

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DES
HEPATOMA-DERIVED GROWTH
FACTORS AUF DIE ENTSTEHUNG
VERSCHIEDENER HAUTTUMORE**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Angela Sedlmaier

aus

Troisdorf

Bonn 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn.

Referent: Prof. Dr. V. Gieselmann

Korreferent: Prof. Dr. N. Koch

Tag der Promotion: 15. April 2011

Erscheinungsjahr: 2011

Die Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Krebs	1
1.2 Wachstumsfaktoren	3
1.3 Hepatoma-derived growth factor (HDGF)	6
1.4 HDGF und Krebs	9
1.5 Hautkrebs	11
1.5.1 Allgemein	11
1.5.2 Aufbau der Haut	12
1.5.3 Funktionen der Haut	15
1.5.4 Melanome	16
1.5.5 Plattenepithelkarzinome (PEK)	19
1.5.6 Mausmodelle für Hauttumore	21
1.6 Ziel der Arbeit	22
2. Material	24
2.1 Verbrauchsmaterialien	24
2.2 Chemikalien	25
2.3 Allgemeine Lösungen und Puffer	26
2.4 Chemisch kompetente Zellen	32
2.5 Zellkulturmedium	32
2.6 Primäre Zellen	33
2.7 Versuchstiere	33
2.7.1 Tyrosinase-HDGF transgene Mäuse (HDGF ^{Tyr})	33
2.7.2 HDGF-Knockout-Mäuse (HDGF ^{-/-})	33
2.7.3 Ink4a-Knockout-Mäuse (Ink4a ^{-/-})	33
2.7.4 Wildtyp-Mäuse	34
2.8 Primer	34
2.9 Vektoren und Plasmide	35
2.10 Antikörper	36
2.11 Größenstandards	36
2.12 Geräte	38
3. Methoden	41
3.1 Gebräuchliche DNA-Techniken	41
3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA	41

3.1.2 Präparation von genomischer DNA aus Mausgewebe	41
3.1.3 Präparation von RNA aus Mausgewebe	42
3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
3.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion	44
3.1.6 Saure Ethanolfällung	45
3.2 Arbeiten zur Herstellung rekombinanter Plasmide	45
3.2.1 Spaltung von Plasmid-DNA	45
3.2.2 Auftrennung von DNA in Agarosegelen und Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren	46
3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
3.2.4 Reverse Transkription	47
3.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	48
3.2.5 Ligation von DNA-Molekülen	48
3.3 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA	49
3.4 PCR-Kolonie-Screening	50
3.5 Zyklische Sequenzierung	50
3.6 Zellkultur	51
3.6.1 Kultivierung von Zellkulturzellen	51
3.6.2 Teilen von Zellkulturzellen	51
3.6.3 Zählen von Zellkulturzellen	51
3.6.4 Isolierung von Melanozyten	52
3.7 Herstellung von Gewebelysaten	53
3.8 Proteinbestimmung	53
3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Westernblots	54
3.9.1 SDS-Page	54
3.9.2 Westernblot nach dem Semi Dry Verfahren	55
3.10 Genotypenbestimmung	56
3.10.1 PCR zum Nachweis der Integration des Tyrosinase-HDGFGen Konstruktes in das Mausgenom	56
3.10.2 Genotypenbestimmung von HDGF ^{-/-} -Mäusen	56
3.10.3 PCR-Genotypenbestimmung von Ink4a ^{-/-} -Mäusen	57
3.10.4 Southernblot-Analyse	57
3.11 Anfertigung von Gewebeschnitten	60
3.11.1 Kryoschnitte	60
3.11.2 Paraffinschnitte	60
3.12 Histochemische Färbungen und Nachweise	61
3.12.1 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung	61
3.12.2 DOPA-Färbung	62
3.12.3 Immunhistochemie	62
3.12.4 Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten	63

3.12.5 Bleichen von pigmentiertem Gewebe.....	64
3.12.6 In Situ Hybridisierung (ISH).....	65
3.13 Tierexperimentelle Arbeiten.....	67
3.13.1 Allgemeine Haltung.....	67
3.13.2 Bestrahlung der Mäuse mit UVB-Licht.....	68
3.13.3 Behandlung der Mäuse mit DMBA.....	68
3.14 Statistische Analysen.....	69
3.14.1 Chi-Quadrat-Vierfeldertest.....	69
3.15.2 Exakter Test nach Fisher.....	69
3.15.3 T-Test.....	69
4. Ergebnisse.....	70
4.1 Allgemein.....	70
4.2 Melanom-Mausmodell.....	70
4.2.1 Charakterisierung der Tyrosinase-HDGF transgenen Mäuse.....	70
4.2.1.1 Genotypenbestimmung.....	70
4.2.1.2 Expressionsanalyse des Tyr-HDGFGen Konstruktes in Mäusen.....	73
4.2.1.3 Analyse der HDGF ^{Tyr} /HDGF ^{-/-} -Mäuse.....	81
4.2.1.4 In Situ Hybridisierung (ISH).....	87
4.2.1.5 Histologie der HDGF ^{Tyr} -, Wildtyp- und HDGF ^{-/-} -Mäuse.....	91
4.2.1.6 Isolierung kutaner Melanozyten aus HDGF ^{Tyr} -, Wildtyp- und HDGF ^{-/-} -Mäusen.....	93
4.2.2 Rückkreuzung und Analyse der HDGF ^{Tyr} /Ink4a ^{-/-} -, Ink4a ^{-/-} - und HDGF ^{-/-} /Ink4a ^{-/-} - Mäuse.....	94
4.2.2.1 Allgemein.....	94
4.2.2.2 Histologie der HDGF ^{Tyr} /Ink4a ^{-/-} -, Ink4a ^{-/-} - und HDGF ^{-/-} /Ink4a ^{-/-} -Mäuse.....	95
4.2.3 UVB-Bestrahlung.....	97
4.2.3.1 Makroskopische Analyse der UVB-bestrahlten Mäuse.....	97
4.2.3.2 Statistische Analyse der UVB-induzierten Haut-veränderungen.....	98
4.2.3.3 Histologische Analyse der pigmentierten Hautveränderungen.....	100
4.3 Plattenepithelkarzinom-Modell (PEK-Modell).....	103
4.3.1 HDGF Expression in humanen PEK.....	103
4.3.2 Plattenepithelkarzinom-Mausmodell.....	106
4.3.2.1 Induktion von Plattenepithelkarzinomen (PEK) in Mäuse.....	106
4.3.2.2 Makroskopische Analyse der DMBA induzierten Hautveränderungen.....	106
4.3.2.3 HDGF-Expression in murinen PEK.....	107
4.3.2.4 Histologie und Pathologie der PEK.....	109
4.3.2.5 Statistik der Blut- und Lymphgefäße der PEK.....	111
4.3.2.6 Weitere Befunde der DMBA behandelten Tiere.....	112
5. Diskussion.....	114
Teil 1 – Melanom-Mausmodell.....	115
Teil 2 – Plattenepithelkarzinom-Modell (PEK-Modell).....	129

Inhaltsverzeichnis	IV
<hr/>	
6. Zusammenfassung	135
7. Literaturverzeichnis	137
8. Anhang	146
8.1 Nachweis der HDGF-Expression in der 889-transgenen Mauslinie	146
8.1.1 mRNA-Expressionsanalyse.....	146
8.1.2 Westernblotanalyse der HDGF ^{Tyr} /HDGF ^{-/-} -Mäuse	147
8.1.3 In Situ Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung der Rückenhaut von HDGF ^{Tyr} /HDGF ^{-/-} -, HDGF ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen.....	148
8.1.4 Immunfluoreszenzfärbung der Augenpräparate von HDGF ^{Tyr} /HDGF ^{-/-} -, HDGF ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen	149
8.1.5 Immunfluoreszenzfärbung der Gehirnpräparate von HDGF ^{Tyr} /HDGF ^{-/-} -, HDGF ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen	150
8.2 Sequenzanalysen	151
8.2.1 Vergleich der sequenzierten DNA-Fragmente aus Abbildung 4.6	151
8.2.2 Aminosäuresequenzvergleich zwischen HDGF und dem „Großen Fragment“.....	152
8.2.3 Blast-Analyse des „Großen Fragmentes“	153
8.2.4 DNA-Vergleich.....	154
8.3 Vektorkarten.....	155
8.4 Abkürzungsverzeichnis	156
Erklärung	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Wirkungsmechanismen von Wachstumsfaktoren..	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mitglieder der HDGF-Proteinfamilie.....	6
Abbildung 3: Querschnitt durch die Haut.	13
Abbildung 4: Erneuerung der Epidermis.	14
Abbildung 5: Bildung von Melanin aus Tyrosin.	16
Abbildung 6: Struktur des INK4a/ARF-Genlokus.	18
Abbildung 7: Signalwege der Tumorsuppressoren p16 ^{INK4a} und p14 ^{ARF}	18
Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Kapillarblots.....	58
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Tyr-HDGFGen Konstruktes.....	71
Abbildung 10: Exemplarische Darstellung des Ergebnisses einer Genotypisierungs-PCR.	72
Abbildung 11: Ergebnis der Southernblot-Analyse.	73
Abbildung 12: Westernblot von Gehirn-, Auge-, Rückenhaut-, Schwanzhaut-, Milz- und Leberlysaten einer Wildtyp- und HDGF ^{Tyr} -Maus.	74
Abbildung 13: Lokalisation der Primer zur mRNA-Analyse im Tyr-HDGFGen Konstrukt.....	75
Abbildung 14: mRNA-Analyse von Gehirn-, Auge-, Rückenhaut-, Schwanzhaut-, Milz- und Leberproben einer Wildtyp- und HDGF ^{Tyr} - Maus.....	76
Abbildung 15: HDGF-Immunfluoreszenzfärbung der Rückenhaut.	78
Abbildung 16: HDGF-Immunfluoreszenzfärbung des Auges.	79
Abbildung 17: HDGF-Immunfluoreszenzfärbung des Gehirnes.	80
Abbildung 18: Westernblotanalyse von Organlysaten von HDGF ^{Tyr} /HDGF ^{-/-} und HDGF ^{-/-} - Mäusen.	82
Abbildung 19: HDGF-Immunfluoreszenzfärbung der Rückenhaut.	83
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von Augenpräparaten.....	84
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von Cerebellum und Cortex.	86
Abbildung 22: <i>In Situ</i> Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung der Folgeschnitte.	90
Abbildung 23: Histologische Analyse der HDGF ^{Tyr} -, Wildtyp- und HDGF ^{-/-} -Mäuse.	91
Abbildung 24: DOPA-Färbung von Rückenhaut und Schwanzhaut von HDGF ^{Tyr} -, Wildtyp- und HDGF ^{-/-} -Mäusen.	92
Abbildung 25: Darstellung isolierter Melanozyten.....	93
Abbildung 26: HE-Färbung der Augenpräparate	96
Abbildung 27: Darstellung der durch UVB-Bestrahlung induzierten Hautveränderungen.	98
Abbildung 28: Statistische Analyse der Hautveränderungen der UVB behandelten Mäuse.	99
Abbildung 29: Darstellung der Veränderung der Rückenhaut nach neonataler UVB-Bestrahlung	101
Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung der Hautveränderungen	102
Abbildung 31: HDGF Immunhistochemie eines humanen Plattenepithelkarzinoms.	104
Abbildung 32: HE-Färbung und Immunhistochemie eines humanen Plattenepithelkarzinoms.	105
Abbildung 33: Plattenepithelkarzinome von Wildtyp- und HDGF ^{-/-} -Mäusen.	107

