurden 293TD Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben kultiviert und bei einer Konfluenz von 60-70% für dieses Experiment eingesetzt. Für die Transfektion und die weiteren Arbeitsschritte musste in einem S2-Labor gearbeitet werden. Vor der Transfektion wurde das Medium von den 293TD Zellen entfernt und durch 5 ml frisches D10 Medium ersetzt. Für eine 10 cm Schale wurden folgende Ansätze verwendet:

DNA-Mix

6 µg Viruskonstrukt

4,5 µg pPAX2 (Packaging-Plasmid)

3 µg CMV-VSVg (Envelope-Plasmid)

Es wurde mit purem DMEM auf 250 µl auffüllt.

PEI (Polyethylenimin)-Mix

27 µl 1xPEI aus 10x PEI (pur) mit 150 mM NaCl hergestellt)

223 µl pures DMEM

Der PEI-Mix wurde dem DNA-Mix hinzugefügt und die Ansätze für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Ansatz wurde mit dem Viruskonstrukt pBabecGFPzeo angesetzt und diente als Kontrolle, da die Zellen bei erfolgreicher Transfektion grün leuchten. Anschließend wurden die entsprechenden Ansätze zu den 293TD Zellen hinzugegeben und für 6-8 h bei 37°C inkubiert, wonach ein Mediumwechsel mit 10 ml neuem D10 Medium erfolgte. Am nächsten Morgen wurde zu den 293TD Zellen 200 µl 50x Natrium-Butyrat (500 mM Stocklösung) hinzupipettiert, für 6-8 h bei 37°C inkubiert und danach das Medium gewechselt. Die zu transfizierenden Zellen mussten am nächsten Tag mit einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ml auf 6-Well-Platten ausplattiert werden. Am Tag darauf wurde zunächst unter dem UV-Mikroskop kontrolliert, ob die Kontrollzellen mit dem Viruskonstrukt pBabeH2cGFPzeo grün

leuchten. War dies der Fall, wurde das Medium von den 293TD Zellen entfernt und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Zu dem Filtrat wurde 8 µg/ml Polybren hinzugegeben. Das Filtrat wurde dann den zu transfizierenden Melanomzellen hinzugefügt oder bei -80°C in einem S2 Gefrierschrank gelagert. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag wurde erneut das Medium gewechselt. Von dann ab wurden die Zellen, wenn sie eine Puromycinresistenz besaßen, für 2 Wochen mit 1 µg/ml Puromycin gekurt. Die Zellen wurden für zwei Wochen in einem S2-Labor kultiviert und durften anschließend im S1-Labor weiter verwendet werden.

Die verwendete shRNA von FOSL1 wurde von Herrn PD Shuang Huang vom Department of Biochemistry des Medical College of Georgia zur Verfügung gestellt (verwendeter Vektor: pLV-mU6-EF1α-green, biosetta) (Chen *et al.*, 2009).

2.2.8 Boydenkammerassay

Zwei Tage vor Beginn dieses Assays wurden MelHo Zellen wie in 2.2.6 beschrieben auf 6-Well Platten ausgesät (je zwei Wells für die siRNA Kontrolle und zwei Wells für den siRNA knock-down) und am nächsten Tag mit siRNA transfiziert.

Der Matrigel-Invasions-Assay diente zur Untersuchung der Invasivität von siRNA transfizierten Zellen. Dazu wurden spezielle Kammern, die Boydenkammern, im unteren Kompartiment mit 210 µl konditioniertem Medium befüllt. Dieses Medium dient dazu, basierend auf dem Prinzip der Chemotaxis, ein Konzentrationsgefälle herzustellen, welchem die siRNA transfizierten Zellen zu folgen versuchen. Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden konfluente Fibroblasten 24 h lang in Medium ohne FKS kultiviert, dieses Medium anschließend abgenommen, abzentrifugiert und für den Assay benutzt.

Zu Versuchsbeginn wurde das konditionierte Medium in die untere Kammer gegeben. Die Filter mit einer Porengröße von 8 µm wurden mit einer Pinzette luftblasenfrei auf das konditionierte Medium in der Kammer gelegt. Das Matrigel wurde 1:2,5 mit Leitungswasser verdünnt, wovon 52 µl auf den Filter pipettiert wurden. Anschließend wurde die Kammer auf einem Papiertuch abgeklopft, um das Matrigel gut zu verteilen und für 30 min bei 37°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die MelHo Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben von den 6-Well-Platten abgelöst, 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, in purem D10 Medium aufgenommen und eine Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 800 μ l in jedes obere Kompartiment der Kammern pipettiert, alle Kammern für 4 h bei 37°C inkubiert und danach die Zellsuspension entfernt. Dann wurde der Filter mit einer Pinzette von der Kammer abgenommen und die obere Seite mit nicht gewanderten Zellen mit einem Papiertuch abgewischt. Die Filter der verschiedenen Ansätze wurden in einen Färberahmen gelegt, der anhand von Klammern geschlossen wird. In einer Hemacolor Schnellfärbung (von Merck Hemacolor® Färbung von Blutaustriechen), bestehend aus Fixierlösung, roter Färbelösung und blauer Färbelösung, wurden die Zellen gefärbt, am Ende mit Leitungswasser gespült und mit der Unterseite nach oben auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurde die Anzahl der gewanderten Zellen im Mikroskop bestimmt.

2.2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.2.9.1 Aufschluss eukaryontischer Zellen zur Gewinnung zellulärer Proteine

Die zytoplasmatischen- und membrangebundenen Proteine aus eukaryontischen Zellen wurden unter Bildung eines Lysates durch einen Detergenz enthaltenden Puffer aufgebrochen. Hierbei wurden die Zellen in der 10 cm Schale 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, bei 7.000 rpm für 7 min zentrifugiert, der gesamte Überstand wurde verworfen und die Zellpellets sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Pellets in ca. 1ml Lysispuffer pro 1×10^7 Zellen aufgenommen, für 2 Stunden auf Eis inkubiert und für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Schluss in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen.

2.2.9.2 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Diese Proteinbestimmung basiert auf der Bindung des organischen Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm bewirkt wird. Die Proteinkonzentration kann durch photometrische Messung der Absorption bei 595 nm quantitativ gemessen werden.

1 ml Bradford-Lösung wurde in die Küvetten vorgelegt und mit 5 µl des zu messenden Proteinlysates (1:5 in Lysepuffer vorverdünnt) vermischt. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration über eine parallel gemessene BSA (Bovine Serum Albumin)-Referenz errechnet.

2.2.5 Softagar Assay

Diese Methode wurde angewandt, um die Koloniebildung von Melanomzellen am Mikroskop beobachten zu können.

Zunächst wurde 2,4% Agar hergestellt und autoklaviert. Dieser muss anschließend flüssig bleiben und wurde deshalb sofort nach dem Autoklavieren bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Für diesen Assay wurde ausschließlich D20 Medium verwendet, welches auf 50°C temperiert werden musste. Das D20 Medium wurde dann im Verhältnis 2:1 mit 2,4%igem Agar gemischt und wieder im 50°C heißen Wasserbad temperiert. Dann wurden 2 ml dieses Gemischs luftblasenfrei auf 6-Well Platten pipettiert, welche steril an der Luft getrocknet wurden. In der Zwischenzeit wurden die Zellen auf 2×10^4 Zellen/250 µl ausgezählt, 1,5 ml D20 Medium hinzugefügt und die Zellsuspension auf 37°C temperiert. Anschließend wurden 250 µl 2,4%iger Agar hinzugegeben und 2 ml der Zellsuspension als 2.Schicht auf den 6-Well-Platten ausplattiert. Dann wurde die 6-Well-Platte erneut steril an der Luft getrocknet. An jedem zweiten Tag wurden 250 µl D20 Medium hinzugefügt und mit Hilfe des invertierten Mikroskops die gebildeten Zellkolonien dokumentiert.

2.2.10 Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Methode (SDS-PAGE nach Laemmli) werden Proteine ihrer Größe entsprechend elektrophoretisch aufgetrennt. In einem niederprozentigen Sammelgel (4%) wurden die Proteine eines Proteingemisches zunächst fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel (7,5%-12%) entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Es wird eine optimale Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht im Bereich von 20-30 kDa erreicht, indem ein mindestens 12%iges Trenngel verwendet wird, wohingegen für Proteine im Bereich von 100 kDa ein 7,5%iges Trenngel besser geeignet ist.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die zu analysierenden Proben mit denaturierendem Ladepuffer nach Laemmli versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert und kurz auf Eis gestellt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 25 mA pro Mini-Gel (9x6 cm) bei einer Spannung von maximal 100 V.

2.2.11 Western Blot Analyse

2.2.11.1 Protein-Transfer auf Nitrozellulose-Membran

Zum Nachweis eines Proteins mit einem spezifischen Antikörper mussten die Proteine aus dem Gel zunächst in einem elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Dazu wurden das Proteingel zunächst für 5 min, anschließend die Membran, 6 Whatman Papiere und 2 Schwämme für 1 min zum „Anfeuchten“ in Transfer-Puffer inkubiert und dann der Blot luftblasenfrei aufgebaut, indem Gel und Membran jeweils von 3 Lagen und einem Schwamm nach außen abgegrenzt wurden. Das Blotting erfolgte bei 4°C in Blotkammern bei einer Stromzufuhr von 0,25 A für 1,5 h (für 2 Gele 350 mA).

2.2.11.2 Immunologische Detektion

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Blotten für 1 h auf dem Schüttler mit BSA-Blockpuffer (5% BSA in Waschpuffer) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (in BSA-Blockpuffer) über Nacht. Am nächsten Tag wurde 3x mit Waschpuffer für 5 min gewaschen und danach die Membran für 45-60 min mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (in BSA-Blockpuffer) inkubiert. Anschließend wurde die Membran wiederum 3x 5 min gewaschen.

So entstanden Protein-Antikörper-Komplexe, die durch 1-minütiges Schwenken der Membran in den Reagenzien des „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL)-Detektionssystems nachgewiesen wurden. Hierbei katalysierte die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) die Oxidation von Luminol in Gegenwart von H_2O_2 . Diese Reaktion wird als Chemilumineszenz sichtbar. Nach 5-10 min erreicht diese ihr Maximum und klingt dann innerhalb von 60-90 min ab. Die Expositionszeiten der Membran zum Film hängen von der nachzuweisenden Proteinmenge sowie von der Spezifität und Konzentration des verwendeten Antikörpers ab und liegen zwischen mehreren Sekunden bis wenigen Minuten.

Für die erneute Verwendung der Membran mit einem anderen Antikörper, wurde sie zunächst 3x 5 min gewaschen und dann mit Stripping-Puffer bei 50°C für 20-30 min im Wasserbad inkubiert, indem die Membran in eine geschlossene Schale gelegt wurde. Anschließend wurde 3x 5 min mit PBS gewaschen und die Membran vor einer erneuten Inkubation mit dem Erstantikörper für 1 h geblockt.

2.2.12 Molekularbiologische DNA-Methoden

2.2.12.1 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wird zur Amplifizierung von DNA verwendet. Sie beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen wird eine Quantifizierung durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende der PCR kann anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen werden. Da nur in der exponentiellen Phase der PCR die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen, ist die korrekte Quantifizierung nur während dieser Phase möglich.

Reaktionsansatz:

2,5 µl 10x Reprofast-Puffer
0,7 µl dNTPs (10 mM Stock)
0,75 µl Primer1 (10 pmol/µl)
0,75 µl Primer2 (10 pmol/µl)
0,75 µl SYBR-Green (pur, 1:20 verdünnt)
0,3 µl His-Taq DNA Polymerase, ca. 5 units/µl
ad 20 µl Millipore-Wasser (autoklaviert)

Die für die jeweilige Probe geeigneten PCR-Bedingungen müssen in Vorversuchen bestimmt werden. Die Annealing-Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur T_m der benutzten Primer und kann in grober Annäherung mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = (\text{Anzahl G+C}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{Anzahl A+T}) \times 2^\circ\text{C}$$

Außerdem sollte die Annealing-Temperatur um einige °C niedriger als die Schmelztemperatur sein. Um eine semiquantitative Aussage über die vorhandene RNA-

Menge und somit über die Genexpression (RT-PCR) treffen zu können, muss die Zyklenzahl der PCR so gewählt werden, dass sich die PCR noch in der exponentiellen Phase befindet, aber das Fragment mit Ethidiumbromidfärbung bereits darstellbar ist.

Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet:

2-Phasen-Programm:

1. 95°C 2 min.
2. 95°C 30 sec
3. 60°C 30 sec 3. 60°C 30 sec
4. 72°C 1 min
5. 72°C 5 min

Schritte 2.-4. für 40 Zyklen

Der PCR-Ansatz konnte dann nach Zugabe von DNA-Probenpuffer direkt auf ein Agarosegel geladen und nach der Elektrophorese analysiert (Foto zur Dokumentation) oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.12.2 Klonierung

Restriktionsverdau

Ziel der Klonierung war die Herstellung eines p201-iEP-Expressionsvektors mit einem Volle-Länge-Konstrukt des humanen FOSL1. (Vektor p201-iEP; verwendete Restriktionsenzyme: Nhe1, BamH1(Fermentas)).

0,5-1 µg DNA wurden mit je 5-10 U Nhe1 und BamH1 (Konzentration im Ansatz 0,5 U/µl) und passendem Puffer (Herstellerangaben) für 1-3 h bei 37°C inkubiert. Dabei

wurde das Reaktionsvolumen so gewählt, dass die Enzymlösung und somit die Glycerinkonzentration 10% des Ansatzes nicht überschreitet.

Auftrennung und Isolierung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Überprüfung der mit Restriktionsenzymen gewonnener DNA-Fragmente eingesetzt.

Hierbei wurden in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 0,8-2%ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Vor dem Auftragen wurden die zu analysierenden Proben mit DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe der Gele bei 40 bis 100 Volt. Anschließend wurde das Gel für mindestens 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1µg/ml) gefärbt und 20-30 min in einem Wasserbad entfärbt. Zu analytischen Zwecken konnte das Ergebnis im kurzwelligen UV-Bereich (254 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation als Foto festgehalten werden. Ein mit aufgetragener DNA-Marker diente hierbei als Größenvergleich zur Identifikation der DNA-Banden.

2.2.12.3 Ligation

Um die gewonnenen DNA Fragmente mit dem Vektor zu ligieren, wurde der Fermentas-Kit mit einer T4-Ligase verwendet und nach den Herstellerangaben verfahren. Diese Ansätze wurden über Nacht bei 14°C im Wasserbad inkubiert und am nächsten Morgen für die Transformation verwendet.

2.2.12.4 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zur Transformation wurden *E.coli* Bakterien NEB 5-alpha eingesetzt. Ein Volumen von 100 µl kompetenten Zellen wurde mit ca. 10-20 ng der zu transformierenden DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Eine Inkubation von 1,5 min bei 42°C (Hitzeschock) ließ die Zellmembran für die Transformation permeabel werden. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis gekühlt und mit 800 µl LB-Medium aufgefüllt.

Anschließend wuchsen die Bakterien für 1,5 h bei 37°C unter stetigem Schütteln. Dann wurden die Bakterien für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 600 µl LB-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin) ausgestrichen. Nach 12-16 h konnten Einzelkolonien isoliert werden.

2.2.12.5 Kolonie-PCR

Die isolierten Einzelkolonien wurden mit einer 10 µl Pipettenspitze auf eine neue LB-Platte mit Ampicillin transferiert und anschließend dem folgenden PCR-Ansatz hinzugefügt:

Mastermix für Kolonie-PCR

	[µl]
Wasser	19,55
10xReprofast Puffer	2,5
dNTPs	0,7
pRS forw	0,75
pRS Seq	0,75
Taq Polymerase	0,35
Gesamtvolumen	25

Das folgende PCR-Programm wurde verwendet:

1. 94°C 4 min
 2. 94°C 45 sec
 3. 58°C 40 sec
 4. 72°C 1 min 20 sec
 5. 72°C 5 min
- 2.- 4. Wurden dabei 35x wiederholt.