Abbildung 34: Immunhistochemische HDGF-Färbung von muriner Wildtyp-Haut im Vergleich zum PEK.....	108
Abbildung 35: Westernblotanalyse von PEK und Haut von Wildtyp- und HDGF ^{-/-} -Mäusen.	109
Abbildung 36: Mikroskopische Analyse der Plattenepithelkarzinome.....	110
Abbildung 37: Statistische Analyse der Blut- und Lymphgefäße der PEK von Wildtyp- und HDGF ^{-/-} -Mäusen.	111
Abbildung 38: Exakter Fisher-Test zur Bestimmung der Signifikanz und Westernblotanalyse der DMBA-induzierten Lebertumore.....	113
Abbildung 39: mRNA-Analyse von Gehirn-, Auge-, Rückenhaut-, Schwanzhaut-, Milz- und Leberproben einer HDGF ^{Tyr} - und Wildtyp- Maus.....	146
Abbildung 40: Westernblotanalyse von Organlysaten von HDGF ^{Tyr} /HDGF ^{-/-} - und HDGF ^{-/-} - Mäusen.	147
Abbildung 41: <i>In Situ</i> Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung der Folgeschnitte.	148
Abbildung 42: Immunfluoreszenzfärbungen von Augenpräparaten.....	149
Abbildung 43: Immunfluoreszenzfärbung von Cerebellum und Cortex.	150
Abbildung 44: Darstellung des HDGF-Sequenzenvergleiches.	152
Abbildung 45: Dargestellung des Aminosäuresequenzvergleiches.....	152
Abbildung 46: Darstellung des Ergebnisses der Blast-Suche.	153
Abbildung 47: Nukleotidvergleich der genomischen HDGF-IntronIII Sequenz.....	154

1. Einleitung

1.1 Krebs

Der menschliche Körper besteht aus Milliarden von Zellen, die durch Zellteilung aus einer befruchteten Eizelle hervorgehen. Durch die Koordination von Zellteilung, Differenzierung und programmiertem Zelltod (Apoptose) entstehen komplexe Strukturen, deren Wachstum und Erhaltung einem geregelten Ablauf folgen und der Funktionsfähigkeit des Organismus dienen. Die Fähigkeit von Zellen sich zu teilen bleibt häufig über das gesamte Leben des adulten Organismus bestehen und sorgt so für die Erhaltung des Gewebes, indem z.B. Wunden verschlossen oder gealterte Zellen ersetzt werden. Diese Prozesse sind möglich, weil fast jede Zelle eines Organismus das komplette Genom enthält. Auf der anderen Seite birgt diese Eigenschaft die Gefahr, dass die DNA individueller Zellen mit der Zeit durch verschiedene Mechanismen verändert werden kann. Solche zufällig auftretenden Mutationen können zusammen mit epigenetischen Veränderungen dazu führen, dass Zellen sich unaufhörlich teilen und resistent gegen die Einleitung der Apoptose werden. Die Förderung des Zellzyklus und die Resistenz gegen Apoptose sind kritische Eigenschaften von Krebszellen, welche die Entstehung von Tumoren fördern. Die Bildung und das Wachstum von Tumoren unterliegen nicht mehr den Regeln der Gewebeorganisation und Gewbeerhaltung, sondern dem Ziel der unbegrenzten Teilung (Weinberg, 2007). Im Jahr 2000 wurden von Douglas Hanahan und Robert Weinberg sechs Charakteristika formuliert (Hanahan and Weinberg, 2000), welche die meisten Krebsarten aufweisen:

1. Die Fähigkeit unbegrenzt zu wachsen, d.h. unbegrenzte Zellvermehrung
2. Ignorieren von Signalen, die normalerweise zu einem Wachstumsstopp führen würden
3. Ignorieren von Signalen, die zur Apoptose führen
4. Produktion von Faktoren, die den Tumor selbst im Wachstum unterstützen
5. Rekrutierung anderer Zelltypen, um zur besseren Versorgung des Tumors Gefäße neu zu bilden (Angiogenese)
6. Invasives Wachstum in das umliegende Gewebe

Nach Angaben der Deutschen Krebshilfe e.V. erkranken in Deutschland jährlich ca. 450 000 Menschen an Krebs und ca. 216 000 jedes Jahr sterben aufgrund dieser Erkrankung, womit Krebs nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache (~25%) ist. Die meisten Krebsarten bilden primäre, solide Tumore, während die Zellen bei Blutkrebsarten im kardiovaskulären und lymphatischen System zirkulieren.

Tumore werden anhand ihres aggressiven Wachstums in zwei Klassen eingeteilt:

1. Benigne Tumore (gutartig) – verdrängen umliegendes Gewebe, infiltrieren es aber nicht und bilden keine Metastasen. Benigne Tumore können hyperplastisch (erhöhte Zellzahl) oder dysplastisch (erhöhte Zellzahl und zytologische Veränderungen) sein.
2. Maligne Tumore (bösartig) – verdrängen, infiltrieren und zerstören umliegendes Gewebe und metastasieren über Blut- und/oder Lymphgefäße.

Die Entstehung von Tumoren ist ein komplexer Prozess, der sich gewöhnlich über Jahrzehnte hinzieht und in mehreren Schritten abläuft. Untersuchungen haben gezeigt, dass für die Entstehung von Krebs multiple Mutationen erforderlich sind und dass in verschiedenen Tumorarten unterschiedliche Gene mit einer gewissen Häufigkeit mutiert sind (DePinho, 2000; Weinberg, 2007). Gemeinsam haben diese Gene, dass sie den Zellzyklus bzw. die Proliferation oder die Apoptose der Zellen kontrollieren. Gene, die Proteine kodieren, die die Zellteilung unterdrücken und die Apoptose fördern, werden als Tumorsuppressoren bezeichnet. Der Verlust der Aktivität von

Tumorsuppressoren durch inaktivierende Mutationen oder Deletionen fördert die Entstehung von Krebs. Ein Beispiel für einen Tumorsuppressor ist das Protein p53, das in normalen Zellen DNA-Schäden detektiert und die Apoptose einleitet (Green and Kroemer, 2009). Proteine, die das Überleben von Zellen und die Zellteilung fördern, werden als Protoonkogene bezeichnet. Aktivierende Mutationen in solchen Genen oder deren regulatorischen Elementen konvertieren diese in sogenannte Onkogene. Beispiele für Protoonkogene sind Transkriptionsfaktoren (z.B. Myc, Jun, Fos und E2F), positive Regulatoren des Zellzyklus (z.B. Cycline oder Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk)), anti-apoptotische Faktoren (z.B. Bcl-2 und Mdm2) oder Wachstumsfaktoren (z.B. Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF)) und deren Rezeptoren. In den letzten 30 Jahren konnten einige Wachstumsfaktoren identifiziert werden, die in Tumoren überexprimiert werden und das Wachstum von Tumoren fördern (Igney and Krammer, 2002; Weinberg, 2007). Die meisten dieser Wachstumsfaktoren waren bis dahin als Mitogene bekannt, doch konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Proliferation, sondern auch die Migration und/oder Invasion von Tumorzellen durch Wachstumsfaktoren beeinflusst werden können.

1.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren dienen in mehrzelligen Organismen der interzellulären Kommunikation, die für komplexe Prozesse wie Gewebedifferenzierung und Embryogenese grundlegend ist. Interzelluläre Kommunikation wird hauptsächlich von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren vermittelt. Die spezifische Bindung dieser Mediatoren an die entsprechenden Rezeptoren aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden, die wiederum zur Aktivierung oder Repression von Genen und damit zu einer veränderten Genexpression führen (Aaronson, 1991 (A); Aaronson, 1991 (B)). Wachstumsfaktoren können die Proliferation von Zellen positiv oder negativ beeinflussen, wobei die Wirkung dieser Faktoren oft von dem Vorhandensein weiterer Wachstumsfaktoren und dem Zelltyp abhängt (Aaronson, 1991 (A); Aaronson, 1991 (B)).

Wachstumsfaktoren werden als Mitogene bezeichnet, wenn sie den Eintritt von Zellen in die Mitose bewirken.

Die Hauptfunktion von Wachstumsfaktoren ist es, eine Verknüpfung zwischen Zelle und Umgebung herzustellen und damit der Zelle die Möglichkeit zu geben, angemessen auf Veränderungen der Umgebung oder interne Veränderungen zu reagieren. Für die Wirkungsweise der Wachstumsfaktoren wurden sechs unterschiedliche Mechanismen beschrieben, die aufgrund der Wegstrecke zwischen Produktionsort und Zielzellen unterschieden werden (siehe Abbildung 1).

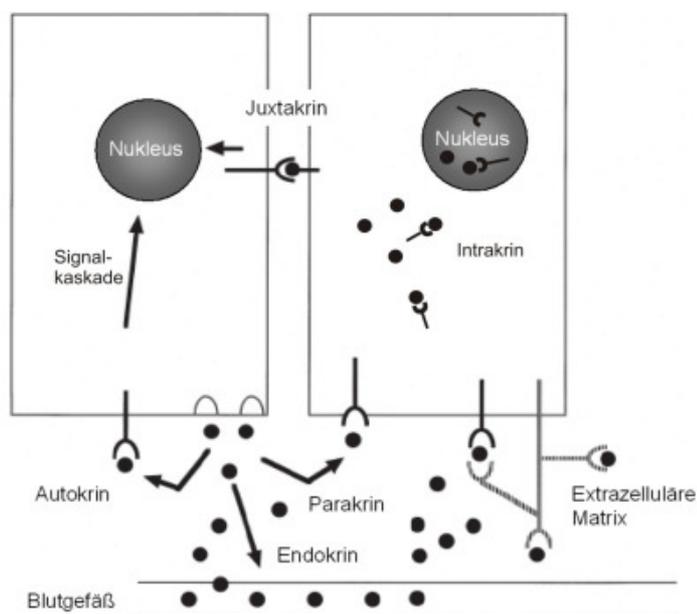


Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Wirkungsmechanismen von Wachstumsfaktoren.

Darstellung modifiziert nach Sporn & Todaro (Sporn and Todaro, 1980).

Während endokrine Wachstumsfaktoren über die Blutbahn zu weiter entfernt liegenden Zielzellen gelangen, üben parakrine Faktoren ihre Wirkung auf Zellen aus, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Wachstumsfaktor-sezernierenden Zellen liegen (Sporn and Todaro, 1980). Werden Wachstumsfaktoren als membranständige Proteine gebildet, die die Zielzelle durch Bindung an die Rezeptoren der Nachbarzellen beeinflussen, wird der Wirkungsmechanismus als juxtakrin bezeichnet (Bosenberg and Massague, 1993). Für manche Wachstumsfaktoren konnte gezeigt werden, dass diese erst in der extrazellulären Matrix (ECM) verankert werden, bevor sie mit Rezeptoren auf der Oberfläche von anliegenden Zellen interagieren können (Klagsbrun and

Baird, 1991). Der juxtakrine Weg und der Wirkungsmechanismus über die ECM stellen eine Variante des parakrinen Mechanismus dar, da ebenfalls nur benachbarte Zellen im Wirkungsbereich der Wachstumsfaktoren liegen. Bei einer autokrinen Wirkungsweise reagieren Zellen auf Faktoren, die sie selbst gebildet und sezerniert haben. Die Bindung des Wachstumsfaktors löst dann eine Signalkaskade aus (Sporn and Todaro, 1980). Als eine Variante des autokrinen wird der intrakrine Mechanismus angesehen. Manche von Zellen gebildete Wachstumsfaktoren werden nicht sekretiert, sondern üben ihre Wirkung durch Bindung an intrazelluläre Rezeptoren, die sich im Nukleus oder im Zytoplasma befinden, aus (Logan, 1990).