2.2.13 Molekularbiologische RNA-Methoden

2.2.13.1 RNA-Extraktion

Die RNA Extraktion und Ausfällung erfolgte unter Anwendung des TriFast-Kits (peq Lab) nach den Angaben des Herstellers. Die gefällte RNA wurde zum Schluss in einer möglichst geringen Menge DEPC-Wasser aufgenommen. Die so gewonnenen RNA-Lösungen wurden bei -80°C gelagert.

2.2.13.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das RevertAid™ Kit verwendet. Hierbei wurde zu 0,1-5 µg RNA 1 µl Random-Hexamer-Primer (0,2 µg/µl) zu der RNA-Lösung hinzugefügt, für 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend kurz auf Eis gestellt. Dann wurde ein für die Anzahl der Proben entsprechender Mastermix angesetzt.

Mastermix cDNA-Synthese

4 µl 5x Reaktionspuffer

1 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl)

1 µl Revert-Aid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Der Mastermix wurde zu den RNA-Lösungen hinzugefügt und zunächst für 10 min bei 25°C inkubiert. Danach erfolgte ein Inkubationsschritt für 60 min bei 42°C und ein weiterer für 10 min bei 70°C. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert. Für die RT-PCR wurde die cDNA auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und 5 µl pro Template verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 FOSL1 in HERmrk-transgenen Melanozyten

3.1.1 Die Protein- und mRNA Expression von FOS Proteinen in HERmrk-transgenen Mausmelanozyten

Microarray Untersuchungen zeigten bereits, dass eine EGF-Stimulierung HERmrk-transgener Maus-Melanozyten eine starke Induktion von FOSL1 bewirken (Teutschbein *et al.*, 2010). Um die Expression der verschiedenen FOS-Familien-Mitglieder miteinander zu vergleichen, wurden zunächst die Proteinlevel von FOSL1 und FOSL2 in HERmrk-transgenen Melanozyten untersucht. Die Melanozyten wurden für 1 h, 2 h, 4 h, 8 h bzw. 24 h mit humanem EGF stimuliert. Zum Vergleich wurden unstimulierte Zellen verwendet (Abb. 8). Die FOSL1 Proteinexpression war in der unbehandelten Kontrolle (0 h, Abb. 8) nicht nachweisbar. Nach 2 h konnte jedoch eine FOSL1 Proteinexpression gezeigt werden, die bis zu 24 h bestehen blieb, dann jedoch leicht abnahm (Abb. 8). Vergleicht man die FOSL2 Proteinexpressionlevel von den mit EGF behandelten Proben mit der unbehandelten Kontrolle, sind hier keine Unterschiede zu erkennen, wenn man die Aktinexpression mit in Betracht zieht (Abb. 8).

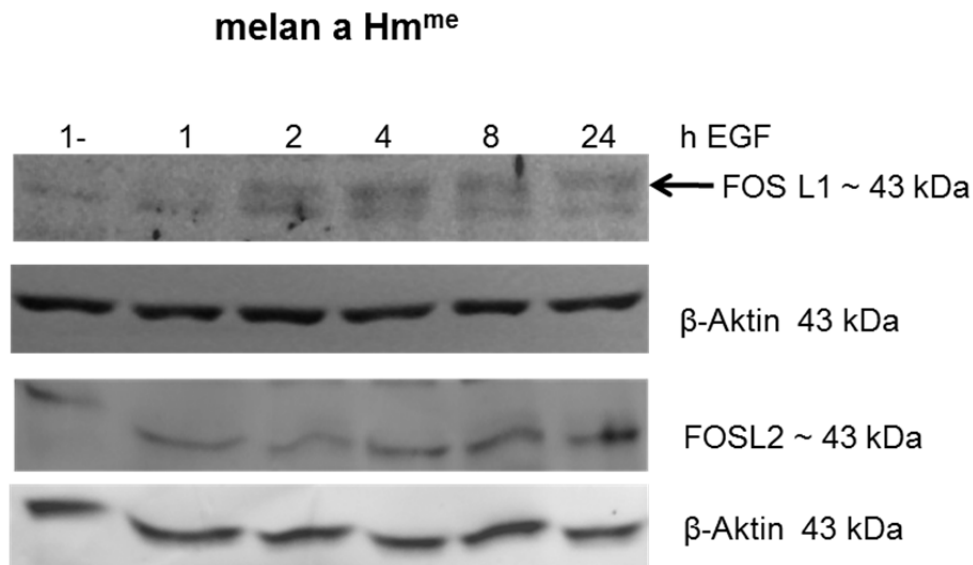


Abb. 8: Western-Blot (12%iges Gel) zur Detektion der Protein Expression von FOSL1 und FOSL2 in Melan a Hm^{me} (HERmrk-transgenen Mausmelanozyten).

Der zeitliche Verlauf der Genexpression von *FOSL1*, *FOSL2*, *cFOS* und *FOSB* in HERmrk-transgenen Melanozyten wurde mit Hilfe von Real-Time-PCR untersucht. Hierzu wurden melan a Hm^{me} Zellen für 1 h, 2 h, 4 h, 8 h bzw. 24 h mit humanem EGF stimuliert. Unstimulierte Zellen wurden zum Vergleich verwendet (Abb. 9).

Wie aufgrund der Microarray Ergebnisse von Teutschbein *et al.* (2010) zu erwarten war, steigen die *FOSL1* Genexpressionslevel durch die Stimulierung mit humanem EGF an (Abb. 9). Nach 2 h ist eine 25-fache Hochregulierung der *FOSL1* mRNA-Expressionslevel und damit ein Expressionsmaximum zu beobachten. Danach nimmt die *FOSL1* Genexpression wieder ab und erreicht nach 24 h fast den Wert der unbehandelten Kontrolle.

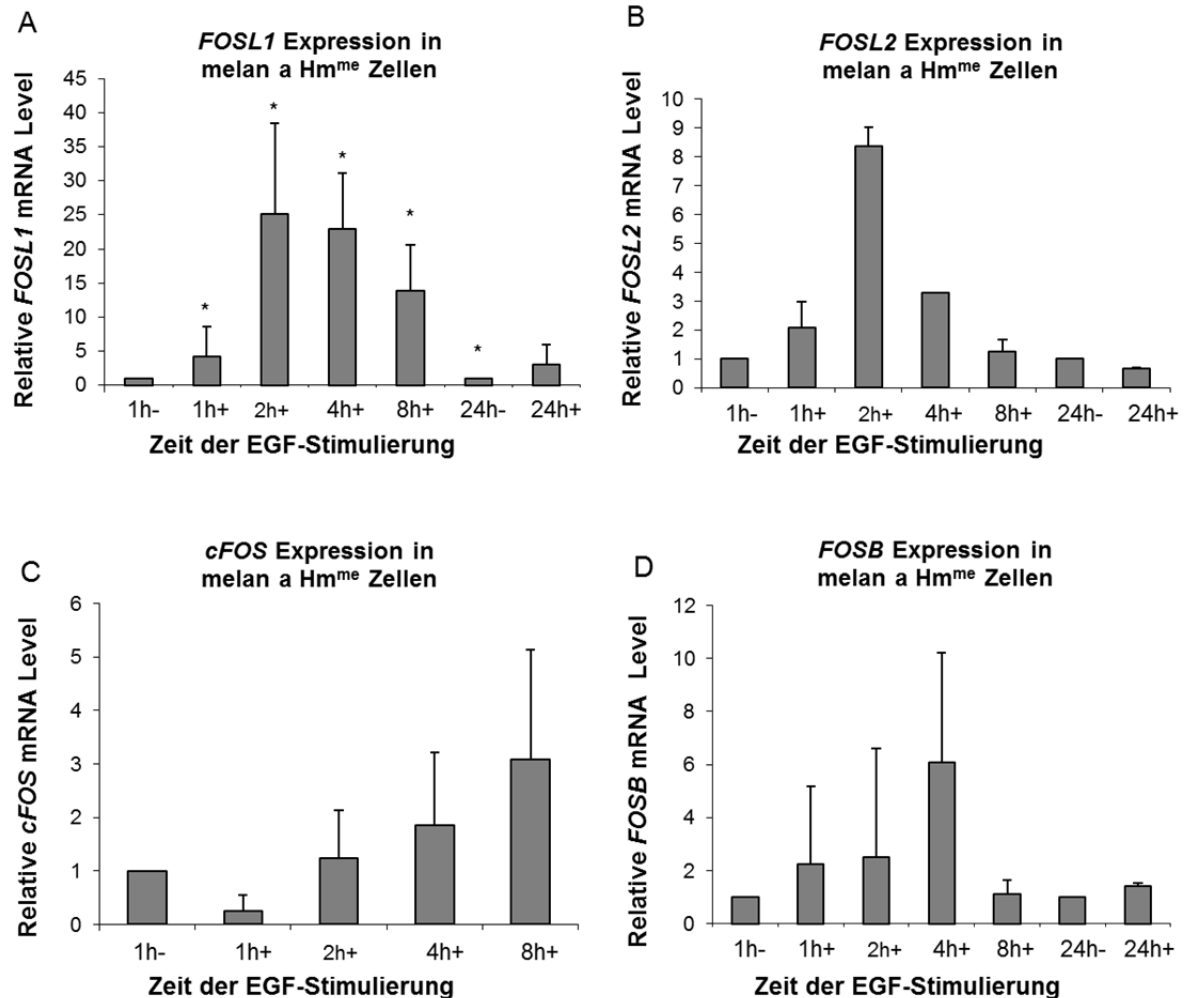


Abb. 9: Real-Time-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression von *FOSL1* (A), *FOSL2* (B), *cFOS* (C) und *FOSB* (D) in melan a Hm^{me} Zellen (HERmrk-transgenen Mausmelanozyten) nach Stimulierung mit humanem EGF zu unterschiedlichen Zeitpunkten. *FOSL1*: 2 biologisch unabhängige Experimente, je zweimal; *FOSL2*, *FOSB* und *cFOS*: je ein biologisches Experiment, zweimal per Real-Time-PCR analysiert. h, hours; -, Kontrolle ohne EGF-; +, mit EGF-Zugabe. *: $p < 0,05$ (Student t-Test, gepaart, einseitig).

Ähnlich wie die *FOSL1* Genexpression steigt die *FOSL2* Genexpression durch die Stimulierung mit EGF zunächst stark an und erreicht nach 2 h ein Maximum (Abb. 9 B). Danach sinkt sie jedoch deutlich stärker ab als die Genexpression von *FOSL1* und erreicht bereits nach 8 h dieselben Werte wie die unbehandelten Kontrollen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die *FOSL2* Genexpression in melan a Hm^{me} Mausmelanozyten durch Xmrk-induziert wird.

Auch die Genexpression von *cFOS* und *FOSB* in melan a Hm^{me} Mausmelanozyten wird durch Xmrk-induziert. Allerdings ist die Expression hier deutlich geringer und eine Signifikanz konnte nicht erreicht werden

Insgesamt zeigen die mRNA-Expressionsanalysen der FOS Proteine in HERmrk-transgenen Mausmelanozyten, dass FOSL1 am stärksten exprimiert wird (25-fach) und nach 2 h einen mRNA-Expressionspeak erreicht.

3.1.2 Expression der mRNA von FOSL1 in Abhängigkeit von unterschiedlichen Melanom-relevanten Signalwegen

In vorangegangenen Studien zeigte sich, dass die HERmrk-induzierte Expression von FOSL1 von ERK1/2 und SRC-Familie-Kinasen, jedoch nicht von PI3-Kinasen gesteuert wird (Teutschbein *et al.*, 2010). Allerdings wurden zur Ermittlung der Daten HERmrk-Zellen („Hm^{hi}“, Leikam *et al.*, 2008) verwendet, die eine wesentlich höhere Expressionsdichte des Rezeptors besitzen als die hier verwendeten Hm^{me}-Zellen. Dies könnte eine Auswirkung auf Expressions-Level, -Kinetik und -Regulierung der betreffenden Zielgene haben. Daher wurde die Expressionsregulierung von FOSL1 auch in melan a Hm^{me} Mausmelanozyten mit mittlerer Expressionsstärke des HERmrk-Rezeptors (Leikam *et al.*, 2008) untersucht, die zunächst mit AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY29004 (PI3-Kinase-Inhibitor), PP2 (SCR-Kinase-Inhibitor) und U0126 (MEK-Inhibitor) vorinkubiert und anschließend für 2 h mit EGF behandelt wurden. EGF-unbehandelte Proben sowie die mit DMSO behandelten Zellen dienten als Kontrolle.

Unerwarteterweise zeigte sich eine Hemmung der FOSL1-Transkription durch alle eingesetzten Inhibitoren. Die stärkste Hemmung war durch den EGFR-Inhibitor zu erreichen. Somit scheint die *FOSL1* Expression in melan a Hm^{me} Mausmelanozyten sowohl von SRC-Kinasen und ERK1/2 als auch vom PI3-Kinase-Signalweg abhängig

zu sein (Abb. 10).

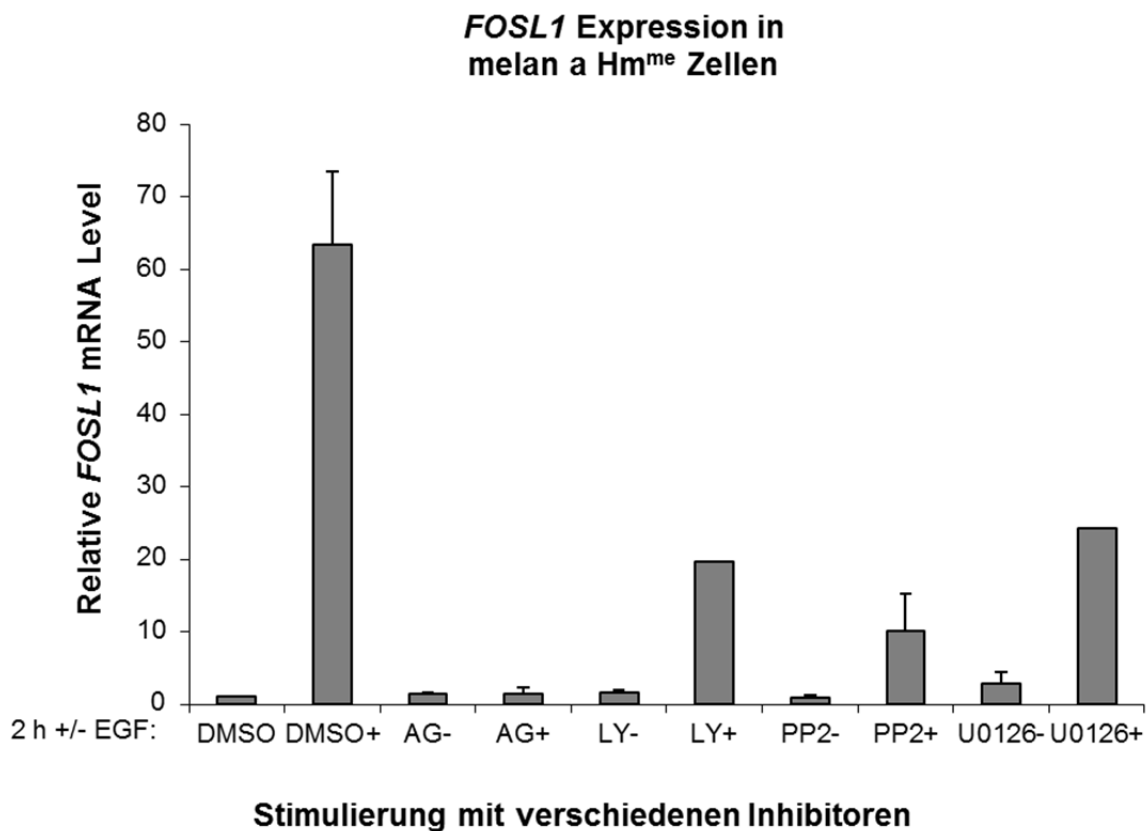


Abb. 10: Real-Time-PCR zur Bestimmung der Abhängigkeit der mRNA-Expression von *FOS1* von unterschiedlichen Melanom-relevanten Signalwegen in melan a Hm^{me} Zellen (HERmrk-transgenen Mausmelanozyten). Ein Experiment, zweimal analysiert. h, hours; -, Kontrolle ohne EGF-; +, mit EGF-Zugabe.

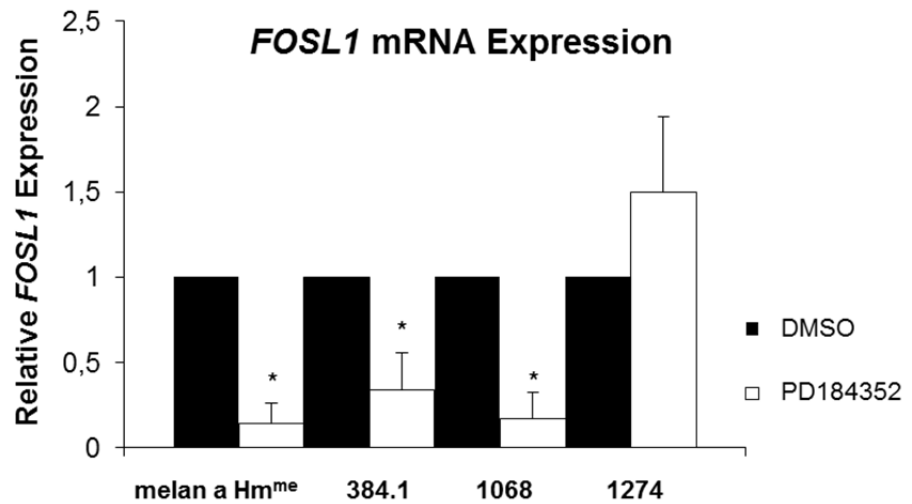
Ergänzend zum HERmrk-Modell wurden Mausmelanomzellen aus dem CDK4^{R24C}/HGF-Mausmodell verwendet (Tormo *et. al.*, 2006). Hierbei wird unter dem Metallothionein-Promoter das Gen *HGF/SF* („hepatocyte growth factor/scatter factor“) exprimiert und das Gen *CDK4* mutiert (CDK^{R24C}), wodurch primäre Melanome und spontane Metastasen in Lymphknoten und Lungen entstehen (Tormo *et. al.*, 2006). Diese Zellen wurden von dem Labor der Abteilung für Dermatologie von Prof. Dr. med. T. Tüting an der Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

Die 384.1 Zellen stammen aus einem spontanen Melanom aus C57BL/6 Mäusen mit einer HGF-Überexpression, die eine CDK4^{R24C} Mutation besitzen, die 1068 und 1276 Zellen aus transplantierten HGF-CDK4^{R24C} Melanomen.

Die zuvor beschriebenen Experimente zum MAPK-Signalweg wurden mit diesen Mausmelanomzellen durchgeführt und mit melan a HERmrk Mausmelanozyten verglichen.

Die Maus Melanomzelllinien 384.1, 1068 und 1276 wurden für 24 h entweder mit dem MEK-Inhibitor PD184352 oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. In Abb. 11 A ist ersichtlich, dass die *FOSL1* mRNA-Expression nach 24 stündiger MEK-Inhibitor Behandlung in 384.1 und 1068 Zellen genau wie melan a HERmrk Zellen stark abnimmt. In 1276 Zellen konnte keine Reduktion der *FOSL1* mRNA-Expression nach MEK-Inhibition beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ist in Abb. 11 B ersichtlich, dass die FOSL1 Protein-Expression nur in 1068 und 1276 reduziert wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Mausmelanomzellen die FOSL1 Expression zumindest teilweise durch den MAPK-Signalweg gesteuert wird. Möglicherweise geschieht dies durch transkriptionale und posttranskriptionale Regulierung.

A



B

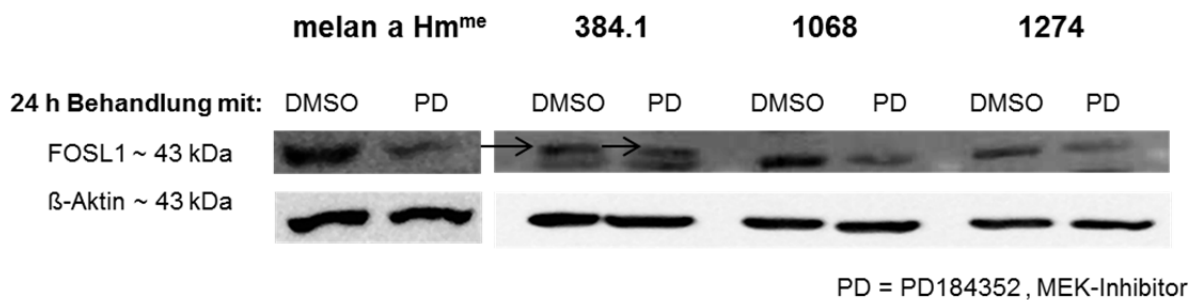
FOSL1 Protein Expression

Abb. 11: Western-Blot (A; 12%iges Gel) und Real-Time-PCR (B) zur Bestimmung der Abhängigkeit der Protein- und mRNA-Expression von FOSL1 in Mausemelanomzellen vom MAPK-Signalweg (Behandlung mit MEK-Inhibitor PD184352). HERmrk-transgene Maus Melanozyten (Melan a Hm^{me}) dienten als Kontrolle. Real-Time-PCR: 2 biologisch unabhängige Experimente, je ein- bzw. zweimal analysiert. *:p<0,05 (Student's t-Test, gepaart, einseitig).

3.2 Die Rolle von FOSL1 im humanen Melanom

Im Anschluss sollte die Funktion von FOSL1 im humanen Melanom untersucht werden. Dafür wurden die humanen Melanomzelllinien A375, DX3, MelHo und SK-MEL28 verwendet. Die Protoonkogene NRAS und BRAF, die am ERK-Signalweg beteiligt sind, sind im malignen Melanom häufig mutiert (Vergleich Abschnitt 1.1.3 in der Einleitung). Die verwendeten A375, MelHo und SK-Mel28 Zellen haben eine BRAF-, DX3 eine NRAS-Mutation. In den Kapiteln 1.1.2 bis 1.1.4 der Einleitung wurde bereits genauer erläutert, dass der PI3-Kinase- sowie der MAPK-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Melanomentstehung spielen (Dahl & Guldborg, 2007; siehe auch Abb. 3 und 4). Um die Funktion von FOSL1 im humanen Melanom beim MAPK- und PI3-Kinase-Signalweg genauer zu untersuchen, wurden die genannten humanen Melanomzelllinien mit entsprechenden Inhibitoren behandelt und die mRNA- und Protein-Expression von FOSL1 analysiert.

3.2.1 Die Expression von FOS Proteinen in humanen Melanomzelllinien in Abhängigkeit vom MAPK- und PI3K-Signalweg

Die humanen Melanomzelllinien A375, DX3, MelHo und SK-MEL28 wurden für 24 h mit U0126 (MEK-Inhibitor) oder als Kontrolle mit DMSO behandelt, um die Regulierung von FOSL1 auch in humanen Melanomen zu untersuchen. DX3 und MelHo Zellen besitzen außerdem einen aktivierten PI3K Signalweg und wurden daher zusätzlich für 24 h mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY29004 behandelt. Für Genexpressionsanalysen wurden Real-Time-PCRs durchgeführt, für Proteinexpressions-Analysen Western Blots. Für alle verwendeten humanen Melanomzelllinien konnte nach Zugabe des MEK-Inhibitors U0126 in Bezug auf die *FOSL1* mRNA und Proteinexpressionslevel eine Abnahme ermittelt werden (Abb. 12). Außerdem wurde auch nach einer 24 stündigen Behandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY29004 die FOSL1 Protein und mRNA-Expression in MeHo und DX3 Zellen reduziert (Abb. 12). Die FOSL1 Protein-Expression und in DX-3-Zellen auch

die mRNA-Expression konnte durch MEK-Hemmung stärker reduziert werden als durch PI3-Kinase-Hemmung (siehe Abb. 12).

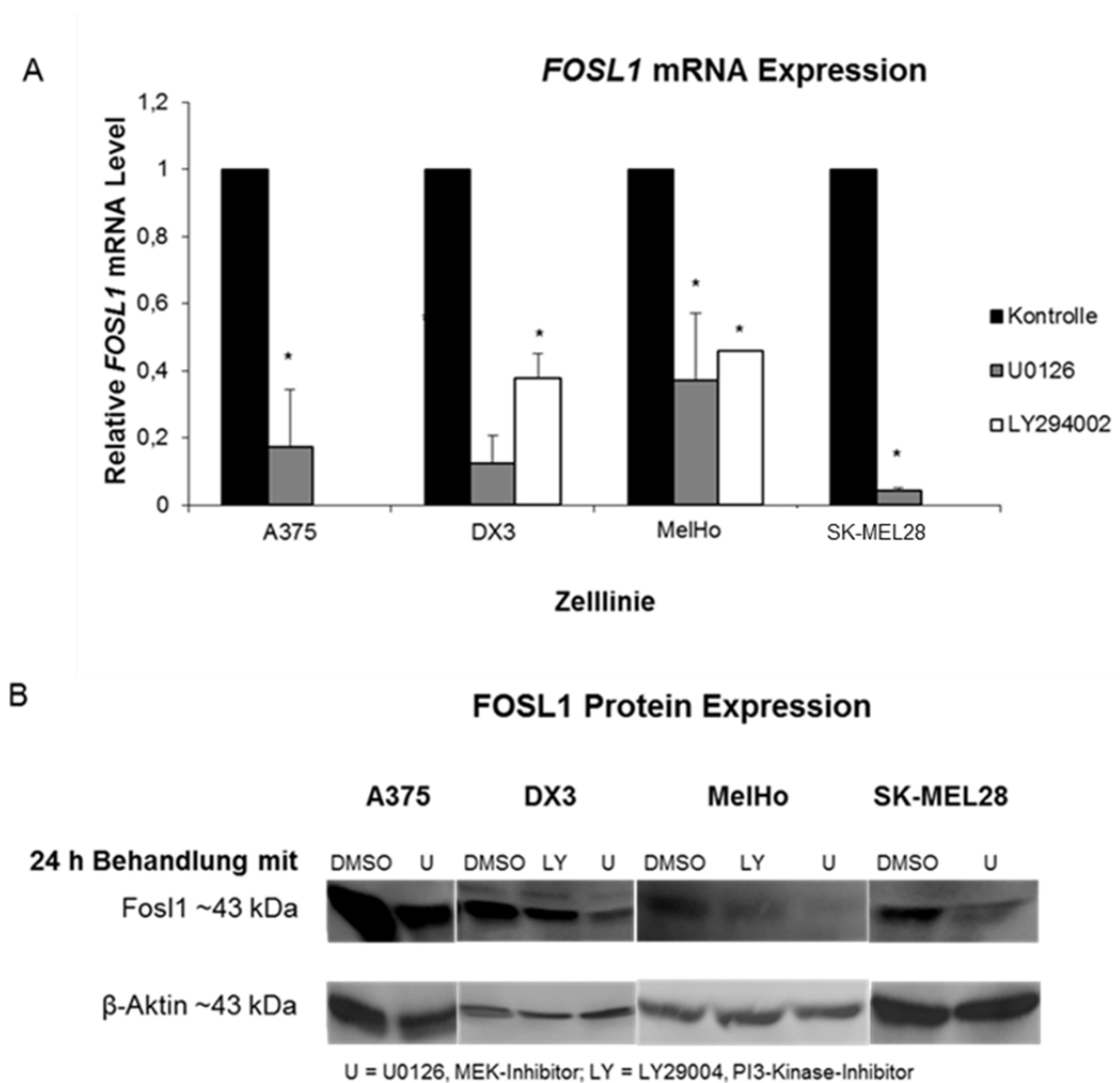


Abb. 12: Real-Time-PCR (A) und Western-Blot (B; 12%iges Gel) zur Bestimmung der Abhängigkeit der mRNA/Protein-Expression von FOSL1 in humanen Melanomzellen vom MAPK- oder PI3K-Signalweg (Behandlung mit MEK-Inhibitor U0126 und PI3K-Inhibitor LY29004). Real-Time-PCR: 2 biologisch unabhängige Experimente, je ein- bzw. zweimal technisch wiederholt. *: $p < 0,05$ (Student t-Test, gepaart, einseitig).

3.2.2 Die Untersuchung der Proliferation, Migration und Koloniebildung von humanen Melanomzellen

Bei der Entstehung und Metastasierung von humanen Melanomen spielen die Proliferation, die Migration und das Koloniebildungsverhalten von Melanomzellen eine wichtige Rolle (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Deshalb wurde das Koloniebildungs- und Proliferationsverhalten mit den humanen Melanomzelllinien A375, MelIm, MelHo und SK-MEL28 nach einem erfolgreichen stabilen Knock-down von FOSL1 untersucht. Dieselben Experimente wurden auch mit MelHo Zellen mit einer stabilen FOSL1 Überexpression durchgeführt. Herr PD Shuang Huang vom Department of Biochemistry des Medical College of Georgia stellte die FOSL1-spezifische shRNA für zur Verfügung (Chen *et al.*, 2009).

In Abb. 13 ist ersichtlich, dass nach einem erfolgreichen FOSL1 Knock-down (Abb. 13 A) alle vier Zelllinien nach 6 bzw. 7 Tagen vermindert proliferieren (Abb. 13 B). Außerdem war die Zellkoloniebildung in A375, MelIm und MelHo Zellen um bis zu zwei Drittel reduziert, wohingegen hierbei in SK-MEL28 keine Effekte ersichtlich waren.

Somit hat ein effektiver permanenter FOSL1 Knock-down in humanen Melanomzellen offenbar Effekte auf die Proliferation und die Zellkoloniebildung.