Für die Entstehung und Progression von Tumoren spielen Wachstumsfaktoren oft eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Tumoren beträchtliche Mengen an Wachstumsfaktoren produzieren und sezernieren. Gleichzeitig exprimieren die Tumorzellen den entsprechenden Wachstumsfaktor-Rezeptor, so dass diese auf den eigens gebildeten Wachstumsfaktor reagieren können. Ein Beispiel hierfür ist das Kaposi-Sarkom (vaskulärer Tumor). Bis jetzt ist bekannt, dass diese Art von Tumoren die Wachstumsfaktoren Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Angiopoietin 2 (Ang2), Chemokin CCL8/14, Chemokin CXCL11 und Endothelin, sowie deren Rezeptoren exprimieren (Sharma-Walia et al., 2010). Ein weiteres Beispiel stellt die Expression von Kit, dem Rezeptor des Stem Cell Factor (SCF), in kleinzelligen Lungentumoren dar. Patienten, deren Tumor Kit exprimierte starben im Durchschnitt 71 Tage nach der Diagnose, während Patienten, in deren Tumore keine Kit-Expression nachgewiesen werden konnte, im Durchschnitt noch 288 Tage lebten (Micke et al., 2003). Diese Studien weisen auf eine wichtige Funktion von Wachstumsfaktoren bei der Tumorentstehung und Progression hin, da es für den Tumor von immenser Bedeutung zu sein scheint, durch die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren positive Rückkopplungsmechanismen zu schaffen und so die eigene Proliferation zu kontrollieren (Weinberg, 2007).

1.3 Hepatoma-derived growth factor (HDGF)

Der Hepatoma-derived growth factor (HDGF) wurde als erstes Mitglied einer neuen Familie von Proteinen aus dem Kulturmedium der humanen Hepatom-Zelllinie HuH-7 und metanephrotischen Mesenchymalzellen der Ratte isoliert (Nakamura et al., 1994; Oliver and Al-Awqati, 1998). HuH-7 Zellen können sich in Kultur ohne Zugabe von Serum vermehren (Nakamura et al., 1994), was darauf hindeutet, dass diese Zellen Faktoren exprimieren, die über autokrine, intrakrine oder parakrine Mechanismen mitogene Aktivität ausüben. Weiter konnte gezeigt werden, dass exogenes HDGF die DNA-Replikation von Fibroblasten, Leberzellen, Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und Endothelzellen stimuliert (Nakamura et al., 1994; Oliver and Al-Awqati, 1998; Everett et al., 2000), was die parakrine mitogene Wirkung von HDGF bestätigte und zur Einstufung von HDGF als Wachstumsfaktor führte.

Neben HDGF wurden fünf weitere homologe Proteine identifiziert, die als HDGF-related proteins (HRPs) 1-4 (Izumoto et al., 1997; Ikegame et al., 1999; Kuroda et al., 1999; Dietz et al., 2002) und LEDGF (Lens Epithelium-derived growth factor oder p52/75) (Ge et al., 1998 (A); Ge et al., 1998 (B); Singh et al., 2000) bezeichnet werden. HDGF, HRP1-4 und LEDGF besitzen zwar eine Sequenzübereinstimmung von 23,4% mit den High Mobility Group-1 (HMG) Proteinen, bilden aber aufgrund fehlender für HMG-1-Proteine charakteristischer Domänen, wie der DNA-Bindedomäne HMG-Box, eine eigene Gruppe von Wachstumsfaktoren.

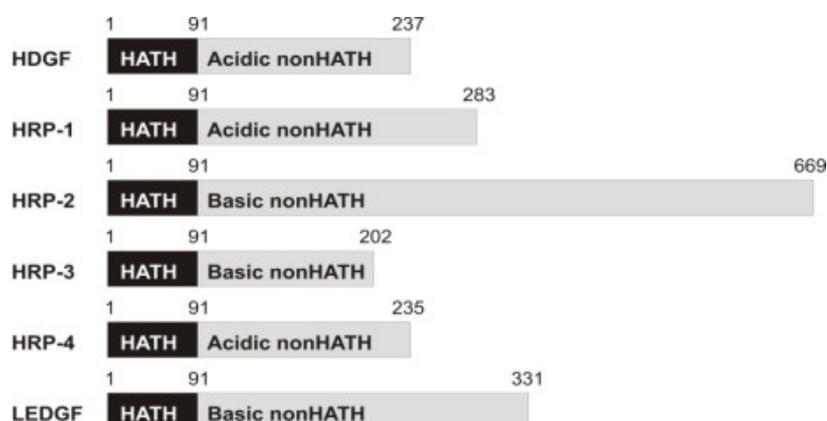


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mitglieder der HDGF-Proteinfamilie.

Der N-Terminus dieser Proteine ist stark konserviert und wird als HATH (Homologue to Amino Terminus of HDGF) Region bezeichnet. Die C-Termini der Proteine unterscheiden sich stark. Die Zahlen stehen für die entsprechende Anzahl von Aminosäuren (AS).

Innerhalb dieser HDGF-Proteinfamilie weist der N-Terminus eine Sequenzübereinstimmung von 54-78% auf. Aufgrund der Konserviertheit dieser 91 N-terminalen Aminosäuren wird dieser Bereich als HATH (Homologue to Amino Terminus of HDGF) Region bezeichnet (Abbildung 2). Im Gegensatz zum N-Terminus unterscheidet sich der C-Terminus der einzelnen Proteine sowohl in der Länge als auch in Bezug auf den isoelektrischen Punkt. Dies deutet auf unterschiedliche Funktionen der Proteine hin, über die, bis auf die Funktion als Wachstumsfaktoren, kaum etwas bekannt ist. Während HRP-1 wahrscheinlich eine Rolle in der Spermatogenese spielt (Kuroda et al., 1999), interagieren HRP-2 und LEDGF mit der HIV Integrase (Bradley and Craigie, 2005; Vanegas et al., 2005). LEDGF fungiert außerdem noch als Transkriptionsaktivator (Ge et al., 1998 (A); Ge et al., 1998 (B)). HRP-3 wird ausschließlich in Zellen des Nervensystems exprimiert, und es konnte gezeigt werden, dass HRP-3 mit Mikrotubuli interagiert (El-Tahir et al., 2009). Des Weiteren wird HRP-3 als neurotropher Faktor beschrieben, der das Neuritenwachstum korticaler Neurone fördert (Abouzied et al., 2010). Für HRP-1 und HRP-4 sind noch keine Funktionen bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Expression von HRP-1 und HRP-4 auf die Hoden beschränkt ist (Izumoto et al., 1997; Dietz et al., 2002), während HDGF und HRP-2 in Maus und Menschen in vielen Geweben (Leber, Gehirn, Herz, Lunge, Nieren, Skelettmuskulatur, Plazenta, Magen und Darm) exprimiert werden. Zwischen Mensch, Maus und Rind besteht für HDGF eine Sequenzübereinstimmung von 95%, wobei sich die Unterschiede auf die non-HATH Region beschränken.

Von der murinen HDGF-kodierenden Sequenz (cds) wird ein 237 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 26,3 kDa gebildet, das stark an Heparin-ähnliche Glykosaminoglykane (HLGAGs) bindet (Dietz et al., 2002; Sue et al., 2004). HDGF zeigt, wahrscheinlich aufgrund azider Bereiche, in SDS-Gelen eine Laufanomalie, so dass es bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 38 kDa migriert. Das veränderte Laufverhalten wird nicht durch posttranslationale Modifikationen (PTM) hervorgerufen, was durch eine massenspektrometrische Analyse bestätigt werden konnte (Abouzied et al., 2004). HDGF besitzt, wie einige andere Wachstumsfaktoren (z.B. FGF (Nickel, 2005)), keine klassische Signalsequenz (Nakamura et al., 1994), so dass nicht bekannt ist, auf welchem Weg HDGF sezerniert wird. Die proliferative Wirkung

von extrazellulärem HDGF auf Zellen lässt sich zum Teil durch eine Aktivierung der MAP-Kinase erklären (Everett et al., 2004; Ooi et al., 2010). Außerdem konnte eine Freisetzung von HDGF aus nekrotischen Zellen nachgewiesen werden (Zhou et al., 2004). In diesem Zusammenhang wurde HDGF eine mögliche Rolle als Alarmin zugewiesen, da es nur aus nekrotischen Zellen freigesetzt, in apoptotischen Zellen aber zurückgehalten wird (Bianchi, 2007). Alarmine signalisieren einem Organismus, dass Zell- und Gewebeschäden vorliegen (Bianchi, 2007).

Die subzelluläre Lokalisation von HDGF ist fast immer nukleär, obwohl in manchen Zellen auch eine zytosolische Lokalisation von HDGF beobachtet wurde (Nakamura et al., 1994; Oliver and Al-Awqati, 1998; Everett et al., 2000). HDGF besitzt zwei nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS), wovon eine in der konservierten HATH-Region (NLS-1) und die andere im C-terminalen Bereich (NLS-2) lokalisiert ist (Nakamura et al., 1994; Abouzied et al., 2005). Intrazelluläres HDGF wirkt mitogen, wobei die nukleäre Lokalisation für diese Wirkung erforderlich ist (Everett et al., 2001; Kishima et al., 2002). Mit Hilfe verschiedener HDGF-GFP-Fusionsproteine konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich NLS-2 für die nukleäre Lokalisation von HDGF verantwortlich ist (Everett et al., 2001; Kishima et al., 2002). Eine solche zweiteilige NLS-Struktur kommt häufig in kernlokalisierten Proteinen vor, zu denen auch Wachstumsfaktoren wie FGF-1 (Wesche et al., 2005) und FGF-2 (Sheng et al., 2004) gehören. Im Gegensatz zu FGF, das nach Bindung an einen FGF-Rezeptor und rezeptor-vermittelter Aufnahme in die Zelle in den Nukleus transportiert wird (Pellegrini, 2001), konnte für HDGF bisher kein Rezeptor identifiziert werden.

HDGF gehört einer Familie von Proteinen an, die über eine schwach konservierte PWWP (Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin)-Domäne verfügen. Es konnte gezeigt werden, dass die ca. 70 Aminosäuren umfassende Domäne mit DNA interagieren kann (Qiu et al., 2002; Chen et al., 2004; Ge et al., 2004). Diese Domäne wurde zuerst für das Gen Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1 (WHSC1) beschrieben (Stec et al., 2000). Bisher wurde diese Domäne in ca. 60 eukaryotischen Proteinen gefunden. Zur Familie dieser Proteine gehören unter anderem der Transkriptionsfaktor PC4 und die Methyltransferasen Dnmt 3a und 3b (Stec et al., 2000; Ren et al., 2004).

Untersuchungen der PWWP-Domäne von HDGF, die sich innerhalb der konservierten HATH-Region befindet, haben gezeigt, dass die PWWP-Domäne von HDGF spezifisch eine 37 bp lange DNA-Sequenz binden kann. Eine solche DNA-Sequenz konnte in der Promotorregion von mehreren Genen, wie VEGF oder SMYD-1, nachgewiesen werden (Yang and Everett, 2007; Yang and Everett, 2009). Diese Interaktion deutet auf eine Regulation dieser Gene durch HDGF und damit auf eine Funktion von HDGF als Transkriptionsfaktor hin (Yang and Everett, 2007).