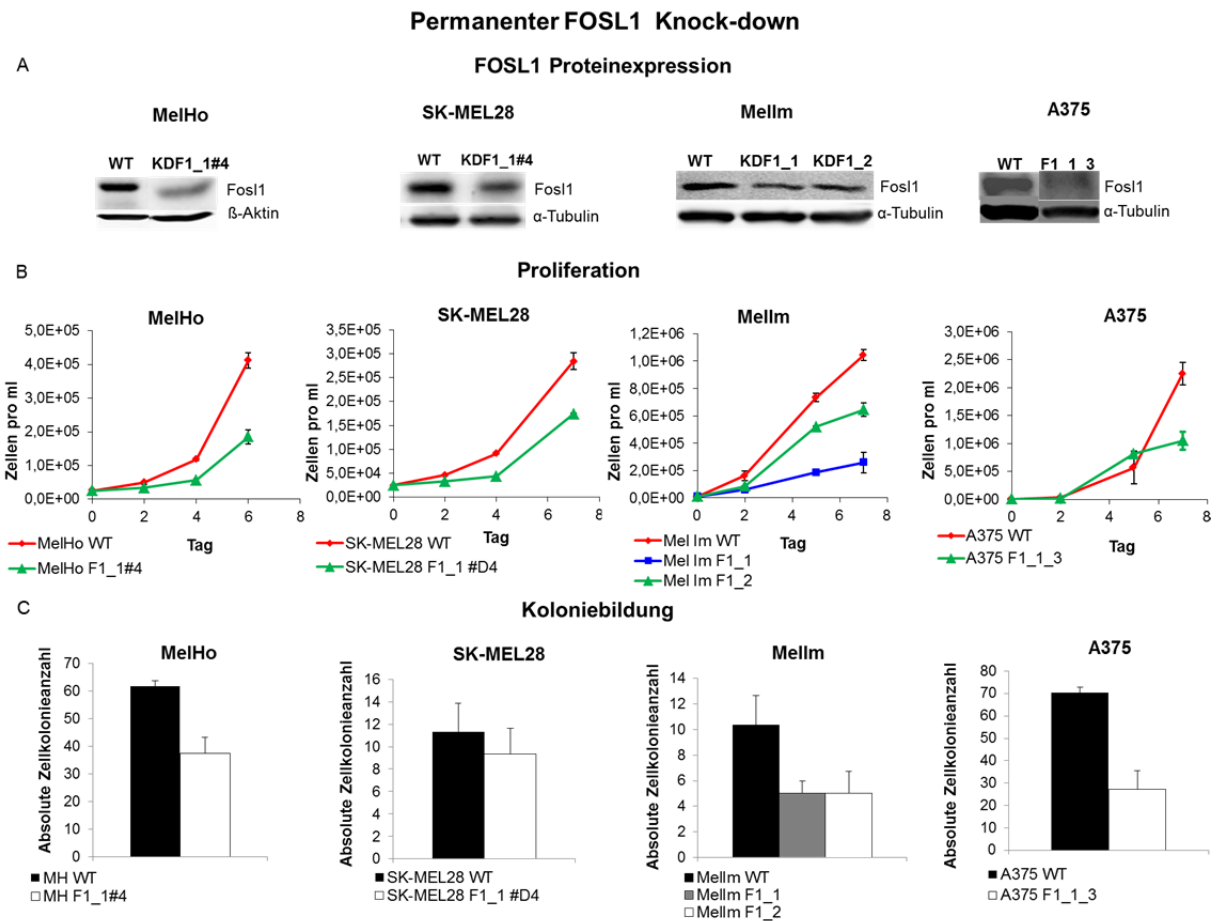


Abb. 13: Einfluss eines permanenten FOSL1 Knock-downs (bestätigt als Western-Blot mit 12%igem Gel in (A)) auf die Proliferation (B) und Koloniebildung (C, Softagarassay) von MelHo-, SK-MEL28-, MelIm- und A375-Melanomzellen. Softagar- und Proliferationsassay wurden jeweils als Triplets durchgeführt. Der Softagarassay zur Bestimmung der Koloniebildung wurde an Tag 7 mit 50-facher Vergrößerung ausgewertet. WT, Wildtyp; MH, MelHo; F1_1, F1_1#4, F1_1/2, F1_1_3, FOSL1 Knock-down Klone. α -Tubulin (~ 50 kDa)

Um zu ermitteln, ob FOSL1 einen Einfluss auf die Migration von humanen Melanomzellen hat, wurde das Migrationsverhalten von MelHo Zellen in Kooperation mit der AG Bosserhoff in Regensburg untersucht.

Nach einem erfolgreichen siRNA Knock-down (Abb. 14 A) von FOSL1 konnte mit Hilfe eines Boydenkammerassays in MelHo Zellen eine Reduktion der migrierten Zellen pro Feld ermittelt werden (Abb. 14 B; Kooperation über den Deutschen Melanomverbund, AG Bosserhoff in Regensburg).

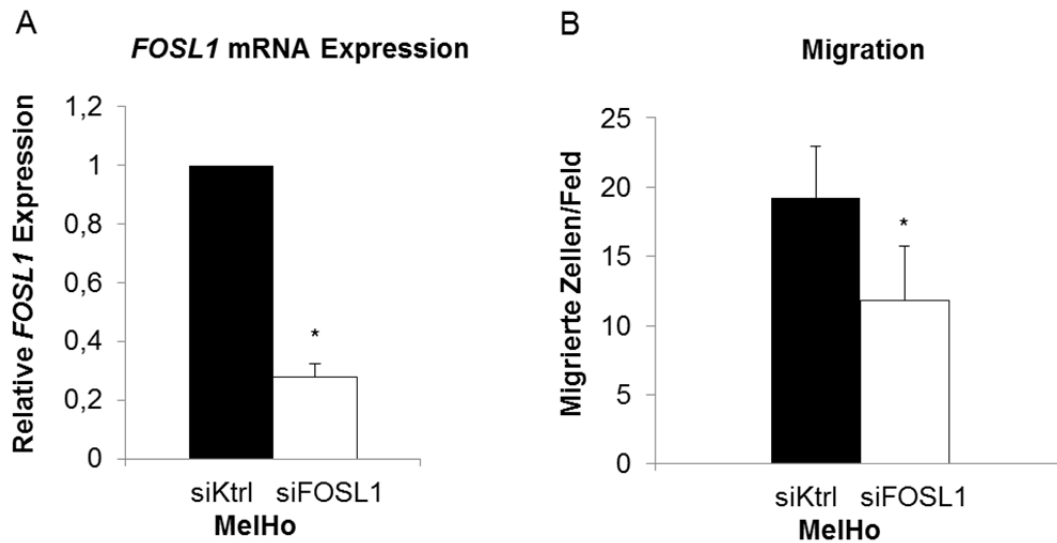


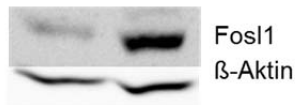
Abb. 14: FOSL1 siRNA-Knock-down (A; RT-PCR) und Untersuchung des Migrationsverhaltens (B; Boydenkammerassay) in MelHo Zellen (humane Melanomzellen). siKtrl, siKontrolle; siFOSL1, FOSL1 siRNA Knock-down. Es wurden Duplikate verwendet.

Nach der Untersuchung des Effektes eines FOSL1-Knockdowns sollte im Anschluss auch untersucht werden, ob eine erhöhte FOSL1 Expression die tumorigenen Eigenschaften von Melanomzellen verstärken kann. Dies wurde mit Hilfe einer permanenten Überexpression in MelHo Zellen überprüft. In Abb. 15 A ist die Effektivität dieser Überexpression ersichtlich. Diese FOSL1 Überexpression führte zu einer erhöhten Proliferation, das Koloniebildungsverhalten blieb jedoch unbeeinflusst (siehe Abb. 15 B und C).

Permanente FOSL1 Überexpression in MelHo Zellen

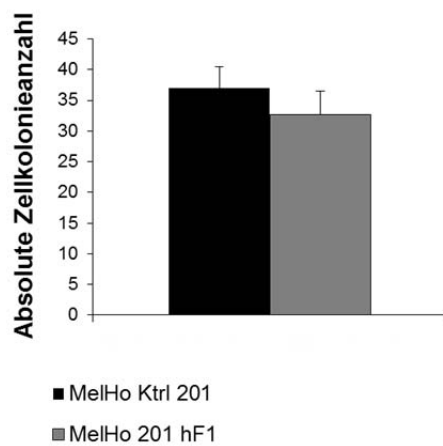
A

FOSL1 Protein Expression



B

Koloniebildung



C

Proliferationsassay

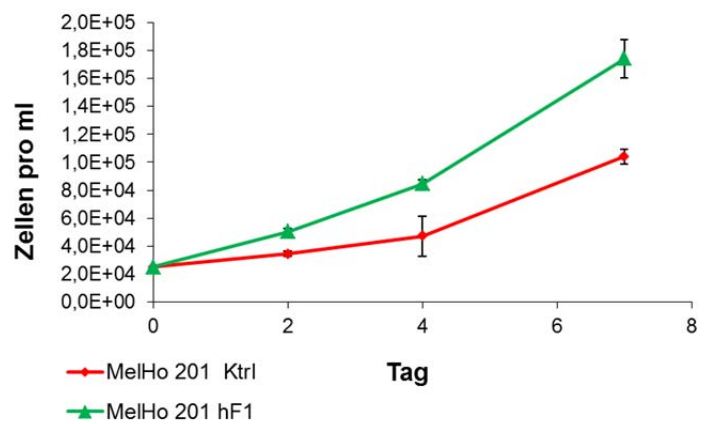


Abb. 15: Einfluss einer permanenten FOSL1 Überexpression auf die Proliferation (A) und Koloniebildung (B, Softagarassay) von MelHo Melanomzellen. Western Blot zur Bestätigung des Knock-downs (12%iges Gel). Softagar- und Proliferationsassay wurden jeweils im Triplet durchgeföhrt. Der Softagarassay zur Bestimmung der Koloniebildung wurde an Tag 14 mit 50-facher Vergrößerung ausgewertet. Ktrl 201, Kontrolle; 201 hF1, FOSL1 Überexpression Klon 201 hF1.

Insgesamt scheint FOSL1 in humanen Melanomzellen einen deutlichen Effekt auf die Proliferation zu haben. Die Migration wurde nur in MelHo-Zellen untersucht, wo sie ebenfalls leicht durch einen Knock-down von FOSL1 reduziert war.

3.3 Potentielle Zielgene von FOSL1

Bei der Induktion der Metastasierung von Krebszellen spielen SLUG, aber auch SNAIL1, SNAIL3, E- und N-Cadherin sowie TWIST1 eine wichtige Rolle (Thiery, 2002; Katoh & Katoh, 2003; Katoh & Katoh, 2005; Shi et al., 2005; Alves *et al.*, 2009; Casas *et al.*, 2011). Außerdem reguliert die anhaltende Expression von SLUG durch den ERK-FOSL1/cJUN-Signalweg die Migration von Brustkrebszellen (Chen *et al.*, 2009). Bei *MMP14* und *CyclinE1* handelt es sich um Zielgene von cJUN (Spangler *et al.*, 2009, Feng *et al.*, 2010).

Daher sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob es sich bei den genannten Genen auch um Zielgene von FOSL1 in humanen Melanomzellen handelt. Bei den folgenden Experimenten wurden A375, MelHo und SK-MEL28 mit transientem und /oder permanentem FOSL1-siRNA Knock-down sowie MelHo Zellen zusätzlich mit einer permanenten Überexpression von FOSL1 verwendet und miteinander verglichen.

Nach erfolgreichem *FOSL1* siRNA Knock-down konnte in den humanen A375 Melanomzellen eine Reduktion der *SLUG* und *SNAIL3* mRNA Level beobachtet werden (siehe Abb. 16). *SNAI1* sowie *TWIST1* zeigten keine oder nur eine geringe Verminderung der mRNA-Expression nach dem *FOSL1* siRNA Knock-down (Abb. 16 A).

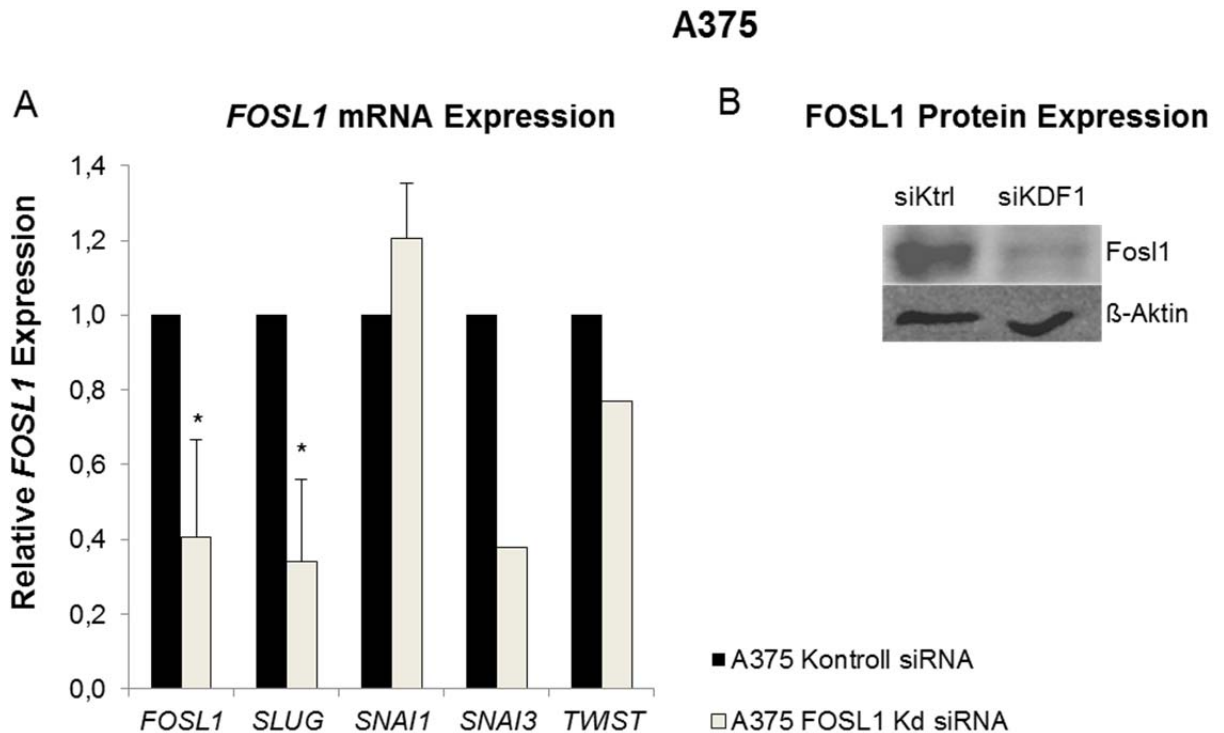


Abb. 16: Real-Time-PCR (A) und Western Blot (B, 12%iges Gel) zur Überprüfung der Zielgene von FOSL1 in A375 Zellen. Real-Time-PCR's für *FOSL1*, *SLUG* und *SNAI1*: Zwei biologisch unabhängige Experimente. *SNAI3* und *TWIST*: ein Experiment. kd = Knock-down. siKtrl, siRNA Kontrolle; siKDF1, FOSL1 siRNA Knock-down. *: $p < 0,05$ (Student t-Test, gepaart, einseitig).

In SK-MEL28 Zellen blieben alle untersuchten Gene bei einem transienten *FOSL1* Knock-down unbeeinflusst (Abb. 17 A). Im Gegensatz dazu konnten nach einem permanenten FOSL1 Knockdown erhöhte *MMP2*, *CyclinE1* und *MMP9* Level und erniedrigte *MMP14* und *IL6* Level ermittelt werden (Abb. 17 C).