Obwohl über eine Rolle von HDGF in der Organogenese spekuliert wird und HDGF proliferative, angiogenetische und neurotrophe Eigenschaften zugeschrieben werden, konnte bisher kein biochemischer oder morphologischer Phänotyp in HDGF-defizienten (HDGF^{-/-}) Mäusen beobachtet werden (Gallitzendoerfer et al., 2008).

1.4 HDGF und Krebs

Einleitend wurde HDGF als Wachstumsfaktor beschrieben, dessen mitogene Wirkung in mehreren Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Nakamura et al., 1994; Oliver and Al-Awqati, 1998; Everett et al., 2000). Weitere Studien zu HDGF deuten auf einen Zusammenhang zwischen HDGF und der Entstehung und Progression von Tumoren hin. So wird eine Überexpression des Wachstumsfaktors in nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinomen (Ren et al., 2004), in Leberkarzinomen (Hu et al., 2003), in malignen Melanomen (Bernard et al., 2003), in Tumoren des Ösophagus (Yamamoto et al., 2007) und des Pankreas (Uyama et al., 2006) sowie in bestimmten Formen von Darmkrebs (Lepourcelet et al., 2005; Yamamoto et al., 2006) im Vergleich zu normalen Geweben beschrieben. Für das Melanom wurde sogar eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und der HDGF Expression beschrieben. So steigt die Expression von einem niedrigen Niveau in benignen Tumoren graduell bis hin zum metastasierenden malignen Melanom an (Bernard et al., 2003).

Neben den proliferativen Eigenschaften von HDGF wird ein Einfluss auf die Initiation des programmierten Zelltodes (Apoptose) beschrieben (Machuy et al.,

2005; Shen et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass HDGF in HeLa-Zellen an der Regulation der TNF- α induzierten Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus der mitochondrialen Membran beteiligt ist (Machuy et al., 2005).

HDGF scheint auch eine Rolle in der Angiogenese von Tumoren zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass die Verringerung von HDGF durch Transfektion mit HDGF-siRNA zu Tumoren mit einer reduzierten Gefäßbildung führt (Zhang et al., 2006). Angiogenese ist eine Voraussetzung für Wachstum und Differenzierung von Organen und Geweben, da die Bildung neuer Blutgefäße die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet. Abgesehen von der elementaren Bedeutung der Angiogenese während der embryonalen Entwicklung, hat sie eine große Bedeutung für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren (Auguste et al., 2005). In einem weiteren Tumor-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Injektion von HDGF-Antikörpern zu einem verlangsamten Tumorwachstum, zu einer reduzierten Anzahl von Blutgefäßen und zu einer Verringerung des Durchmessers der Blutgefäße führte (Ren et al., 2009).

Die Invasion von Tumorzellen beruht auf der Fähigkeit, die direkte Umgebung besonders durch Proteolyse der extrazellulären Matrix (ECM) umzuformen (Bogenrieder and Herlyn, 2003). Die Eigenschaft von Tumorzellen Metastasen zu bilden beruht auf der Fähigkeit von Zellen sich aus einem Primärtumor zu lösen, über Gefäßsysteme zu migrieren und sich in anderen Organen festzusetzen. Aufgrund der beobachteten Überexpression von HDGF in der invasiven Front von kolorektalen Tumoren (Lepourcelet et al., 2005) und der Tatsache, dass eine Reduktion der HDGF-Menge in Tumorzelllinien eine Verringerung der Metastasierungs-kapazität zur Folge hat (Zhang et al., 2006), wird vermutet, dass HDGF auch in die Metastasierung von Tumoren involviert ist.

Neben der verstärkten HDGF-Expression in Tumoren wird auch mehrfach eine Korrelation zwischen dem Grad der Überexpression und einer negativen Patientenprognose beschrieben. Untersuchungen zeigten diesen Zusammenhang für Nicht-Kleinzellige Lungentumore (Ren et al., 2004), hepatozelluläre Karzinome (Yoshida et al., 2006), Tumore des Ösophagus (Yamamoto et al., 2007), des Pankreas (Uyama et al., 2006) und in bestimmten

Formen von Darmkrebs (Yamamoto et al., 2006; Hu et al., 2009). Anhand der Ergebnisse der aufgeführten Studien wird über eine mögliche onkogene Wirkung von HDGF und über die Möglichkeit, HDGF als prognostischen Marker in der Tumordiagnostik einzusetzen, diskutiert.

Aufgrund dieser Ergebnisse und im Zusammenhang mit der beschriebenen Überexpression von HDGF in verschiedenen Tumoren erscheint es möglich, dass HDGF bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle spielt. Zur Überprüfung dieser Vermutung eignet sich die Herstellung und Analyse transgener Mauslinien, die in bestimmten Zelltypen eine erhöhte HDGF-Expression im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen aufweisen. Ein zweiter Ansatz zur Untersuchung, ob HDGF bei der Tumorentstehung von Bedeutung ist, beinhaltet die Induktion und Analyse von Tumoren in HDGF-defizienten (HDGF^{-/-}) Mäusen.

1.5 Hautkrebs

1.5.1 Allgemein

Hautkrebsarten werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, in Melanome und Nicht-Melanome. Melanome (schwarzer Hautkrebs) entstehen aus den pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten. Nicht-Melanome (weißer Hautkrebs) werden weiter unterteilt in Basalzellkarzinome (Basaliome) und Plattenepithelkarzinome (Spinaliome). Hautkrebs ist die häufigste Krebserkrankung beim Menschen. Nach Angaben der Deutschen Krebshilfe e.V. erkranken in Deutschland jedes Jahr ca. 450 000 Menschen an Krebs, wobei davon ca. 219 000 als Hautkrebserkrankungen registriert wurden. Weltweit treten nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) jedes Jahr zwei bis drei Millionen neue Fälle von Nicht-Melanomen und mehr als 130 000 neue Fälle von Melanomerkrankungen auf. Prozentual gesehen machen Basalzellkarzinome mit ca. 80% den größten Teil der Hautkrebserkrankung aus, gefolgt vom Plattenepithelkarzinom mit einer Häufigkeit von ca. 16% und dem Melanom, das in ca. 4% der

Hautkrebserkrankungen diagnostiziert wird. Während hauptsächlich ältere Menschen (älter als 60 Jahre) an Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen erkranken, liegt die Altersspanne beim Melanom zwischen 30 und 70 Jahren mit einem Maximum bei ca. 50 Jahren. In den letzten Jahrzehnten ist die Inzidenz von Hautkrebs aufgrund des geänderten Freizeitverhaltens stetig gestiegen. Dieser Anstieg ist zum größten Teil auf die erhöhte Belastung durch UV-Strahlen, durch vermehrtes Sonnenbaden und auf die Benutzung von Sonnenbänken zurückzuführen. Besonders gefährdet sind junge Personen mit heller Haut-, Haar- und Augenfarbe, da die Haut junger Menschen wesentlich empfindlicher ist, als die älterer Menschen. Neben der erhöhten Belastung durch UV-Strahlen zählen ionisierende Strahlen (z.B. Röntgenstrahlen) oder der Kontakt mit Arsen (Insektizid) zu den Risikofaktoren für Hautkrebserkrankungen. Außerdem können familiäre Prädisposition, Immunsuppression (z.B. nach Organtransplantation) oder die Infektion mit Viren (z.B. Humaner Papillomavirus, HPV) zur Entstehung von Hautkrebserkrankungen beitragen (Reichrath, 2006; So, 2007).

Karzinogene sind Agenzien (Chemikalien, Strahlung, einige Viren), die die Entstehung von Krebs auslösen können, indem sie entweder DNA-Mutationen induzieren (genotoxisch; genetisch) oder indem sie biochemische Prozesse in den Zellen beeinflussen (nicht-genotoxisch; epigenetisch). Der Prozess der Tumorentstehung ist komplex und bedarf mehrerer Veränderungen in Form von Mutationen und epigenetischen Veränderungen. Auch für die verschiedenen Arten von Hauttumoren konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Gene mit einer gewissen Häufigkeit mutiert sind (Weinberg, 2007).

Zum besseren Verständnis der verschiedenen Hauttumore wird im Folgenden kurz auf den Aufbau der Haut und ihre Funktionen eingegangen.

1.5.2 Aufbau der Haut

Die Haut (Cutis) ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie bedeckt den Körper und schirmt ihn als Barriere von der Umwelt und deren Einflüssen ab. In Abbildung 3 ist ein schematischer Querschnitt durch die Haut dargestellt.

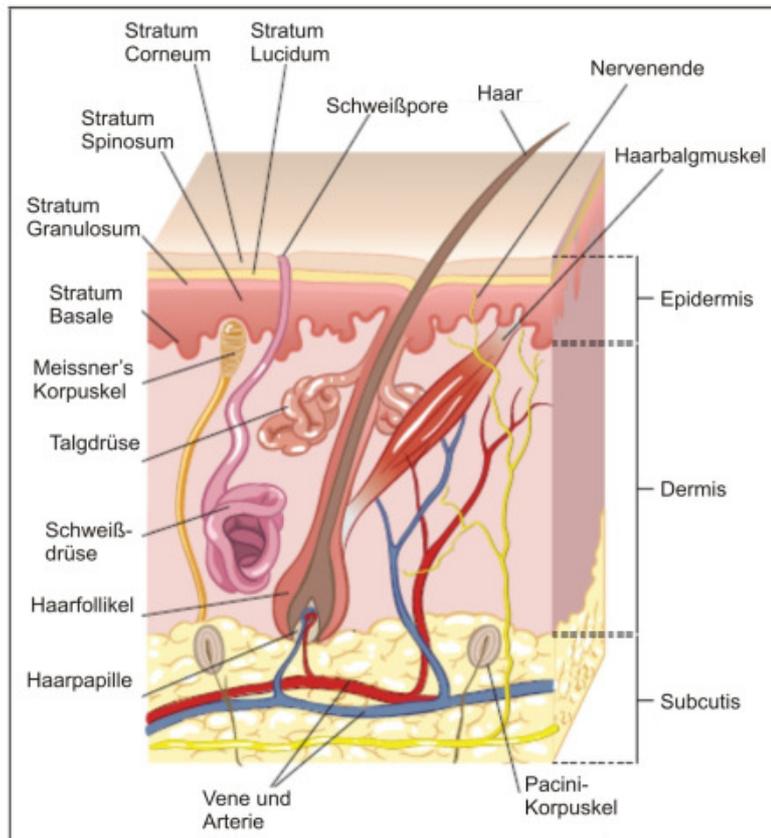


Abbildung 3: Querschnitt durch die Haut.

Darstellung modifiziert nach Po-Lin So aus *Biology of Cancer: Skin Cancer* (So, 2007).