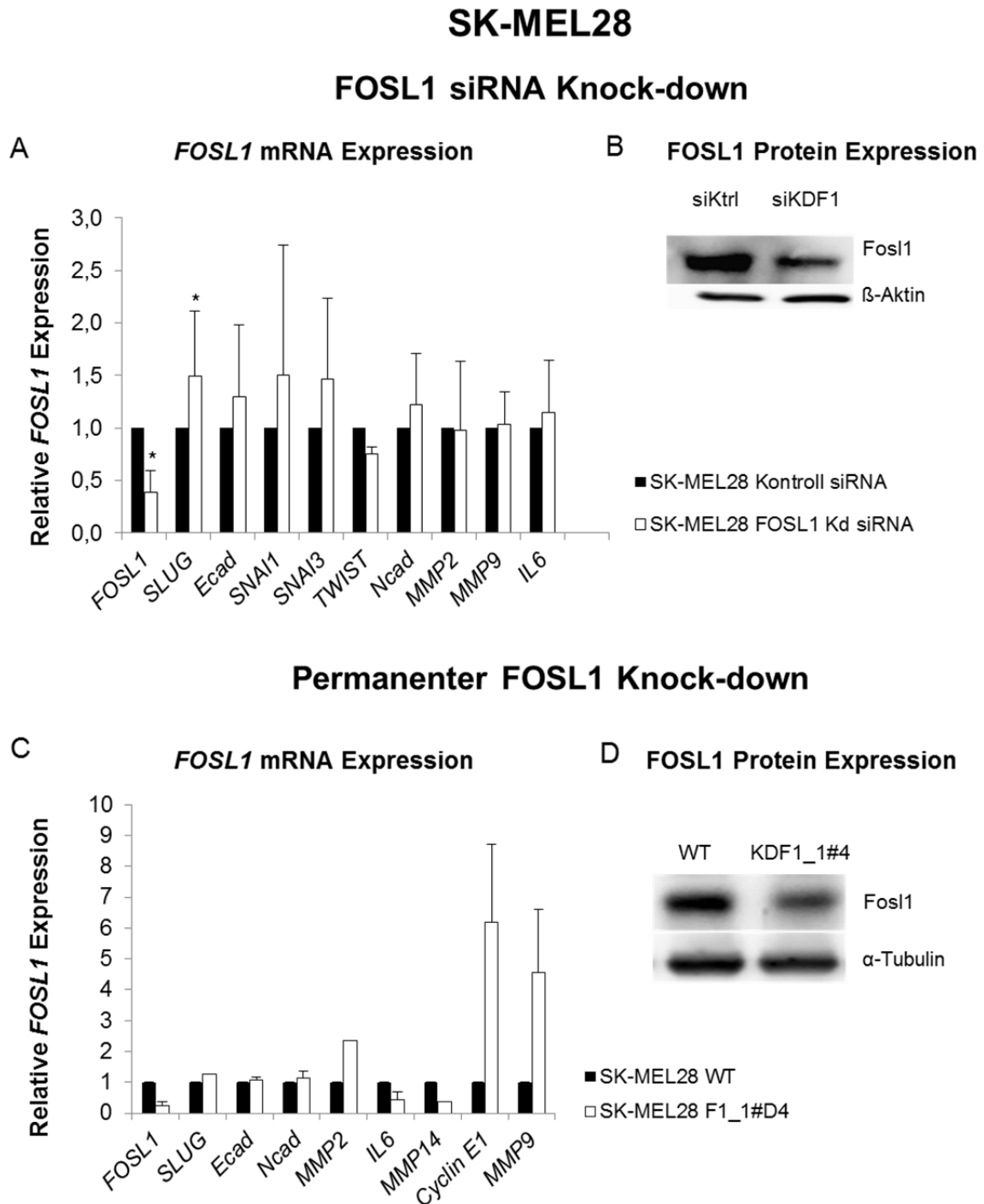


Abb. 17: Real-Time-PCR (A, C, E) und Western Blot (B, D, F 12%iges Gel) zur Überprüfung der Zielgene von FOSL1 in SK-MEL28 Zellen. siRNA Knockdown (A): Für *TWIST* und *IL6* lag nur ein Experiment vor. Alle anderen Gene wurden mit 2-4 biologischen Replikaten analysiert. Permanenter Knock-down (C): Die Daten stammen aus einem Experiment, das einmal technisch wiederholt wurde. kd = Knock-down; E/Ncad = E- bzw. N-Cadherin. siKtrl, siRNA Kontrolle; siKDF1, FOSL1 siRNA Knock-down. *: $p < 0,05$ (Student t-Test, gepaart, einseitig).

In MelHo Zellen war nach einem transienten Knock-down eine leichte Reduktion von *MMP9* zu sehen. Ansonsten waren sowohl nach transientem als auch nach permanentem FOSL1 Knock-down keine Reduktion der Expressionslevel der getesteten potentiellen Zielgene von FOSL1 zu beobachten (Abb. 18 A, C). Jedoch stiegen nach erfolgreichem permanentem FOSL1 Knock-down die *E-Cadherin* sowie die *MMP9* mRNA-Level um das 2,5- bzw. 3-fache an (Abb. 18 C).

Eine 25-fache Überexpression von FOSL1 führt in MelHo Zellen zu einer 24-fach erhöhten *IL6* mRNA-Expression und zu einer leichten Erhöhung (2-fach) von *E-Cadherin* (Abb. 18 E). Die Differenzen zwischen Knockdown und Überexpression sind möglicherweise damit zu erklären, dass hohe Level an FOSL1 benötigt werden, um beispielsweise das Zielgen IL-6 zu aktivieren. Darüber hinaus wurden nach der erfolgreichen FOSL1 Überexpression stark reduzierte *CyclinE1* ermittelt und auch die *MMP9* Level waren deutlich herabreguliert.

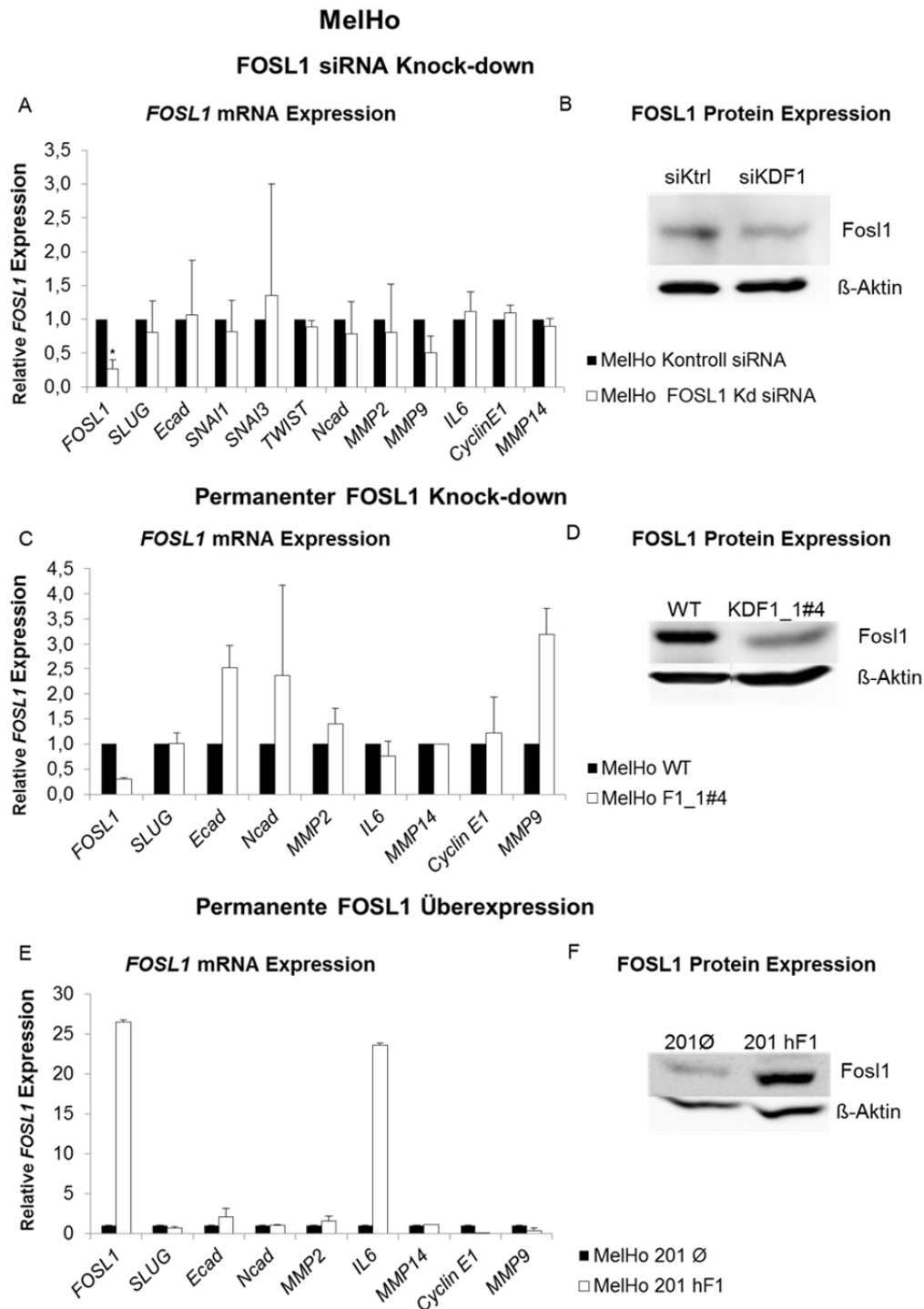


Abb. 18: Real-Time-PCR (A, C, E) und Western Blot (B, D, F 12%iges Gel) zur Überprüfung der Zielgene von FOSL1 in MelHo Zellen. Transienter Knock-down (A): Für alle Gene außer *MMP14* wurden die Versuche 2-5 biologisch unabhängig analysiert, wobei sie 2-5 Mal technisch wiederholt wurden. Im Falle von *MMP14* lag nur ein Experiment vor. Permanenter Knock-down (C): Ein Experiment, einmal technisch wiederholt. kd = Knock-down; E/Ncad = E- bzw. N-Cadherin. siKtrl, siRNA Kontrolle; siKDF1, FOSL1 siRNA Knock-down. *: $p < 0,05$ (Student t-Test, gepaart, einseitig).

Um die Ergebnisse der unterschiedlichen Zelllinien besser miteinander vergleichen zu können, sind diese in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Zusammenfassung der Effekte eines FOSL1 Knock-downs bzw. einer Überexpression in humanen Melanomzellen auf potentielle Zielgene von FOSL1

Zelllinie:	A375	MelHo			SK-MEL28	
	Effekt nach FOSL1 Knock-down/Überexpression					
Gen	siRNA KD	siRNA KD	perm. KD	Überexpr.	siRNA KD	perm. KD
<i>FOSL1</i>						
<i>SLUG</i>						
<i>E-Cadherin</i>	n.e					
<i>N-Cadherin</i>	n.e					
<i>MMP2</i>	n.e					
<i>MMP9</i>	n.e					
<i>MMP14</i>	n.e				n.e	
<i>IL6</i>	n.e					
<i>CyclinE1</i>	n.e				n.e	
<i>SNAI1</i>			n.e.	n.e.		n.e.
<i>SNAI3</i>			n.e.	n.e.		n.e.
<i>TWIST</i>			n.e	n.e.		n.e.

mRNA-Level (reguliert im Vergleich zur Kontroll-siRNA behandelten Probe):

0 – 0,25 dunkelgrün; stark herabreguliert

> 0,25 – 0,5 hellgrün; herabreguliert

> 0,5 – 2 weiß; keine oder nur leichte Änderungen

> 2- 4 orange, heraufreguliert

≥ 4 rot; stark heraufreguliert

ne; nicht erhoben

Wie in Tabelle 3 ersichtlich ist, konnten *SLUG* und *SNAI3* in siRNA-behandelten A375 Zellen, nicht aber in SK-MEL-28 und MelHo-Zellen als mögliche Zielgene von *FOSL1* identifiziert werden.

In Bezug auf die *IL6* Expression konnte sowohl nach einem permanenten Knock-down in SK-MEL28 Zellen eine Herabregulierung sowie nach erfolgreicher Überexpression in MelHo Zellen eine Heraufregulierung beobachtet werden. Somit wäre es sehr gut möglich, dass es sich bei *IL6* um ein Zielgen von *FOSL1* handelt. Auch *MMP14* scheint zumindest in SK-MEL28-Zellen ein durch *FOSL1* positiv reguliertes Zielgen zu sein.

MMP9, *MMP2* und *CyclinE1* Expression scheinen eher negativ durch *FOSL1* reguliert zu werden, allerdings nur nach langfristiger stabiler Manipulation der *FOSL1*-Levels und nicht nach siRNA-vermitteltem Knockdown. Dieses spricht dafür, dass diese Gene indirekte Ziele von *FOSL1* sind. Möglicherweise trifft dieses auch für *MMP2* in SK-MEL28-Zellen zu.

Diese Ergebnisse deuten an, dass einerseits Unterschiede innerhalb der Zelllinie zu beobachten sind, je nachdem, ob die *FOSL1*-Level permanent oder mit siRNA reduziert wurden. Andererseits zeigen sich auch Unterschiede zwischen den verschiedenen humanen Melanomzellen.

Zusammenfassend konnte mit den Ergebnissen in Abschnitt 3.3 ermittelt werden, dass *SLUG*, *MMP9*, *MMP14*, *IL6* und *SNAI3* als potentielle Zielgene von *FOSL1* in humanen Melanomzellen in Betracht gezogen werden können.

4. Diskussion

FOSL1 ist ein Protein, das mit Tumorprogression mehrerer humaner Krebsarten assoziiert wurde. In dieser Arbeit sollte nun seine Rolle im humanen Melanom genauer untersucht werden.

Der AP-1-Komplex

FOSL1 ist ein Bestandteil des AP-1-Komplexes, der eine hohe Relevanz für die Entstehung und Progression von humanen Tumoren besitzt. Dieser Protein-Komplex spielt bei der Regulation von diversen zellulären Funktionen, einschließlich Proliferation, Differenzierung, Stressantworten und Apoptose eine entscheidende Rolle (Young *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2004; Basbous *et al.*, 2007). Dieser Komplex besteht aus JUN, FOS und ATF (activating transcription factor) Proteinen (Young *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2004; Basbous *et al.*, 2007; Baan *et al.*, 2010). Bisherige genetische und biochemische Untersuchungen zeigten, dass selektive Interaktionen zwischen JUN, FOS und ATF eine wichtige Funktion bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Überleben von Krebszellen spielen (Baan, *et al.*, 2010).

Als ein Bindungspartner von FOSL1 im AP1-Komplex könnte somit ATF2 in Frage kommen. Jedoch konnte in Maus und humanen Melanomzellen, sowohl bei Zellkultur Experimenten wie auch im Tiermodell, ermittelt werden, dass ATF2 Peptide Apoptose induzieren (Ronai *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2013). Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass FOSL1 pro-tumorigene Effekte wie Proliferation und Migration auslöst, ist es unwahrscheinlich, dass ATF2 als Bindungspartner von FOSL1 im humanen Melanom dient.

Auch cJUN, die am besten untersuchte AP1-Komponente, könnte im AP1-Komplex an FOSL1 binden. Dieses JUN Protein ist in vielen *in vivo* und *in vitro* Umgebungen als Onkogen aktiv und spielt bei der Entstehung und Progression von humanen

Melanomen eine wichtige Rolle, indem es die AP1-Aktivität und damit Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Stressantworten reguliert (Young *et al.*, 2002; Basbous *et al.*, 2007; Spangler *et al.*, 2011). Hierbei stellt cJUN einen essentiellen Regulator der Proliferation dar, indem es EGFR, CyclinD1 und andere proliferationsstimulierende Gene reguliert (Shaulian & Karin, 2001; Shaulin, 2010; Kappelmann *et al.*, 2013). In Bezug auf die Apoptose hemmt cJUN die Expression des Tumorsuppressors p53, was wiederum zur Inhibition der Apoptose führt und somit die Tumorprogression begünstigt (Mils *et al.*, 1997; Kappelmann *et al.*, 2013). Auch in Bezug auf die Metastasierung spielt cJUN eine wichtige Rolle, da es durch eine spezifische Regulation von Proliferin die Angiogenese verstärkt und die Invasivität begünstigt, indem es CD44, ein Zelloberflächen-Glykoprotein das an Zell-Zell-Interaktionen, Adhäsion und Migration beteiligt ist, hochreguliert (Kappelmann *et al.*, 2013). Da die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuten, dass FOSL1 eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Migration spielen könnte, wäre es daher sehr gut möglich, dass es sich bei cJUN um einen Bindungspartner von FOSL1 handelt.

Interessanterweise sind in aggressiven, „basal-like“ Brustkrebszellen die Level an cJUN/FOSL1 Dimeren im Vergleich zu cJUN/ATF2 und cJUN/cFOS Dimeren überrepräsentiert. Dies könnte in ähnlicher Weise auch im humanen Melanom der Fall sein (Baan *et al.*, 2010). Diese Vermutung wird dadurch verstärkt, dass erste affinitäts-elektrophoretische Untersuchungen zeigten, dass etwa 50% des im AP-1 Komplex detektierten FOSL1 in den humanen Melanomzellen Mellm an cJUN bindet (Kollaboration mit AG Bosserhoff, Poster Haug *et al.*, 2010).

Außerdem ergaben bisherige Untersuchungen, dass MMP14, ein Zielgen von cJUN, zum Invasionsgeschehen in Melanomzellen beiträgt und vermutlich auch an der Proliferation beteiligt ist (Seiki & Yana, 2003; Spangler *et al.*, 2011). Da mit dieser Arbeit *MMP14* als potentiell Zielgen von FOSL1 identifiziert werden konnte, ist es sehr gut möglich, dass cJUN in den hier untersuchten Melanomzellen als Bindungspartner von FOSL1 fungiert und dadurch tumorigene Eigenschaften wie Proliferation und Invasion in Melanomzellen vermittelt werden.

Die Regulierung von FOSL1

Mit dieser Arbeit sollte außerdem die Regulierung von FOSL1 im humanen Melanom untersucht werden. Hierzu konnte bereits für zahlreiche Krebsarten, wie zum Beispiel Darm-, Lungen und Brustkrebs, eine Erhöhung der FOSL1 mRNA und Proteinlevel beschrieben werden (Young & Colburn, 2006).

Um die Rolle von FOSL1 im Melanom genauer zu charakterisieren, wurde zunächst ermittelt, dass in HERmrk-transgenen Maus-Melanozyten (melan a Hm^{me} Zellen) sowohl die FOSL1 Protein- als auch mRNA-Expression durch EGF stimuliert wird (siehe Abschnitt 3.1 Abb. 8 und 9). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die FOSL1 Expression auf mRNA-Ebene vom MAPK- und vom PI3-Kinase-Signalweg gesteuert wird (Abschnitt 3.1.3 Abb. 10).

In Bezug auf das humane Melanom führten Packer *et al.* bereits Microarrays mit humanen A375-Melanomzellen durch, die BRAF^{V600E} exprimieren und eine konstitutive Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs in Bezug auf Proliferation und Überlebensraten zeigen. Bei diesen Untersuchungen konnte FOSL1 zunächst als BRAF-Target identifiziert werden (Packer *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte der Einfluss der FOSL1 Expression auf die MEK/ERK-Signalkaskade dadurch bestätigt werden, dass diese durch MEK-Inhibition um bis zu dreifach gehemmt werden konnte (Packer *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden MEK-Inhibitor-Experimente nicht nur mit A375 Zellen, sondern auch mit drei weiteren humanen Melanomzelllinien durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.1 Abb. 12). Hierbei konnte für die humanen Melanomzelllinien A375, MelHo und SK-MEL28, die eine BRAF Mutation haben, bestätigt werden, dass eine Abhängigkeit vom MEK/ERK-Signalweg besteht. Des Weiteren wurden diese Untersuchungen auch mit DX3 Zellen durchgeführt, die eine NRAS-Mutation besitzen, um zu ermitteln, ob FOSL1 auch in diesen Zellen abhängig vom MEK/ERK-Signalweg exprimiert wird. Auch in diesen Zellen konnte gezeigt werden, dass die FOSL1 Expression durch den MAPK-Signalweg gesteuert wird.

Darüber hinaus zeigten bisherige FOSL1-Expressionsanalysen, dass eine erhöhte FOSL1 Expression in Krebszellen mit erhöhter ERK1/2 Aktivität mit Tumorigenese in Verbindung gebracht werden kann (Babous *et al.*, 2007). Bei diesen Untersuchungen konnte die Kontrolle der Proteindegradierung als ein kritischer Punkt der Regulierung der FOSL1 Level identifiziert werden. So wurde gezeigt, dass die intrinsische Instabilität von FOSL1 von einem einzigen Destabilisator abhängt, der in den C-terminalen Aminosäuren 30 bis 40 enthalten ist (Babous *et al.*, 2007). In diesen werden die Serine S252 und S265 durch Kinasen des ERK1/2 MAPK Signalwegs, phosphoryliert (Babous *et al.*, 2007). Als Folge davon wird das FOSL1-Protein vor dem proteasomalen Abbau geschützt. Die FOSL1 Stabilität wird somit durch den MAPK-Signalweg reguliert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in Bezug auf die FOSL1 Expression im humanen Melanom ist, dass in Melanomen mit wildtypischem BRAF oder NRAS häufig Amplifikationen der Chromosomenregion 11q13, auf dem FOSL1 lokalisiert ist, aufweisen (siehe Abb. 19; Gerami *et al.*, 2013; Puig-Butillé *et al.*, 2013). Dieser Chromosomenabschnitt ist, wie Gerami *et al.* ermitteln konnten, mit der Metastasierung und einer schlechten Überlebensprognose im Hautkrebs assoziiert (Gerami *et al.*, 2013). Auf dem Chromosom 11q13 ist neben FOSL1 außerdem *CCND1* zu finden, das für das Zellzyklusgen CyclinD1 kodiert und eine Komponente des RAS-BRAF-Signalwegs darstellt (Curtin *et al.*, 2005; siehe Abb. 20).

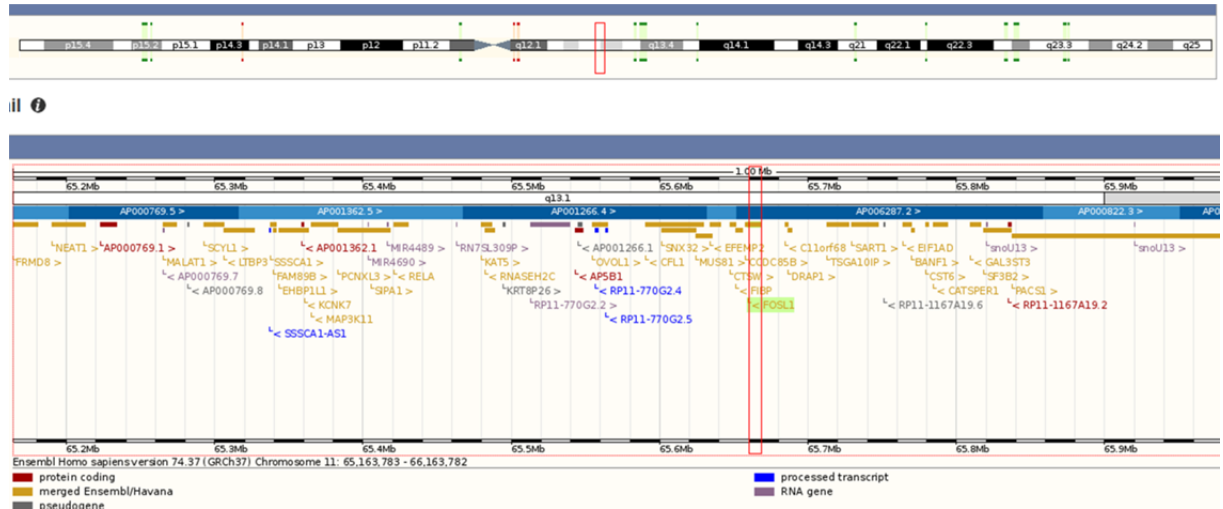


Abb. 19: Lokalisierung von FOSL1 auf dem humanen Chromosom 11q13

Quelle: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000110092;r=11:69455855-69469242

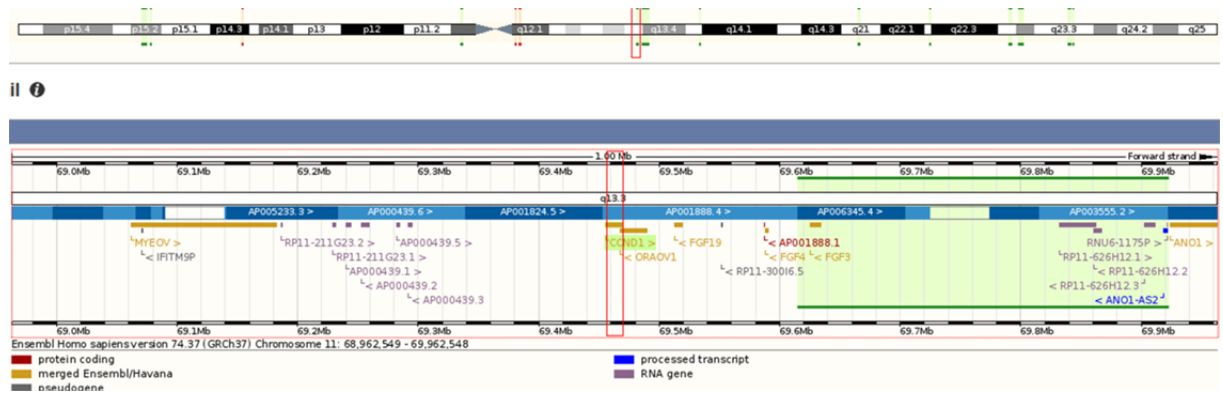


Abb. 20: Lokalisierung von CyclinD1 (CCND1) auf dem humanen Chromosom 11q13

Quelle: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000175592;r=11:65659520-65668044

Pro-tumorigene Eigenschaften von FOSL1

Wie bereits erwähnt spielt FOSL1 in unterschiedlichen Krebsarten eine entscheidende Rolle (Young & Colburn, 2006).

So wurde beschrieben, dass FOSL1 die mitotische Progression in RAS-transformierten thyroidalen Zellen reguliert (Casalino *et al.*, 2007). Die FOSL1 Expression und Phosphorylierung erreicht im Übergang der G2-Phase („Gap“-Phase 2) in die M-Phase (Mitosephase) ihren Höhepunkt (Casalino *et al.*, 2007). Casalino *et al.* konnten zeigen, dass ein Knock-down von FOSL1 einen proliferativen Block und Apoptose auslöst, wobei die meisten Zellen in der G2-Phase akkumulierten und die Zellteilung somit stagnierte (Casalino *et al.*, 2007). Eine kleine Fraktion von Zellen trat hierbei jedoch in die M-Phase über, unterliefen einer abortiven Zellteilung und wiesen Charakteristika auf, die für genetische Instabilität typisch sind, wie z.B. fehlende Chromosomenbrücken. Somit scheint FOSL1 bei der Regulierung des Zellzyklus in RAS-transformierten thyroidalen Zellen eine wichtige Rolle zu spielen (Casalino *et al.*, 2007).

FOSL1 konnte darüber hinaus als hauptsächliche Komponente identifiziert werden, die für die RAS-bedingte Transformation von Lungenkrebszellen (non-small cell lung cancer, NSCLC Zellen) verantwortlich ist (Risse-Hackl *et al.*, 1998; Young & Colburn, 2006). Eine veränderte AP1-Aktivität ist bekanntermaßen insbesondere mit einer erhöhten RAS-Aktivität assoziiert (Marshall, 1995; Hill Treismann 1995; Risse-Hackl *et al.*, 1998). Risse-Hackl *et al.* untersuchten die unterschiedlichen AP-1 Komponenten genauer und konnten ermitteln, dass FOSL1 in NSCLC Zellen verstärkt exprimiert wird, so dass FOSL1 bei der Transformation von SCLC (small cell lung cancer) zu NSCLC beteiligt ist, die mit der Progression jedes Lungenkrebstyps einhergeht (Risse-Hackl *et al.*).

Auch in Kolorektalkarzinomzellen spielt FOSL1 offenbar eine wichtige Rolle (Young & Colburn, 2006). Hier konnte gezeigt werden, dass die ERK-MAPK-anhängige

Expression von FOSL1 für die Motilität und Invasion von Kolonkarzinomzellen erforderlich ist. Außerdem supprimiert FOSL1 den β 1-Integrin-Signalweg, wodurch die RhoA (homolog gene family, member A) Aktivitätslevel in diesen Zellen herunterreguliert werden (Vial *et al.*, 2003). Die geringe RhoA Aktivität ermöglicht ein zweites ERK-abhängiges Signalereignis, dass die Motilität der Krebszellen antreibt. Außerdem konnte durch verminderte FOSL1 Expression das Fehlen von Motilität und Invasivität in Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden (Vial *et al.*, 2003). Somit scheint FOSL1 in Kolonkarzinomzellen am Invasionsgeschehen beteiligt zu sein (Young & Colburn, 2006).

Auch in Brustkrebszellen spielt FOSL1 in Bezug auf Motilität und Invasivität eine entscheidende Rolle (Young & Colburn, 2006). Belguise *et al.* untersuchten diese in Brustkrebszellen mit einem aggressiven Phänotyp genauer, indem sie FOSL1 in MCF7 ER⁺ Brustkrebszellen überexprimierten sowie die FOSL1 Expression in MDA-MB-231 ER⁻ Brustkrebszellen inhibierten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass FOSL1 die Proliferation, Invasivität und Motilität dieser Brustkrebszellen *in vitro* steuert. Des Weiteren konnten Belguise *et al.* eine Korrelation zwischen der FOSL1 Expression und der Expression von Genen nachweisen, die an der malignen Progression beteiligt sind, wie beispielsweise die Metalloproteinase MMP9 (Belguise *et al.*, 2005). Daher scheint FOSL1 bei der Brustkrebsprogression eine entscheidende Rolle zu spielen, indem es vermutlich die Expression dieses Gens verstärkt, wodurch wiederum die Motilität und Invasivität der Krebszellen begünstigt wird, da für MMP9 bereits beschrieben werden konnte, dass seine erhöhte Expression zu diesen biologische Prozessen beiträgt (Somari *et al.*, 2004; Belguise *et al.* 2005; Young & Colburn, 2006).

Da FOSL1 in den genannten Krebsarten eine entscheidende Funktion zukommt, liegt es nahe zu vermuten, dass FOSL1 auch bei der Entstehung von humanen Melanomen eine wichtige Rolle spielt. Die Ergebnisse in Abschnitt 3.2.3 zeigen, dass ein Knock-down in verschiedenen humanen Melanomzellen zu verminderten Proliferationsraten führt, wohingegen eine Überexpression eine Verstärkung der

Proliferation zur Folge hat. Somit scheint eine erhöhte FOSL1 Expression die Proliferation auch im humanen Melanom zu begünstigen und damit an diesem Prozess maßgeblich beteiligt zu sein.

Außerdem wurden auch die Migration und die Zellkoloniebildung durch einen FOSL1 Knock-down vermindert. Somit wäre es möglich, dass FOSL1 an diesen beiden Prozessen, die zur Melanomentstehung beitragen, ebenfalls beteiligt ist.

Shin *et al.* konnten bereits zeigen, dass FOSL1 in mamillären Epithelzellen für die RAS- und ERK2-induzierte „epithelial-mesenchymal-transition“ (EMT) verantwortlich ist, die bei der Induktion der Metastasierung eine wichtige Rolle spielt (Shin *et al.*, 2010). SLUG und SNAIL3 sind bereits bekannte Initiatoren der EMT und sind an der Metastasierung maßgeblich beteiligt (Cassas *et al.*, 2011). Die SLUG Expression wird in Brustkrebszellen außerdem durch die ERK-FOSL1/cJun Achse reguliert. Diese Untersuchungen zeigten außerdem, dass die Migration in Brustkrebszellen durch den ERK-Signalweg, welcher prinzipiell auch die FOSL1 Expression reguliert, mit Hilfe von SLUG gesteuert wird (Young & Colburn, 2006; Chen *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte eine FOSL1 abhängige SLUG Expression nur für eine Melanomzelllinie gezeigt werden. Die Rolle von SLUG im humanen Melanom müsste somit noch intensiver untersucht werden, um sicher zu stellen, dass SLUG wirklich ein robustes Zielgen von FOSL1 darstellt.

Außerdem konnten bisherige Untersuchungen zeigen, dass die Metalloproteinasen MMP9 und MMP14, genau wie SNAIL3 und SLUG, ebenfalls den Prozess der EMT initiieren und somit sehr wahrscheinlich auch zur Invasion und Migration bei epithelial-abgeleiteten Krebsarten beitragen (Douglas *et al.*, 2010). Des Weiteren ist bereits bekannt, dass MMPs in Plattenepithelkarzinom autokrine Schleifen generieren, die verschiedene Rezeptoren der EGFR-Familie stimulieren und in den Zellen verstärkte Proliferation auslösen (O-Charoenrat *et al.*, 2002). Weiterhin zeigten D'Angelo *et al.* (2001), dass FOSL1 in Brustkrebszellen verschiedene Gene reguliert, die an Invasion, Angiogenese und Zellproliferation beteiligt sind und die

MMP9 Promotor Aktivität direkt induzieren. Außerdem konnten Luan *et al.* in Lungenkrebszellen (NSCLC) zeigen, dass erhöhte MMP9 Level eine starke Aktivierung von Diversin, einem Protein, das am JNK-Signalweg beteiligt ist, vorliegen. Dies führt wiederum zu erhöhten Proliferationsleveln und begünstigt vermutlich auch die Invasion in NSCLCs (Luan *et al.*, 2013). Nicht zuletzt konnte *MMP9* in Maus Alveolarzellen bereits als Zielgen von FOSL1 identifiziert werden (Young *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch darauf schließen, dass *MMP9* eher ein negativ reguliertes Zielgen bei dauerhafter FOSL1-Manipulation darstellt. Dieses könnte in der unterschiedlichen Verfügbarkeit der jeweiligen FOSL1-Dimisierungspartner in Lungenkrebs- bzw. Melanomzellen begründet liegen.