Die Haut besteht demnach aus drei Hauptschichten, die jeweils spezielle Funktionen erfüllen (Freinkel, 2001; So, 2007):

1. Die **Epidermis** (Oberhaut) ist ein gefäßloses, stratifizierendes und verhornendes Epithel, das sich in vier Schichten gliedern lässt: *Stratum Basale*, *Stratum Spinosum*, *Stratum Granulosum* und *Stratum Corneum*. Ungefähr alle 30 Tage erneuern sich die Zellen der Epidermis, die Keratinozyten (Abbildung 4). Dieser Prozess beginnt mit der Proliferation von Stammzellen, die sich in der Basalzellschicht (*Stratum Basale*) befinden. Aus den neu gebildeten Zellen gehen durch Differenzierung Keratinozyten hervor, die in die Stachelzellschicht (*Stratum Spinosum*) migrieren. Die Ausbildung von Desmosomen zwischen den Zellen verleiht diesen ihr charakteristisches stacheliges Aussehen. Erreichen diese Zellen die Körnerzellschicht (*Stratum Granulosum*) flachen sie ab und durch Bildung und Einlagerung von Keratinbündeln beginnt die Verhornung der Zellen, die mit dem Erreichen der Hornschicht (*Stratum Corneum*) abgeschlossen ist. Die meisten Zellen der Hornschicht

besitzen keinen Zellkern mehr und sind stark abgeflacht. Die miteinander verbundenen Zellen fusionieren durch die Einlagerung von Lipiden zu einer protektiven Barriere (Mack et al., 2005; Li and Yuan, 2008).

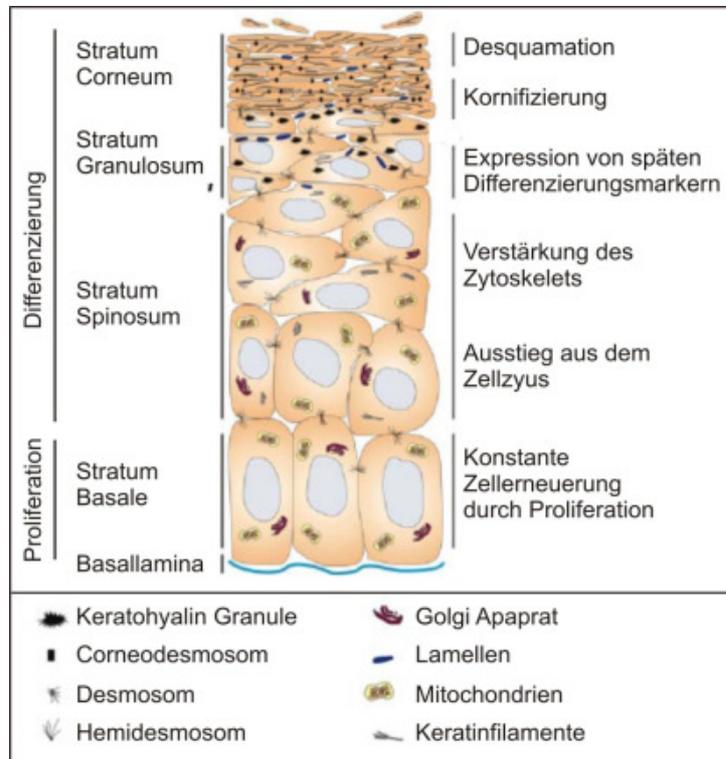


Abbildung 4: Erneuerung der Epidermis.
Modifiziert nach Lippens (Lippens et al., 2009).

Neben den Keratinozyten befinden sich zu einem geringen Teil pigmentproduzierende Melanozyten, immunologisch aktive Langerhans-Zellen und sensorisch aktive Merkel-Zellen in der Epidermis.

- Die **Dermis** (Lederhaut) versorgt die gefäßfreie Epidermis und sich selbst mit Nährstoffen und Sauerstoff. Die Fibroblasten, der Hauptzelltyp der Dermis, werden von Kollagenfasern und elastischen Fasern umgeben, die von Blut- und Lymphgefäßen durchzogen werden. Des Weiteren sind in der Dermis die Haarfollikel, der Haarbalgmuskel, die Talg- und Schweißdrüsen sowie die meisten Sinnesrezeptoren der Haut (Meissner's-Korpuskel, Pacini-Korpuskel und Nervenenden) lokalisiert.
- Die **Subcutis** (Unterhaut) bildet die unterste Hautschicht. Sie dient der Isolation des Körpers gegen Kälte und als Energievorrat und besteht hauptsächlich aus mit Fetttröpfchen gefüllten Adipozyten. Die Subcutis

ist locker mit dem darunter liegenden Bindegewebe verbunden, so dass sich die Haut relativ frei bewegen lässt.

1.5.3 Funktionen der Haut

Neben dem Schutz vor Austrocknung und der Abschirmung gegen die Umwelt hat die Haut noch weitere Funktionen. Eine davon ist der Schutz gegen ultraviolette (UV) Strahlung. UV-Strahlung besteht aus drei Komponenten: UVA (Wellenlänge von 315-400 nm), UVB (280-315 nm) und UVC (240-280 nm). Die Ozonschicht absorbiert den größten Anteil der kurzwelligeren, energiereichen UVC-Strahlen, so dass der Körper hauptsächlich UVA- und UVB- (> 300 nm) Strahlen ausgesetzt ist. Diese Strahlen werden von den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit von der Wellenlänge absorbiert. UVB-Strahlen werden fast komplett von der Epidermis absorbiert, während die langwelligeren UVA-Strahlen bis in die Dermis eindringen. Vor allem die kurzwelligere UVB-Strahlung führt zu molekularen Veränderungen des Erbgutes, die zu Mutationen führen können. Zu den Mechanismen, welche die DNA-verändernde-Wirkung von UV-Strahlen verhindern können, zählen die Produktion von Melanin und DNA-Reparaturmechanismen (Reichrath, 2006; So, 2007).

Melanin wird von den Melanozyten aus Tyrosin in einem Mehrschrittprozess gebildet (Abbildung 5). Das Enzym Tyrosinase nimmt dabei eine besondere Rolle ein, da es die ersten Schritte der Produktion des Pigments Melanin katalysiert und geschwindigkeitsbestimmend für diesen Prozess ist (Haddad et al., 1978; Hearing and Jimenez, 1989; Hearing and Tsukamoto, 1991). Defekte in diesem Gen führen zum Albinismus.

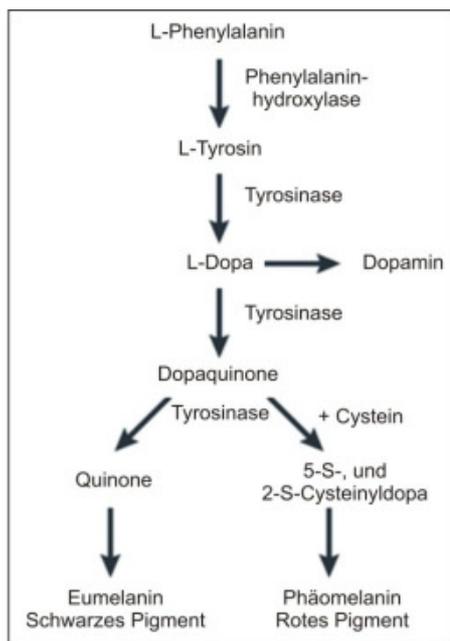


Abbildung 5: Bildung von Melanin aus Tyrosin.

Modifiziert nach Nadeau (Nadeau, 2001).

In kaum behaarter Haut machen Melanozyten einen Anteil von 5-10% aus und befinden sich in den Haarfollikeln und im *Stratum Basale*. Melanozyten bilden lange dendritische Fortsätze aus, über die sie mit 30-40 Keratinozyten in Kontakt stehen und melaninhaltige Melanosomen an diese abgeben. In den Keratinozyten lagern sich die Melanosomen um den Zellkern an und schützen die DNA durch Absorption der UV-Strahlung (So, 2007).

1.5.4 Melanome

Das Melanom gehört zu den malignen Tumoren der Haut, die aus Zellen des pigmentbildenden Systems, den Melanozyten, hervorgehen. Obwohl Melanome relativ selten auftreten (4% der Hautkrebserkrankungen) ist diese Krebsform sehr invasiv und neigt schon in frühen Stadien zur Metastasierung. Deshalb sind ca. 80% der durch Hautkrebs verursachten Todesfälle auf Melanomerkkrankungen zurückzuführen. Selten sind Melanome im Auge oder an den Hirnhäuten zu finden (ca. 5% aller Melanome). Das Melanom ist meistens stark pigmentiert. Nicht-pigmentierte, sogenannte amelanotische Formen treten selten auf. In Mitteleuropa beträgt die Melanominzidenz 12-14 Fälle pro 100 000

Einwohnern und Jahr. Individuen mit einer hellen Hautfarbe und einer hohen Nävus-Anzahl (Pigmentflecken) sind besonders gefährdet Melanome zu entwickeln. Für die Entstehung von Melanomen scheint die gesamte Belastung durch UV-Strahlen (UV-Lebenszeitkonto) einen geringeren Einfluss zu spielen als bei den Nicht-Melanomen. Die Melanomentstehung wird vielmehr durch häufige und schwere Sonnenbrände (UV-Erythem) mit Blasenbildung begünstigt (Hearing, 2006; So, 2007).

Melanome können anhand ihrer Größe und Metastasierung klassifiziert werden:

Tabelle 1.1 Clarks Klassifizierung der Melanome (So, 2007)	
Kategorie	Beschreibung
0	Melanomzellen befinden sich nur in der Epidermis. Keine Invasion in die Dermis. <i>In situ</i> Melanom.
I	Der Tumor ist dicker als 1 mm. Die Epidermis kann nach außen beschädigt (aufgekratzt) sein. Der Tumor hat sich noch nicht auf die umliegenden Lymphknoten ausgebreitet.
II	Der Tumor ist 1-2 mm dick und zeigt Ulzeration (teilweise oder vollständige Durchbrechung der oberflächlichen Epidermis über dem Tumor) oder der Tumor ist dicker als 2 mm und zeigt keine Ulzeration. Dermisinvasion, aber kein Befall der umliegenden Lymphknoten.
III	Der Tumor hat sich in angrenzendes Gewebe ausgebreitet, aber maximal zwei umliegende Lymphknoten befallen.
IV	Das Melanom zeigt Metastasierung und hat Lymphknoten und andere Organe oder weiter entfernt gelegene Hautstellen befallen.

Nach dieser Kategorisierung haben Patienten mit Melanomen der Kategorien 0 und I eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90%. Diese gute Prognose sinkt dramatisch mit zunehmender Tumordicke und liegt bei Melanomen der Kategorien III und IV bei weniger als 20% (So, 2007).

Obwohl die meisten Melanome spontan entstehen, wird geschätzt, dass ca. 10% der Melanome eine familiäre Geschichte haben. Die genetische Analyse dieser prädisponierten Familien führte zur Identifizierung des ersten „Melanom-Anfälligkeits-Gens“ – INK4a/ARF. Dieser Gen-Lokus ist in bis zu 40% der familiären Melanome mutiert. INK4a/ARF liegt auf Chromosom 9q21 und kodiert zwei Tumor-Suppressorproteine p16^{INK4a} und p14^{ARF} (murin p19^{ARF}). Die

beiden Proteine stellen keine Isoformen dar, da die Expression der Proteine von verschiedenen Promotoren reguliert wird, die Transkription an alternativen Exonen (Exon 1 α bzw. 1 β) beginnt und die Exone 2 und 3 in verschiedenen Leserastern transkribiert werden. Dies führt dazu, dass p16^{INK4a} und p14^{ARF} keine Sequenzhomologie besitzen (Abbildung 6).

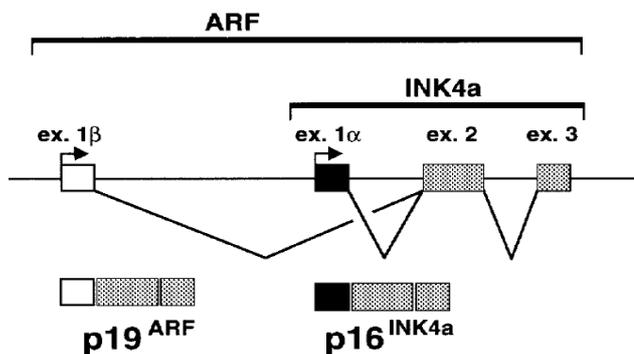


Abbildung 6: Struktur des INK4a/ARF-Genlokus.

Der Genlokus liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9q21) und kodiert die Proteine p16^{INK4a} und p14^{ARF}. Modifiziert nach Serrano (Serrano, 2000).

Beide Proteine sind in die Regulation des Zellzyklus involviert (Abbildung 7). p16^{INK4a} ist ein Regulator des Retinoblastom (Rb) Proteins, während p14^{ARF} die Menge an p53 reguliert. Die Konzentration von p16^{INK4a} und p14^{ARF} sind in den meisten Geweben sehr gering, steigen aber aufgrund onkogenen Stresses an und führen zum Arrest des Zellzyklus. Zellen, in denen diese Proteine durch Mutationen inaktiv sind, können trotz z.B. stressbedingter Schäden den Zellzyklus durchlaufen (Chin et al., 1998; Serrano, 2000).



Abbildung 7: Signalwege der Tumorsuppressoren p16^{INK4a} und p14^{ARF}.

Diese Signalwege werden durch onkogenen Stress aktiviert. Modifiziert nach Serrano (Serrano, 2000).

Neben der Mutation des INK4a/ARF Locus konnten Verbindungen zwischen dem Rb Protein und dem MC1R Rezeptor (MC1R) und familiär auftretenden

Melanomen hergestellt werden. Patienten, die kein Rb Protein besitzen, erkranken mit einem stark erhöhten Risiko an Melanomen. Mutationen im Gen des MC1R führen zur reduzierten Pigmentierungskapazität, so dass Mutationen durch UV-Strahlen verstärkt auftreten können (Hearing, 2006).

Neben den familiären genetischen Veränderungen konnten einige somatische Mutationen identifiziert werden, die verstärkt in Melanomen auftreten. Zu diesen gehören die Proteine N-Ras, B-Raf, HGF/SF, c-Met und PTEN (Chudnovsky et al., 2005; Hearing, 2006; Gray-Schopfer et al., 2007 (A); Gray-Schopfer et al., 2007 (B)). Diese Proteine sind in die Auslösung, Wahrnehmung oder Weiterleitung von Wachstumssignalen involviert. Veränderungen, z.B. in der Stärke des Signals, können elementare Auswirkungen auf die Genexpression und damit auf die Proliferation und Differenzierung einer Zelle haben.

1.5.5 Plattenepithelkarzinome (PEK)

Plattenepithelkarzinome (PEK) entstehen aus der Stachelzellschicht, dem Plattenepithel der Epidermis. Diese Art von Epithel findet sich nicht nur in der Haut, sondern auch in der Mucosa, die den respiratorischen und intestinalen Trakt auskleidet. Die kutane Form der PEK ist jedoch die häufigste und tritt meistens an Körperstellen auf, die häufig Sonnenstrahlen ausgesetzt sind. So scheint es einen linearen Zusammenhang zwischen der Belastung durch UV-Strahlen (UV-Lebenszeitkonto) und der Entwicklung von PEK zu geben. Langjährige Belastung mit UV-Strahlen kann zur Entstehung von aktinischer Keratose führen. Als aktinische Keratose werden raue rötliche oder hautfarbene Hautareale bezeichnet, die heute als Vorstufe des PEK eingeordnet werden. Seltener entwickeln sich PEK aus chronischen Wunden, Verbrennungsnarben oder anderen Hauterkrankungen. Neben den oben genannten Risikofaktoren für die Entwicklung von Hauttumoren konnte ein Zusammenhang zwischen dem Kontakt mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (Reichrath, 2006; So, 2007).

PEK sind häufig warzenförmige, rote, unregelmäßig geformte Flecken, die verdickt sein und/oder auch nicht verheilenden Wunden ähneln können. Außerdem können PEK verhornen und von Zeit zu Zeit blutig sein. Eine Klassifizierung der PEK stellt Tabelle 1.2 dar:

Tabelle 1.2 Klassifizierung der Plattenepithelkarzinome nach UICC (Union for International Cancer Control) (So, 2007)	
Kategorie	Beschreibung
0	Rauhe rötliche oder hautfarbene Hautveränderung (Aktinische Keratose). Karzinoma <i>in situ</i> . Keine Metastasierung.
I	Die Ausdehnung des Tumors beträgt maximal 2 cm. Keine Metastasierung.
II	Der Tumor ist 2-5 cm groß, zeigt aber keine Infiltrierung tiefer extradermalen Strukturen. Keine Metastasierung.
III	Der Tumor ist größer als 5 cm und/oder infiltriert tiefe extradermale Strukturen, wie Knorpel, Skelettmuskel oder Knochen. Lymphknotenmetastasen können vorhanden sein.
IV	Der Tumor ist größer als 5 cm und/oder infiltriert tiefe extradermale Strukturen, wie Knorpel, Skelettmuskel oder Knochen. Lymphknoten- und Fernmetastasen sind vorhanden.

Im Gegensatz zu Basalzellkarzinomen neigen PEK häufiger (~6%) zur Metastasierung und werden deshalb als gefährlicher eingeschätzt. Die Metastasierung erfordert die Transition der Tumorzellen von einer epithelialen hin zu einer mesenchymalen Zellform (epitheliale-mesenchymale Transition). Nicht-metastasierende PEK der Kategorien 0-II werden chirurgisch entfernt und zeigen eine sehr gute Prognose mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von über 90%. Dagegen haben Patienten mit PEK der Kategorien III und IV aufgrund der Metastasierung nur eine 10-Jahres-Überlebensrate von 8-20%. Obwohl die Nicht-Melanom Hautkrebsformen im Vergleich zum Melanom selten zum Tod führen, stellt die hohe Morbidität dieser Tumore eine steigende finanzielle Belastung für die Gesundheitssysteme dar (So, 2007).

Für PEK konnte bis jetzt keine genetische Veränderung identifiziert werden, die spezifisch das Risiko an dieser Art von Hautkrebs zu erkranken erhöht. Allerdings wird ein Zusammenhang zwischen Mutationen im TP53 Gen, die

zum Verlust des p53 Proteins führen, und der Neigung PEK zu entwickeln vermutet (Mutationen in 41-69%). Des Weiteren wird eine aktivierende Mutation von H-Ras (46%) mit der Entstehung von PEK in Verbindung gebracht (Reichrath, 2006).

1.5.6 Mausmodelle für Hauttumore

Die Erforschung der Funktion von Genen und deren Produkten *in vivo* ist von großer Bedeutung für das Verständnis biologischer Mechanismen. Mit Hilfe genetisch veränderter Tiere können neben biologischen Mechanismen auch Zusammenhänge zwischen bestimmten Krankheitsbildern und genetischen Veränderungen untersucht und Modelle menschlicher Erkrankungen erzeugt werden. Als Modellorganismus werden häufig Mäuse ausgewählt, da sie als Säugetiere dem Menschen relativ ähnlich sind, ihr Erbgut entschlüsselt ist und gezielt verändert werden kann. Es werden drei Arten der genetischen Veränderung unterschieden (Papaioannou, 2004):

1. Knock-out – die genetische Information eines Gens wird spezifisch ganz oder teilweise durch homologe Rekombination entfernt
2. Knock-in – ein Gen oder die kodierende Sequenz eines Gens wird an einer spezifischen Stelle ins Genom durch homologe Rekombination eingebracht
3. Transgen – ein Gen oder eine kodierende Sequenz inklusive eines regulatorischen Elements wird in den Vorkern (Pronukleus) eingebracht und integriert an einer beliebigen Stelle ins Genom

Anhand von Tumor-Mausmodellen konnte bereits für viele Proteine der Verdacht, an der Entstehung verschiedener Tumore beteiligt zu sein, bestätigt werden.

Zur Untersuchung der Entstehung von Melanomen wurden einige genetisch veränderte Mauslinien etabliert, die als Transgen ein Onkogen oder einen inaktiven Tumorsuppressor unter Kontrolle eines melanozytenspezifischen Promotors enthielten. Die Expression des jeweiligen Transgens führte aber nur zur Entstehung melanozytärer Läsionen (Hyperproliferationen ohne Transformation) und nicht zur Entwicklung von malignen Melanomen (Powell et

al., 1995). Beispiele dafür sind das Tyrosinase-T-Antigen (Bradl et al., 1991; Penna et al., 1998) und Tyrosinase-HRas^(G12V)-Transgen (Kramer et al., 1998). Überraschenderweise entwickeln Knock-out-Mäuse für das in humanen Melanomen häufig mutierte INK4a/ARF-Gen (Ink4a^{-/-}) nur sehr selten spontane Melanome (Serrano et al., 1996). Die Einführung einer zweiten genetischen Veränderung in Form eines Transgens wie z.B. Tyrosinase-HRas^(G12V) führt dann zur spontanen Entstehung von Melanomen (Chin et al., 1997).

Eine andere Strategie zur Induktion von Melanomen involviert die Behandlung genetisch veränderter Mäuse mit UVB-Strahlen. Ein Beispiel hierfür ist die transgene Hepatocyte Growth Factor (HGF)/Scatter Factor (SF) Maus, die unbehandelt keine, nach neonataler UVB-Bestrahlung aber Melanome entwickelt, die sowohl eine radiale Wachstumsphase zeigen, als auch metastasieren (Noonan et al., 2001; Noonan et al., 2003).

Plattenepithelkarzinome können in adulten Mäusen durch eine zweistufige Induktion mit karzinogenen Substanzen induziert werden. Diese umfasst die einmalige Behandlung mit 7,12-Dimethylbenz[a]antrazen (DMBA) und eine anschließende über mehrere Wochen andauernde Behandlung mit 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) (Alison, 2007). Alternativ können PEK in neugeborenen Mäusen durch eine einmalige Behandlung mit DMBA induziert werden (Chen et al., 2004).

1.6 Ziel der Arbeit

HDGF wird in vielen Tumorarten überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass in einigen Fällen der Grad der Überexpression mit einer negativen Prognose für den Patienten einhergeht und dass die Verringerung von HDGF in Mausmodellen zu einer teilweisen Tumorregression und einer besseren Therapierbarkeit der Erkrankung führt. Es ist jedoch nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt der Tumorentstehung die Überexpression von HDGF beginnt und ob HDGF onkogene Fähigkeiten besitzt. Daraus ergibt sich die Frage, ob eine Überexpression von HDGF die Entstehung von Tumoren begünstigt.