Auch für die Metalloproteinase *MMP14*, Zielgen der AP1-Komponente cJUN, konnte bereits gezeigt werden, dass sie an der Proliferation von Krebszellen in der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle spielt, indem sie den ERK-Signalweg aktivieren (Spangler *et al.*, 2009; Ulasov *et al.*, 2013). Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *MMP14* in SK-MEL28 Zellen bei einem permanentem FOSL1-Knock-down als potentiell Zielgen von FOSL1 in Frage kommt.

Auch die Zellzykluskomponente *CyclinE1* wurde bei dieser Arbeit als mögliches Zielgen von FOSL1 untersucht. CyclinE1 ist an der für Krebszellen typischen deregulierten Proliferation beteiligt und trägt in epithelialen Ovarialkarzinomen zu erhöhten Überlebensraten bei (Saini *et al.*, 2009; Pils *et al.*, 2013). Es ist bereits bekannt, dass CyclinE1 bei der Zellteilung eine essentielle Rolle spielt, indem es den Übergang von der späten G1 (Wachstumsphase G1) zur frühen S-Phase (Synthesephase) des Zellzyklus steuert (Satyanarayana & Kaldis, 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass CyclinE1 mit der Tumorigenese bei Ovarialkarzinomen in Verbindung gebracht werden kann (Nam & Kim, 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass es unwahrscheinlich ist, dass CyclinE1 an der beobachteten FOSL1-vermittelten Proliferations-Induktion beteiligt ist, da die

CyclinE1 Expressionslevel nach erfolgreicher Überexpression von FOSL1 in MelHo Zellen reduziert werden.

Auch der Entzündungsmediator Interleukin-6 (IL6) korreliert in verschiedenen Krebsarten mit fortschreitendem Stadium und einer schlechten Überlebensprognose (Erb *et al.*, 2013). *In vitro* Experimente mit Prostatakrebszellen zeigten, dass eine Behandlung mit IL6 zu einer erhöhten Aktivität des Androgenrezeptors führt. Dies hatte eine erhöhte Tumorzellproliferation und –differenzierung zur Folge (Erb *et al.*, 2013). *IL6* konnte in der vorliegenden Arbeit bei einem permanentem Knock-down von FOSL1 in SK-MEL28 Zellen und bei einer permanenten FOSL1-Überexpression in MelHo Zellen tatsächlich als potentiell Zielgen identifiziert werden. Es wäre daher denkbar, dass *IL6* als Zielgen von FOSL1 im humanen Melanom zu einer verstärkten Proliferation führt und so zur Tumorprogression beiträgt.

5. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass FOSL1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Weiterentwicklung von humanen Melanomen spielt, indem es vor allem die Proliferation, aber auch die Migration in diesen Krebszellen verstärkt. Die in dieser Arbeit identifizierten Zielgene sind funktional eher dem Progress der Migration und Progression zuzuordnen. In weitergehenden Studien können nun umfangreiche Expressionsanalysen der Melanomzellen nach FOSL1-Manipulation durchgeführt und funktional analysiert werden.

Literaturverzeichnis

- Abbas S, Bhoumik A, Dahl R, Vasile S, Krajewski S, Cosford ND, Ronai ZA. Preclinical studies of celastrol and acetyl isogambogic acid in melanoma. *Clin Cancer Res.* 2007. 13(22 Pt 1):6769-78.
- Alves CC, Carneiro F, Hoefler H, Becker KF. Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009. 14:3035-50.
- Anders F, Scharl M, Barnekow A, Anders A. *Xiphophorus* as an *in vivo* model for studies on normal and defective control of oncogenes. *Adv Cancer Res.* 1984. (42):191-275.
- Anderson J, Burns HD, Enriquez-Harris P, Wilkie AO, Heath JK. Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Hum Mol Genet.* 1998. (7):1475-83.
- Armstrong B. Epidemiology of cutaneous melanoma and current trends. In: Thompson JF, Morton DL, Kroon BBR, eds. *Textbook of Melanoma*. London: Martin Dunitz. 2004. 65–80.
- Armstrong, B. K. & Kricke. A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2001. 63, 8–18.
- Baan B, Pardali E, ten Dijke P, van Dam H. In Situ Proximity Ligation Detection of c-Jun/AP-1 Dimers Reveals Increased Levels of c-Jun/Fra1 Complexes in Aggressive Breast Cancer Cell Lines in Vitro and in Vivo. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2010 *Mol Cell Biochem.* 2013. 380(1-2):143-51.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001. 19(16):3635-48.
- Basbous J, Chalbos D, Hpskind R, Jariel-Encontre I & Piechaczyk. Ubiquitin-Independent Proteasomal Degradation of Fra-1 Is Antagonized by Erk1/2 Pathway-Mediated Phosphorylation of a Unique C-Terminal Destabilizer. *Molecular and Cellular Biology.* 2007. 6:3936-3950
- Becker JC, Kirkwood JM, Agarwala SS, Dummer R, Schrama D & Hauschild A. Molecularly Targeted Therapy for Melanoma. *Cancer.* 2006. 107 (10) 2317-2327.
- Beddingfield FC 3rd. The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. *Oncologist.* 2003. 8: 459–65.

- Belguise K, Kersual N, Galtier F, Chalbos D. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene*. 17;24(8):1434-44.
- Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, *et al.* A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*. 1986. 320:415-21.
- Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, *et al.* Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002. 94: 894–903.
- Boissan M, Feger F, Guillosson JJ, Arock M. c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases. *J. Leukoc. Biol*. 2000. 67: 135–148.
- Busca, R. & Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res*. 2000. 13, 60–69.
- Casalino L, Bakiri L, Talotta F, Weitzman JB, Fusco A, Yaniv M & Verde P. Fra-1 promotes growth and survival in RAS-transformed thyroid cells by controlling cyclin A transcription. *The EMBO Journal*. 2007. 26(7): 1878-1890
- Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*. 2011. 1;71(1):245-54.
- Chen H, Zhu G, Li Y, Padia RN, Dong Z, Pan ZK, Liu K, Huang S. Extracellular signal-regulated kinase signaling pathway regulates breast cancer cell migration by maintaining slug expression. *Cancer Res*. 2009. 15;69(24):9228-35.
- Chin L. The Genetics of Malignant Melanoma: Lessons from Mouse and Man. *Nature Reviews. Cancer*. 2003. (3) 559-570.
- Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, *et al.* Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility *in vivo*. *Genes*. 1997. 2822-34.
- Clark WH, Jr. Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*. 1984. (12):1147-65.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005 Nov. 353(20):2135-47.
- Dahl C. & Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS*. 2007. 115: 1161–1176.
- Damiens E, Baratte B, Marie D, Eisenbrand G, Meijer L. Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene*. 2001. 20(29):3786-97.

- D'Angelo M, Billings PC, Pacifici M, Leboy PS, Kirsch T. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene*. 2005. 17;24(8):1434-44.
- Deng SJ, Bickett DM, Mitchell JL, Lambert MH, Blackburn RK, Carter HL 3rd, Neugebauer J, Pahel G, Weiner MP, Moss ML. Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library. *J Biol Chem*. 2000. 6;275(40):31422-7.
- Dimitrijevic N, Winkler C, Wellbrock C, Gómez A, Duschl J, Altschmied J, et al. Activation of the Xmrk proto-oncogene of *Xiphophorus* by overexpression and mutational alterations. *Oncogene*. 1998. 16:1681-90.
- Douglas S, Micalizzi, Farabaugh M & Ford HL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010. DOI 10.1007/s10911-010-9178-9
- Erb HH, Langlechner RV, Moser PL, Handle F, Casneuf T, Verstraeten K, Schlick B, Schäfer G, Hall B, Sasser K, Culig Z, Santer FR. IL6 sensitizes prostate cancer to the antiproliferative effect of IFN α 2 through IRF9. *Endocr Relat Cancer*. 2013. 23;20(5):677-89.
- Feng M, Cai XJ, Zhang W, Liu XL, Chen L, Zhang Y, Zhang MX, Zhang M. Interleukin-6 enhances matrix metalloproteinase-14 expression via the RAF-mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase 1/2-activator protein-1 pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010. 37(2):162-6.
- Gerami P, Jewell SS, Pouryazdanparast P, Wayne JD, Haghghat Z, Busam KJ, Rademaker A, Morrison L. Copy number gains in 11q13 and 8q24 are highly linked to prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Mol Diagn*. 2011. (3):352-8.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C & Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007. 445.22: 851-857.
- Gordon M. The genetics of viviparous top-minnow *Platyopocilus*; the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics*. 1927. 12:253-83.
- Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW, Naber SP, Weinberg RA. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet*. 2005. 37(10):1047-54.
- Hess J, Angel Peter, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*. December 2004. 117. 5965-5973.
- High WA, Robinson WA. Genetic mutations involved in melanoma: a summary of our current understanding. *Adv Dermatol*. 2007 23:61-79.

- Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*. 1995. 80(2):199-211.
- Hirobe T, Hasegawa K, Furuya R, Fujiwara R, Sato K. Effects of fibroblast-derived factors on the proliferation and differentiation of human melanocytes in culture. 2013. *J Dermatol Sci*. 2013. 71(1):45-57.
- Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, *et al*. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997. 272:2927-35.
- Ivry GB, Ogle CA, Shim EK. Role of sun exposure in melanoma. *Dermatol Surg*. 2006. (32):481-92.
- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure AM, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frants R, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Martin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone JJ, Scolnick MH and Cannon-Albright LA. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Genet*. 1994. 22-32.
- Kajanne R, Miettinen P, Mehlem A, Leivonen SK, Birrer M, Foschi M, Kähäri VM, Leppä S. EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. *J Cell Physiol*. 2007. 212(2):489-97.
- Kappelmann M, Bosserhoff A, Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol*. 2013. S0171-9335(13)00062-9
- Katho M, Katho M. Identification and characterization of human SNAIL3 (SNAI3) gene in silico. *Int J Mol Med*. 2003. 11(3):383-8.
- Katoh M, Katoh M. Comparative genomics on SNAI1, SNAI2, and SNAI3 orthologs. *Oncol Rep*. 2005. 14(4):1083-6.
- Kim CJ, Reintgen DS, Yeatman TJ. The promise of microarray technology in melanoma care. *Cancer Control*. 2002. (9):49-53.
- Kosswig C. (Über Kreuzungen zwischen den Teleostiern *Xiphophorus helleri* und *Platypoecilus maculatus*. *Z Indukt Abstammungs-Vererbungs* 1928. (47):150-158.
- Kuphal S, Palm HG, Poser I, Bosserhoff AK. Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2005. 15(4):305-13.
- Kunz M, Driller KM, Hein M, Libnow S, Hohensee I, Ramer R, Hinz B, Berger A, Eberle J, Langer P. Synthesis of thia-analogous indirubin N-Glycosides and their influence on melanoma cell growth and apoptosis. *ChemMedChem*. 2010. 5(4):534-9.

- Laisney JA, Müller TD, Scharl M and Meierjohann S. Hyperactivation of constitutively dimerized oncogenic EGF receptors by autocrine loops. *Oncogene*. 2012. 32, 2403–2411
- Leikam C, Hufnagel A, Scharl M, Meierjohann S. Oncogene activation in melanocytes links reactive oxygen to multinucleated phenotype and senescence. *Oncogene*. 2008. 27;27(56):7070-82.
- Luan L, Zhao Y, Xu Z, Jiang G, Zhang X, Fan C, Liu D, Zhao H, Xu K, Wang M, Yu X, Wang E. Diversin increases the proliferation and invasion ability of non-small-cell lung cancer cells via JNK pathway. *Cancer Lett*. 2013. (13)00798-2.
- Maddodi N, Setaluri V. Role of UV in cutaneous melanoma. 2008. *Photochem Photobiol*. (2):528-36.
- Massoumi R, Kuphal S, Hellerbrand C, Haas B, Wild P, Spruss T, Pfeifer A, Fässler R, Bosserhoff AK. Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med*. 2009. 206(1):221-32.
- Mechta F, Lalleman D, Pfarr CM & Yniv M. Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene*. 1997. 14:837-847
- Meierjohann S, Mueller T, Scharl M & Buehner M. A Structural Model of the Extracellular Domain of the Oncogenic EGFR Variant Xmrk. *Zebrafish* 2006. 3 (3): 355-365
- Meierjohann S, Scharl M. From Mendelian to molecular genetics: the *Xiphophorus* melanoma model. *Trends Genet*. 2006. 22:654-61.
- Meierjohann S, Wende E, Kraiss A, Wellbrock C, Scharl M. The oncogenic epidermal growth factor receptor variant *Xiphophorus* melanoma receptor kinase induces motility in melanocytes by modulation of focal adhesions. *Cancer Res*. 2006. 66:3145-52.
- Meierjohann S, Hufnagel A, Wende E, Kleinschmidt MA, Wolf K, Friedl P, Gaubatz S, Scharl M. MMP13 mediates cell cycle progression in melanocytes and melanoma cells: in vitro studies of migration and proliferation. *Mol Cancer*. 2011. 9: 201.
- Miller, A. J. & Mihm, M. C. Melanoma. *N. Engl. J. Med*. 2006. 355, 51–65
- Mils V, Piette J, Barette C, Veyrune J, Tesnière A, Escot C, Guilhou JJ, Basset-Séguin N. The proto-oncogene c-fos increases the sensitivity of keratinocytes to apoptosis. *Oncogene*. 1997. 14(13):1555-61.
- Nam EJ, Kim YT. Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2008 Nov-Dec;18(6):1169-82.

- O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles S. A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor prevents squamous carcinoma cell proliferation by interfering with epidermal growth factor receptor autocrine loops. *Int J Cancer*. 2002. 100(5):527-33.
- Packer LM, East P, Reis-Filho JS, Marais R. Identification of direct transcriptional targets of (V600E)BRAF/MEK signalling in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009. 22(6):785-98.
- Rana P & Sridhar S. S. Efficacy and Tolerability of Lapatinib in the Management of Breast Cancer. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. 2012. 6 67–77
- Risse-Hackl G, Adamkiewicz J, Wimmel A, Schuermann M. Transition from SCLC to NSCLC phenotype is accompanied by an increased TRE-binding activity and recruitment of specific AP-1 proteins. *Oncogene*. 1998. 16(23):3057-68.
- Robertson SC, Tynan JA, Donoghue DJ. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet*. 2000. (16):265-71.
- Ronai Z, Yang YM, Fuchs SY, Adler V, Sardana M, Herlyn M. ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells. *Oncogene*. 1998. 29;16(4):523-31.
- Satyanarayana A und Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 2009. 28, 2925–2939;
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000. (103):211-25.
- Seiki M, Yana I. Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Sci*. 2003. 94(7):569-74.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993. 16;366(6456):704-7.
- Sharpless, E. & Chin, L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene*. 2003. 22, 3092–3098.
- Shaulian E. and Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. 2001. 20, 2390-2400
- Shaulian E. AP-1 -The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal*. 2010. (6):894-9.
- Shi J, Severson C, Yang J, Wedlich D, Klymkowsky MW. Snail2 controls mesodermal BMP/Wnt induction of neural crest. *Development*. 2011. 138(15):3135-45.
- Shin S, Dimitri CA, Yoon SO, Dowdle W, Blenis J. ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Mol Cell*. 2010. 38(1):114-27.