Zur Beantwortung dieser Fragen sollte ein Mausmodell etabliert werden, in dem HDGF in Zellen des pigmentbildenden Systems (Melanozyten), zusätzlich zum endogenen Protein, exprimiert wird und das gleichzeitig eine Prädisposition zur Tumorentwicklung besitzt. Hierfür sollten transgene Mauslinien erzeugt werden, die HDGF unter der Kontrolle des Tyrosinase-Promoters als regulatorischem Element exprimieren. Die Analyse sollte zeigen, ob HDGF in den Melanozyten exprimiert wird und ob eine Überexpression des Proteins nachgewiesen werden kann. Als zweite genetische Veränderung sollten diese Mauslinien in die Ink4a-Knock-out- ($Ink4a^{-/-}$) Mauslinie gekreuzt werden, die dazu neigt Tumore zu entwickeln. Eine Analyse dieser Mäuse sollte zeigen, ob die zusätzliche Expression von HDGF ausreicht, damit diese Tiere Melanome entwickeln. Falls diese zweite genetische Veränderung nicht ausreicht, sollte in diesen Mäusen durch UVB-Strahlen die Entstehung von melanozytären Veränderungen induziert werden. Zu Vergleichszwecken sollte die HDGF-defiziente ($HDGF^{-/-}$) Mauslinie ebenfalls in die $Ink4a^{-/-}$ -Linie gekreuzt und entsprechend behandelt werden. Die Analyse der melanozytären Veränderungen sollte in Bezug auf Unterschiede zwischen den Genotypen untersucht werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Expression von HDGF in einem noch nicht auf HDGF-Überexpression untersuchten humanen Tumor zu analysieren. Im Falle einer Überexpression sollten diese Tumore in $HDGF^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen durch Behandlung mit einem Karzinogen induziert werden. Die Analyse dieser Mäuse sollte Aufschluss darüber geben, ob $HDGF^{-/-}$ -Mäuse eine geringere Inzidenz zur Entwicklung dieser Tumore aufweisen oder eine veränderte Tumorphistologie zeigen.

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien:

Bezeichnung		Hersteller
Plastikröhrchen klein	(15 ml)	Sarstedt
Plastikröhrchen groß	(50 ml)	Sarstedt
Reagiergefäße:	0,2 - 2,0 ml	Sarstedt
Einmalspritzen:	5 ml, 20 ml, 100 ml	B.Braun
Gel-Blotting-Papier		Schleicher&Schüll
Kanülen	20G	B.Braun
Kryogefäße	1,8 ml	Nalgene
Nitrozellulose Transfer Membran		Schleicher&Schüll
Nylon Membran Hybond TM -N+		Amersham
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran		BioRad
Mehrwell Zellkulturplatten	6 well, 12 well, 24 well	Greiner Bio-One
Pasteurpipetten		Assistent
Pipettenspitzen		Greiner
12 ml Röhrchen, steril (Polypropylen)	184261	Greiner Bio-One
Probe Quant Säulen		GE Healthcare
Röntgenfilm SuperRX		Fuji Medical X-Ray Film
Sephadex G23 M		Pharmacia
Superfrost Objektträger Vollpipetten	5 ml, 10 ml, 20 ml	Heinrich EM
Sterilfilter	Porengröße 0,1 bzw. 0,2 µm	Millipore
Petrischalen	10 cm	Sarstedt

2.2 Chemikalien

DNA-Extraktionskits für Mini- und Midipräparationen wurden von Qiagen, während Restriktionsenzyme von Fermentas bezogen wurden. Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Merck, Roth oder Fluka bezogen.

Chemikalie	Hersteller
[α 32P]-dCTP	Hartmann
Agarose	Invitrogen
Block Reagenz für DNA-Hybridisierung und Detektion	Roche
BM Purple™	Roche
Bovine Pituitary Extract (Zellkultur)	Invitrogen
Catalase (Zellkultur)	Sigma Aldrich
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich
Diaminobenzidine (DAB)	Sigma Aldrich
Digoxigenin RNA Labeling Kit	Roche
Dimethylbenzanthrazen	Sigma Aldrich
Dispase II	Roche
DPX Mounting Medium for Histology	Sigma Aldrich
Enhanced Chemilumineszenz-Lösung	Pierce
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Formalin-Lsg. 16%	Polysciences Inc.
Glutamax™ (Zellkultur)	Gibco BRL
Glycin	ICN Biomedicals, Inc.
Insulin (Zellkultur)	Sigma Aldrich
3-Isobutyl-1-Methylxanthen (IBMX) (Zellkultur)	Sigma Aldrich
L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA)	Sigma Aldrich
Megaprime-DNA labeling Kit	Amersham
Milchpulver	ReformHaus
Mowiol 4-88	Calbiochem
10x PBS (Zellkultur)	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd	Merck
RedTaq Ready Reaction Mix	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad

Chemikalie	Hersteller
Tissue Tek®	Sakura
12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) (Zellkultur)	Sigma Aldrich
Trizol®	Invitrogen
Trypsin-Lösung (Zellkultur)	Gibco BRL
Tween 20	Sigma Aldrich
Vectastain ABC-Kit	Vector

2.3 Allgemeine Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen wurden nach Vorschrift aus dem Laborhandbuch von Sambrook. (Sambrook, 1989) angesetzt.

Name	Bestandteile	Herstellung
Agarplatten	LB-Medium 1,5 % Agar (w/v)	Lösung autoklaviert auf ca. 50 °C abgekühlt und in Petrischalen gegossen.
Alkalische Phosphatase (AP) – Puffer (ISH)	100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂	In ddH ₂ O gelöst.
Alkalische Phosphatase (AP) – Puffer (Northernblot)	100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM NaCl	In ddH ₂ O gelöst.
Ampicilinstock-Lsg.	100 mg/ml	In ddH ₂ O gelöst. Lagerung: - 20 °C
Blocklösung für Northernblot & ISH	1% Blockreagenz	In Maleinsäurepuffer gelöst.
Blotpuffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,037% SDS 20% Methanol (v/v)	In 800 ml ddH ₂ O gelöst und mit 200 ml Methanol vermischt.
DAPI	5 mg/ml	Mittels Ultraschall lösen. Vor Gebrauch 1:25 000 verdünnen.

Name	Bestandteile	Herstellung
Denaturierungs-Lsg	0,5 M NaOH (20 g/l) 1,5 M NaCl (87,7 g/l)	In ddH ₂ O gelöst.
Depurinierungs-Lsg	0,25 M HCl	
Ethidiumbromid-Lsg	5 mg/ml	In ddH ₂ O gelöst.
Hybridisierungspuffer Southernblot (FBI)	0,75 ml 20x SSPE 2 ml 50% PEG-8000 (w/v) 3 ml 20% SDS (w/v)	Ad 10 ml ddH ₂ O
2x Hepes gepufferte Salzlösung	280 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM Na ₃ PO ₄	In ddH ₂ O gelöst, mit 1 N NaOH auf pH 7,13 eingestellt und steril filtriert.
Kanamycinstock-Lsg.	50 mg/ml	In ddH ₂ O gelöst. Lagerung: -20 °C
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefe Extrakt 10 g/l NaCl	In 1 l dd H ₂ O gelöst, pH auf pH 7,5 und anschließend autoklaviert.
Lysispuffer für genomische DNA	10 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM NaCl 25 mM EDTA pH 8,0 0,5% SDS (v/v) 300 µg/ml Proteinase K	In ddH ₂ O angesetzt. Proteinase K vor Gebrauch zugesetzt.
Lysispuffer für Gewebe	20 mM HEPES pH 7,4 250 mM Sucrose 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM PMSF 1 mM DTT 50 µg/ml DNase I 0,1% SDS (v/v) 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin Phosphataseinhibitoren	In ddH ₂ O angesetzt.

Name	Bestandteile	Herstellung
Lysispuffer für Zellen	10 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 2 mM PMSF 5 mM DTT 5% Glycerol (v/v) 0,1% TX-100 (v/v) 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin Phosphataseinhibitoren	In ddH ₂ O angesetzt.
Maleinsäurepuffer (MAB)	100 mM Maleinsäure (11,6 g/l) 150 mM NaCl (8,75 g/l)	In 700 ml ddH ₂ O gelöst; mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit ddH ₂ O auf 1 l aufgefüllt.
Mowiol	<u>Lösung 1:</u> 20 mg Mowiol 80 ml 1x PBS, pH 7,3 40 ml Glycerin (87%) 2 mM NaN ₃ <u>Lösung 2:</u> 2,5 mg n-Propylgallate 50 ml 1x PBS, pH 7,3 50 ml Glycerin	Gebrauchslösung: 7,5 ml Lsg.1 + 2,5 ml Lsg.2 Lagerung bei 4 °C.
Natriumacetat	3 M Natriumacetat x 3 H ₂ O (408,1 g)	In 800 ml ddH ₂ O gelöst, pH-Wert mit Eisessig auf 5,2 eingestellt, auf 1 l auffüllen.
Natriumdodecylsulfat (SDS) Lösung	10% SDS (10g)	Natriumdodecylsulfat in 100 ml ddH ₂ O bei 65 °C gelöst und sterilfiltriert.
Neutralisierungs-Lsg.	0,5 M Tris-HCl pH7,4 1,5 M NaCl	In ddH ₂ O angesetzt.
10x PBS	1,71 M NaCl (100 g/l) 33,5 mM KCl (2,5 g/l) 0,04 M Na ₂ HPO ₄ (7,12 g/l) 18,4 mM KH ₂ PO ₄ (2,5 g/l)	In ddH ₂ O gelöst und pH 7,4 eingestellt.

Name	Bestandteile	Herstellung
Paraformaldehyd/ Sucrose (PFA/Sucrose)	8% PFA 10% Sucrose	PFA in ddH ₂ O unter erhitzen und Zugabe von NaOH lösen; Sucrose und 10x PBS dazugeben und auf das gewünschte Endvolumen mit ddH ₂ O auffüllen.
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris	In ddH ₂ O gelöst, pH auf 6,8 eingestellt.
10x Natriumdodecylsulfat (SDS) Laufpuffer	30,3 g Tris-Base 144,0 g Glycerin 10 g SDS	Auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen.
4x Natriumdodecylsulfat (SDS) Probenpuffer	8 % SDS 40 % Glycerol 240 mM TrisHCl pH 6,8 4 % Bromphenolblau 4 % β-ME	
20x Zitrat gepufferte Saline (SSC)	3 M NaCl (175,3 g) 0,3 M Tri-Natriumcitrat- Dihydrat (88,2 g)	In 800 ml ddH ₂ O gelöst, pH-Wert mit HCl auf 7,0 eingestellt.
20x Saline-Natrium- Phosphat-EDTA (SSPE) Puffer	3,6 M NaCl (174 g/l) 0,2 M Na ₂ HPO ₄ (27,6 g/l) 0,02 mM EDTA (7,4 g/l)	In 800 ml ddH ₂ O lösen, auf pH 7,7 einstellen und auf 1 l auffüllen.
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	2,5 M Tris 100 mM EDTA 1 M Natriumacetat	In ddH ₂ O gelöst und mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt.
10x Tris gepufferte Saline (TBS)	0,5M tris-HCl (78,8 g/l) 1,5M NaCl (87,66 g/l)	In 800 ml ddH ₂ O gelöst; pH-Wert auf 7,4 eingestellt und mit ddH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
Tris gepufferte Saline/Tween (TBS/T)	1x TBS 0,5% Tween-20	10x TBS 1:10 mit ddH ₂ O verdünnt, mit 0,5% Tween gemischt.
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl	In ddH ₂ O gelöst, auf pH 8,8 eingestellt.
Waschpuffer (Northernblot)	Maleinsäurepuffer + 0,3% Tween-20	

Name	Bestandteile	Herstellung
RNase freie Lösungen		
Diethylpyrocarbonate-(DEPC) Wasser	0,1% DEPC (v/v)	ddH ₂ O mit 0,1% DEPC gemischt, ün bei RT gerührt und autoklaviert.
Dithiothreitol (DTT)	4 M DTT	In Rnase freiem Gefäß abgewogen; in DEPC-H ₂ O gelöst; Lagerung: -20 °C
Dinatriumsalt (EDTA)	0,2 M EDTA	In Rnase freiem Gefäß abgewogen; in dd-H ₂ O gelöst; mit NaOH auf pH 8 eingestellt; mit DEPC (0,1%) gemischt, über Nacht bei RT gerührt und autoklaviert
Hybridisierungssalz	3 M NaCl 0,1 M PIPES 0,1 M EDTA	In 100 ml DEPC-H ₂ O gelöst; Lagerung: -20 °C
Hybridisierungs-Lsg.	10% Dextransulfat (5 g) 10% Hybridisierungssalz (5 ml) 50% Formamid (25 ml) 2% Denhardt's Lösung (1 ml 50x Denhardt's Lösung) 0,2% SDS 2,5% ssDNA (1,25 ml)	Dextransulfat in 10 ml DEPC-H ₂ O durch erhitzen (max. 60 °C) gelöst; Lösung mit den anderen Chemikalien vermischt; mit DEPC-H ₂ O auf 50 ml aufgefüllt; Lagerung: -20 °C
Natriumacetat (mRNA-Isolierung)	2 M Na-Acetat	In dd H ₂ O gelöst; mit Eisessig auf pH 4 eingestellt; mit DEPC (0,1%) versetzt, ün gerührt und autoklaviert.
Natriumacetat (ISH)	3 M Na-Acetat	In dd H ₂ O gelöst; mit Eisessig auf pH 5 eingestellt; mit DEPC (0,1%) versetzt, ün gerührt und autoklaviert.