- Shirley SH, Greene VR, Duncan LM, Torres Cabala CA, Grimm EA, Kusewitt DF. Slug Expression during Melanoma Progression. *Am J Pathol.* 2012. 180(6):2479-89.
- Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, Hansson J, Wu H, King AJ, Van Belle P, Elder DE, Flaherty KT, Herlyn M, Nathanson KL. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther.* 2008. (9):2876-83.
- Songyang Z, Carraway KL 3rd, Eck MJ, Harrison SC, Feldman RA, Mohammadi M, *et al.* Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selectivesignalling. *Nature.* 1995. (373):536-9.
- Spangler B, Vardimon L, Bosserhoff AK & Kuphal S. Post-transcriptional regulation controlled by E-cadherin is important for c-Jun activity in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011. 24; 148–164
- Sternberg MJ, Gullick WJ. New receptor dimerization. *Nature.* 1989. (339):587.
- Teutschbein J, Samans B, Krause M, Eilers M, Scharl M, Meierjohann S. Gene expression analysis after receptor tyrosine kinase activation reveals new potential melanoma proteins. *BMC Cancer.* 2010. 10:386.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal Transition in Tumor Progression. *Nature.* 2002 Vol 2:442-454
- Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *www.thelancet.com.* 2005. 365: 687-701.
- Tormo D, Ferrer A, Gaffal E, Wenzel J, Basner-Tschakarjan E, Steitz J, Heukamp LC, Gütgemann I, Buettner R, Malumbres M, Barbacid M, Merlino Glenn, Tüting T. Rapid Growth of Invasive Metastatic Melanoma in Carcinogen-Treated Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-Transgenic Mice Carrying an Oncogenic CDK4 Mutation. *Am J Pathol.* 2006. 169:665–672
- Tucker M. A. & Goldstein A. M. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* (2003) 22, 3042–3052
- Udayakumar D, Mahato B, Gabree M, Tsao H. Genetic determinants of cutaneous melanoma predisposition. *Semin Cutan Med Surg.* 2010. (3):190-5.
- Ulasov I, Thaci B, Sarvaiya P, Yi R, Guo D, Auffinger B, Pytel P, Zhang L, Kim CK, Borovjagin A, Dey M, Han Y, Baryshnikov AY, Lesniak MS. Inhibition of MMP14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas. *Cancer Med.* 2013. 2 (4):457-67.
- Vannini I, Bonafe M, Tesei A, Rosetti M, Fabbri F, Storci G, Ulivi P, Briigliadori G, Amadori D, Zoli W. Short interfering RNA directed against the SLUG gene increases cell

death induction in human melanoma cell lines exposed to cisplatin and fotemustine. *Cell Oncol.* 2007. 29 (4):279-87.

Vial E, Sahai E, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell.* 2003. 4(1):67-79.

Vogelstein B. & Kinzler K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine.* 2004. 10 (8) 789-799.

Wagner EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis.* 2002. 61 Suppl 2:ii40-2.

Wakamatsu Y. Establishment of a cell line from the platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res.* 1981. (41):679-80.

Webster MK, D'Avis PY, Robertson SC, Donoghue DJ. Profound ligand independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop mutation responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia type II. *Mol Cell Biol.* 1996. (16):4081-7.

Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.* 1996. (15):520-7.

Wellbrock C, Fischer P, Scharl M: Receptor tyrosine kinase Xmrk mediates proliferation in *Xiphophorus* melanoma cells. *Int J Cancer.* 1998. 76(3):437-442.

Wellbrock C, Scharl M: Multiple binding sites in the growth factor receptor Xmrk mediate binding to p59fyn, GRB2 and Shc. *Eur J Biochem.* 1999. 260(1):275-283.

Wellbrock C, Weisser C, Geissinger E, Troppmair J, Scharl M: Activation of p59(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1- regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* 2002. 277(8):6443-6454.

Wildlund, H. R. & Fisher, D. E. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene.* 2003. 22, 3035–3041.

Young MR & Colburn NH. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. *Gene.* 2006. 1–11

Young MR, Nair R, Bucheimer N, Tulsian P, Brown N, Chapp C, Hsu TC & Colburn NH. Transactivation of Fra-1 and Consequent Activation of AP-1 Occur Extracellular Signal-Regulated Kinase Dependently. *Molecular and Cellular Biology.* 2002: 587–598

Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus. *Cell.* 1998. 92, 725–734.

Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward M and Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. 1996. Nat. Genet., 12, 97–99.

Poster

Haug D, Haydn J, Spangler B, Bosserhoff A, Samans B, Scharl M and Meierjohann S. Impact of the AP-1 complex component FOSL1 on melanoma development. 10. März 2010

Anhang A – Zusätzliche Ergebnisse

In bisherigen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Manfred Kunz der Universitätsklinik Leipzig konnte ermittelt werden, dass glykosylierte Indolverbindungen gegenüber verschiedenen Tumorzellen eine deutliche pharmakologische Aktivität zeigen (Kunz *et al.*, 2010). Prominente Derivate mit antitumorogener Aktivität sind die natürlichen Substanzen Staurosporine, K-252d, Rebeccamycin und Tjipanazole. Indigo, Indirubin und Isoindigo haben ein bis-Indolgerüst und sind in einigen natürlichen Produkten enthalten. Indirubin ist ein rotes Indigoisomer und wird in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung von Myeloischer Leukämie eingesetzt (Damiens *et al.*, 2001; Kunz *et al.*, 2010). Diese Substanz und ihre Derivate sind potente Inhibitoren von unterschiedlichen Kinasen (z.B. CDKs), die an intrazellulären Signalwegen beteiligt sind (Kunz *et al.*, 2010). Kunz *et al.* zeigten, dass Thia-analoga Verbindungen von Indirubin-N-Glycosiden in Melanomzellen einen Einfluss auf das Zellwachstum, die Apoptose und intrazelluläre Signalwege haben (Kunz *et al.*; 2010).

Ob Indirubine auch in Mausmelanozyten diese Effekte auf das Proliferationsverhalten zeigen, ist bisher noch nicht untersucht worden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Kunz an der Universitätsklinik Leipzig über den Deutschen Melanomverbund sollten daher die Indirubine MB78 und KD84 auf ihre Wirksamkeit in melan a Hm^{me} Zellen in Proliferationsassays getestet werden.

Abb. 21 und 22 kann entnommen werden, dass KD84 in melan a Hm^{me} Zellen die Proliferation sehr effektiv und etwas stärker als MB78 hemmt. Jedoch zeigt auch MB78 einen starken inhibitorischen Effekt, der sich auf das Proliferationsverhalten dieser Mausmelanozyten auswirkt.

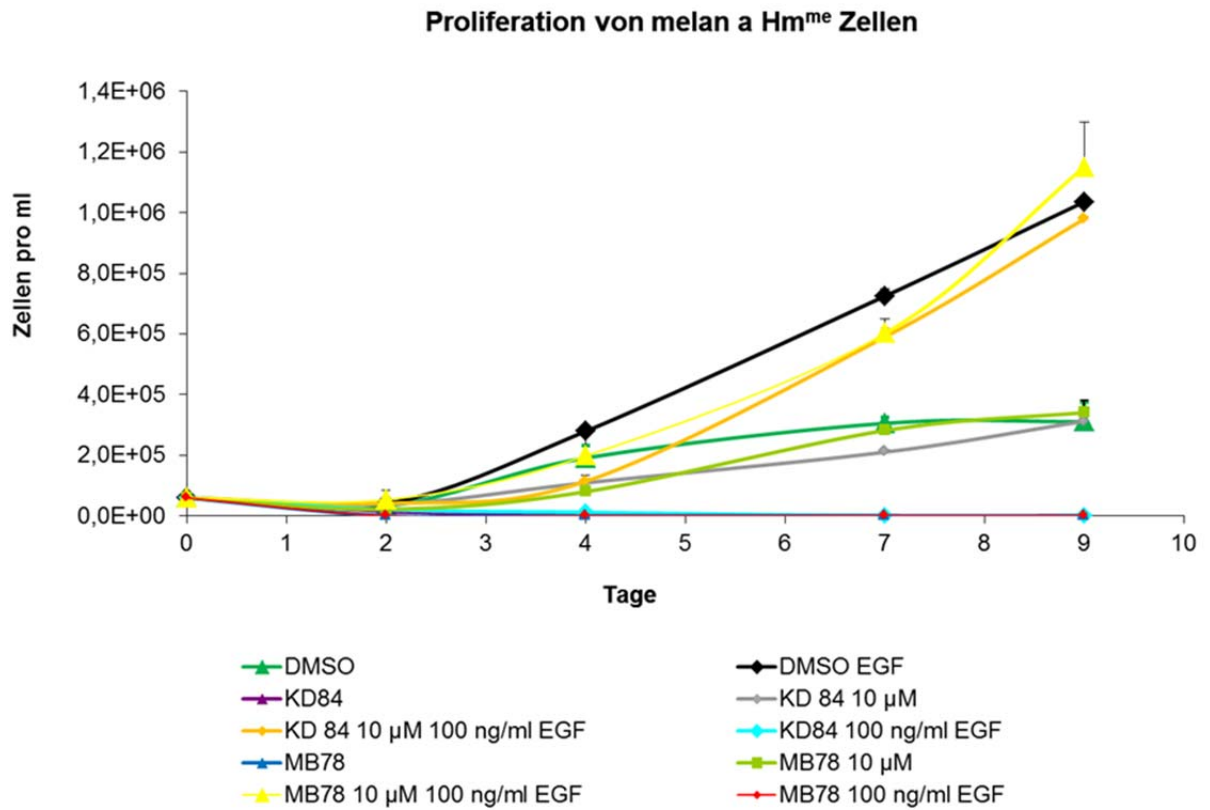


Abb. 21: Einfluss von Indirubinen auf das Proliferationsverhalten von melan a Hm^{me} Zellen (HERmrk-transgenen Mausmelanozyten) mit und ohne Zugabe von 100 ng/ml EGF. Das Experiment wurde einmal im Triplett durchgeführt.

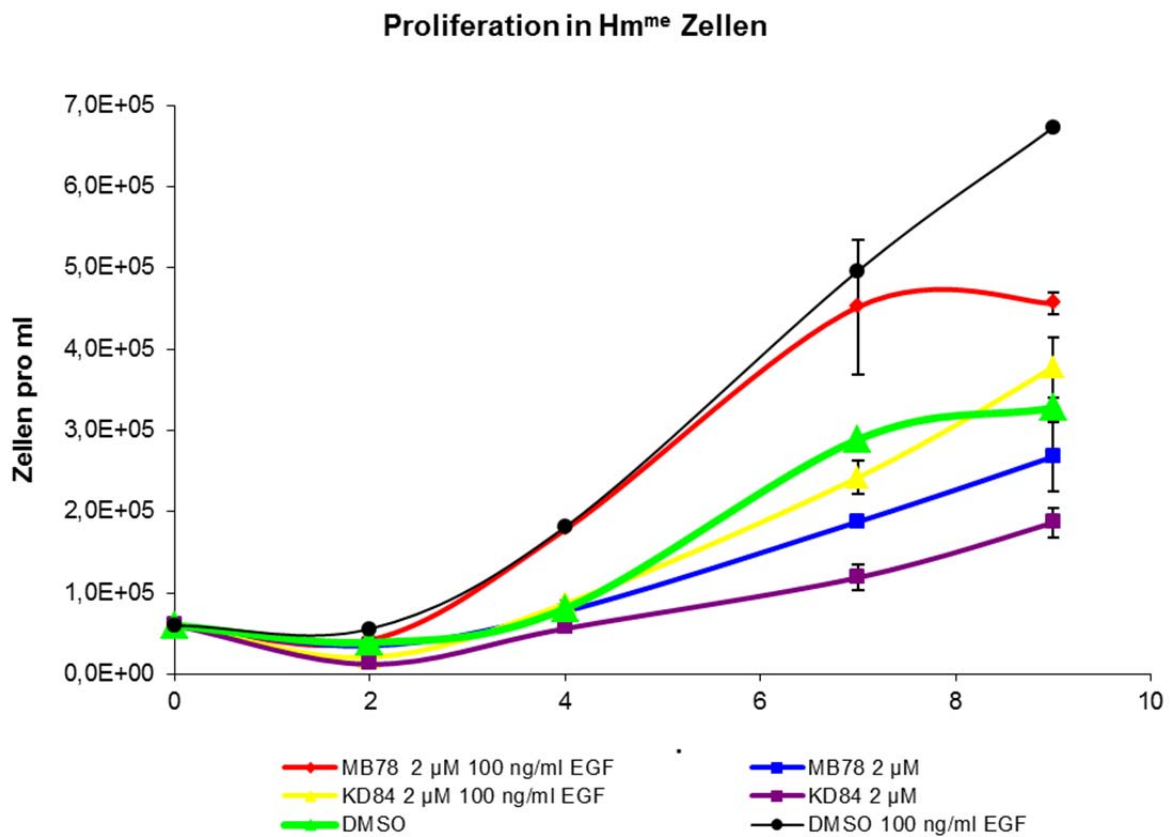


Abb. 22: Einfluss von Indirubinen auf das Proliferationsverhalten von melan a Hm^{me} Zellen (HERmrk-transgenen Mausmelanozyten) mit und ohne Zugabe von EGF. Die Daten stammen aus einem Experiment mit Triplikaten.

Zusammenfassend deuten die Experimente mit den Indirubinen an, dass sowohl das Indirubin KD84 als auch MB78 nicht nur in Melanomzellen, sondern auch in den Mausmelanozyten melan a Hm^{me} einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniela Haug
Geburtsdatum: 11.07.1981
Geburtsort: Bad Homburg v. d. Höhe
Nationalität: deutsch
Familienstand: nicht verheiratet

Ausbildung & wissenschaftlicher Werdegang

seit 8/2012 Clinical Research Managerin für die Firma Novartis, Nürnberg, Abteilung Onkologie – Hämatologie
01/2009-06/2012 Promotionsstudium, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
„Untersuchung von FOSL1 im humanen Melanom“
04/2008 – 11/2008 Diplomarbeit bei der Firma Hoffmann-la Roche, Basel, „Untersuchung der Funktion von Cathepsin S in humanen Antigen-präsentierenden Zellen“
10/2006 – 04/2008 Hauptstudium Biologie, Universität Ulm
10/2003 – 09/2006 Grundstudium Biologie; Universität Bremen
10/2001 – 09/2003 Studium Lebensmitteltechnologie, FH Lippe
06/2001 Abitur am Campe Gymnasium Holzminden

Poster

Haug D, Haydn J, Spangler B, Boßerhoff A, Samans B, Scharl M, Meierjohann S. Impact of the AP-1 complex component FOSL1 on melanoma development. Regensburg. 10.-13.März 2010.

Haug D, Haydn J, Spangler B, Boßerhoff A, Scharl M, Meierjohann S. Impact of the AP-1 complex component FOSL1 on melanoma development. Autumn School 2010. Würzburg. 6.-7.Oktober 2010.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Svenja Meierjohann für die sehr gute Betreuung, Ihre große Hilfsbereitschaft und spannenden Diskussionen sowie für die Bereitstellung des interessanten und anspruchsvollen Themas.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Dr. Manfred Scharl für die Möglichkeit danken, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen durfte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, speziell bei Anita Hufnagel für Ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und Katja Maurus für Ihre stets ausgesprochen hilfsbereite und ganz besonders freundschaftliche Art.

Der AG Bosserhoff, speziell Frau Prof. Bosserhoff und Frau PD Dr. Kuphal, in Regensburg gilt bezüglich der guten Kooperation ein besonderer Dank.

Außerdem gilt ein spezieller Dank Herrn PD Shuang Huang vom Department of Biochemistry des Medical College of Georgia, der die shRNA für FOSL1 zur Verfügung gestellt hat.

Meiner Familie, speziell meinen Eltern und meinem Bruder, möchte ich für die ständige Unterstützung und Geduld in jeder Hinsicht und ihr besonderes Verständnis während meiner gesamten Doktorarbeit von ganzem Herzen danken.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig verfasst, und in der Bearbeitung und Abfassung keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe. Die vorliegende Doktorarbeit wurde noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt.“

Würzburg, den

Daniela Haug