Name	Bestandteile	Herstellung
10x Phosphat gepufferte Saline (PBS)	1,71 M NaCl (100 g/l) 33,5 mM KCl (2,5 g/l) 0,04 M Na ₂ HPO ₄ (7,12 g/l) 18,4 mM KH ₂ PO ₄ (2,5 g/l)	In ddH ₂ O gelöst; mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt; mit DEPC (0,1%) gemischt, über Nacht bei RT gerührt und autoklaviert.
Paraformaldehyd-lösung	8% PFA	32 g PFA in 350 ml DEPC-H ₂ O gelöst; auf max. 70°C erhitzt, mit 500 µl NaOH versetzt und unter rühren gelöst; nach Abkühlung mit 40 ml 10x PBS (Rnase frei) versetzt; pH-Wert mit pH-Papier auf 7,4 eingestellt; mit DEPC-H ₂ O auf 400 ml aufgefüllt
Phenol (Tris gepuffert)	Phenol 250g/150 ml 0,1% 8-Hydroxychinolin	Phenol wurde bei 60°C im Wasserbad verflüssigt, mit Hydroxychinolin versetzt, mit 1 M Tris pH 8 extrahiert und anschließend mit TE überschichtet bei -20°C aufbewahrt.
Proteinase K	20mg/ml Proteinase K	In Rnase freiem Gefäß abgewogen; in 1x PBS (DEPC) gelöst; Lagerung bei -20°C.
Puffer D	4 M Guanidiniisothiocyanat (GIT) 25 mM Natriumcitrat pH 7,0 0,5 % Natrium-N-Lauryl-Sarcosyl 0,1 M 2-Mercaptoethanol (ME)	In DEPC-H ₂ O bei 65°C gelöst; ME nach dem Lösen dazugegeben.
20x Zitrat gepufferte Saline (SSC)	3 M NaCl (175,32 g/l) 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (88,23 g/l)	In ddH ₂ O gelöst und mit 1M HCl auf pH 7,0 eingestellt; mit DEPC (0,1%) gemischt, über Nacht bei RT gerührt und autoklaviert.

Name	Bestandteile	Herstellung
10x TEA	Triethanolamin (TEA) (26,6 ml/200ml)	TEA mit DEPC-H ₂ O vermischt.
Tris-HCl	1 M Tris-HCl	In DEPC-H ₂ O gelöst; mit pH-Papier auf pH 8 eingestellt.

2.4 Chemisch kompetente Zellen

Stamm	Genotyp
XL-1 Blue ^r	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F'[proAB ⁺ , lacI ^q lacZΔM15 Tn10 (tet ^r)]; Bullock et al., (1987) BioTechniques, 5, 376.

2.5 Zellkulturmedium

RPMI (Gibco BRL) für

prim. Melanozyten:

- + 5% FCS
- + 2 mM GlutamaxTM
- + 100 IU Penicillin (Gibco BRL)
- + 100 µg Streptomycin (Gibco BRL)
- Supplements:
- 4 µg/ml Insulin
- 100 ng/ml TPA
- 100 U/ml Catalase
- 10 µg/ml BPE
- 23 ng/ml IBMX

2.6 Primäre Zellen

Für Versuche mit Zellkulturzellen wurden folgende Zelllinien verwendet:

Name	Verwendung
Primäre Melanozyten	Isoliert aus Mäusen zur Expressionsanalyse

2.7 Versuchstiere

2.7.1 Tyrosinase-HDGF transgene Mäuse ($HDGF^{Tyr}$)

Die Tyrosinase-HDGF (Tyr-HDGF) transgenen Mäuse wurden durch Injektion des Tyr-HDGF Gen Konstruktes in den Vorkern von befruchteten Eizellen in der Serviceeinrichtung für Transgene Tiere des Universitätsklinikums Tübingen erzeugt und im Alter von 4-6 Wochen in den Tierstall nach Bonn überführt (Genehmigungsnummer: 50.203.2-BN24,12/06).

2.7.2 HDGF-Knockout-Mäuse ($HDGF^{-/-}$)

Die HDGF-Knockout Mauslinie wurde von Rainer Gallitzendörfer (Gallitzendoerfer et al., 2008) im Institut für Biochemie und Molekularbiologie generiert. Durch homologe Rekombination erfolgte der Austausch der Exone II-VI gegen die kodierende Sequenz des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP).

2.7.3 Ink4a-Knockout-Mäuse ($Ink4a^{-/-}$)

Die INK4a Mausmutante wurde von Manuel Serrano (Serrano et al., 1996) generiert. Durch homologe Rekombination erfolgte die Eliminierung der Exone

II und III, so dass von dem Genlokus weder das p16^{INK4a} noch das p14^{ARF} gebildet werden kann. Diese Mäuse wurden von Clemens Schmitt (Charité – Universitätsmedizin Berlin) mit Genehmigung von Manuel Serrano zur Verfügung gestellt.

2.7.4 Wildtyp-Mäuse

Zur Verpaarung der transgenen und der INK4a ^{-/-} Mäuse wurden Tiere des Stamms C57BL/6 verwendet. Diese Tiere wurden ursprünglich von Charles River bezogen und in eigener Zucht weitergeführt.

2.8 Primer

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer:

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Schnittstellen
829	mHDGF left	AGAAGAACAGCACCCCCTCT	-
830	mHDGF right	AGGGGCTCCTCTTGAAACAT	-
1061	GAPDH-sense	TGCACCACCAACTGCTTAGC	-
1062	GAPDH-anti	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	-
1272	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	-
1273	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	-
1297	SP6	CTAGCATTTAGGTGACACTATAG	-
1547	HDGF_KI Intron1_S	GCTCCGCTCGAGAATTCAAATGTATAGGTGGT GGCC	EcoRI
1548	HDGF_KI_UTR_AS	TTGCAGCTGTCGACTGGATGATGTGGGCTTTG	PvuII
1559	mHDGFsplice sense	GCGGCGGTACCATGTGCGGATCCAACCGG	KpnI
1674	HDGF_IntronI_AS2	CATCTTAAGTCTGAGCTGGAGGC	BspTI
1814	HDGFwt-sense	GGTTGACAGGTCAGAAATGGTT	-

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Schnittstellen
1815	HDGFwt-antisense	CTTGGTATTTGTTGGCTGTTGA	-
1816	HDGFtg-antisense	GTCGTCCTTGAAGAAGATGGTG	-
1850	mHDGFasXhoI	GAGACTCGAGTGAGTGAGGGAGTAG	XhoI
1879	mHDGFGenKonstrukt	GTATCGATAAGCTTGGTACCATG	HindIII
2596	mp16,1	ATGATGATGGGCAACGTTTC	-
2597	mp16,2	CAAATATCGCACGATGTC	-
2598	5'NEO	GGGCGCCCGGTTCTTTT	-
2599	3'NEO	CCAGCCGGCCACAGTCG	-
3019	Tyr-Sonde1_s	AGTCTGCAGTACTCGAGTGTTTTGTATTGCCT TCTGTGGA	XhoI, HindIII
3020	Tyr-Sonde1_as	TGAAGCTTACCCATTGTTTCATTTGGCCAT	HindIII, PstI
3021	Tyr-Sonde2_s	AGTCTGCAGTACTCGAGCATTGATTTTGCCCA TGAAG	XhoI, HindIII
3022	Tyr-Sonde2_as	AGAAGCTTAAGAAAAATGCGATCGTTGG	HindIII, PstI

2.9 Vektoren und Plasmide

In der folgenden Tabelle sind die für Klonierungen verwendeten Vektoren aufgelistet.

Nr.	Name	Beschreibung
P9	pCDNA3	Klonierungs- und Expressionsvektor: CMV-Promotor, T7 und Sp6 Promotoren (Invitrogen)
P18	pBluescript	Klonierungsvektor: T3- und T7-Promotor (Stratagene)
SF-205	HDGFGenpBSK	Herstellung der Southernblotsonde
SF-254	Tyr-HDGFGenpBEH	Herstellung der transgenen Mäuse
SF-541	mTyr_Sonde1_s_pBSK	Sonde für die in situ Hybridisierung
SF-542	mTyr_Sonde1_as_pBSK	Sonde für die in situ Hybridisierung
SF-543	mTyr_Sonde2_s_pBSK	Sonde für die in situ Hybridisierung

Nr.	Name	Beschreibung
SF-544	mTyr_Sonde2_as_pBSK	Sonde für die in situ Hybridisierung

2.10 Antikörper

Zur Detektion von Proteinen im Westernblot und für Immunfärbungen wurden folgende Antikörper verwendet:

Antikörper	Hersteller
Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase (Fab Fragment)	Roche
Anti-D240 (Human)	Zytomed Systems
Ziege-anti-Kaninchen Biotinyliert	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelt	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 gekoppelt	Dianova
Hamster-anti-Podoplanin	AbCam
Kaninchen-anti-HDGF (affinitätsgereinigt aus polyklonalem Antiserum; Immunisierung mit bakteriell exprimiertem murinem HDGF-Protein)	wie beschrieben in Abouzied et al., 2004
Kaninchen-anti-huHDGF (affinitätsgereinigt aus polyklonalem Antiserum; Immunisierung mit bakteriell exprimiertem humanem HDGF-Protein)	Pineda
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-VEGF	AbCam
StrepTactin-Peroxidase	IBA Göttingen

2.11 Größenstandards

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Größenstandards angegeben:

Name	Herrsteller	Fragmente [bp]
λ /Hind III	Fermentas	564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130
λ /EcoRI + HindIII	Fermentas	564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 4286, 4973, 5148, 21226
1KB DNA Marker	Fermentas	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200,1500, 2000, 3000

2.12 Geräte

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarose Gele:		
Stromversorgung	Power Supply ST305	Life Technologies
Gelkammer		Eigenbau
Digital pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Digitalkamera	IXUS 400	Canon
Eismaschine		Ziegra
Gefrierschrank –20 °C		AEG
Gefrierschrank –80 °C	Ultra low	Sanyo
Gewebeeinbettmaschine	Tissue-Tek TEC	Sakura
Gewebeentwässerungs- maschine	Tissue-Tek VIP	Sakura
Elektrophorese und Westernblot:		
Stromversorgung	Power Pac 200	BioRad
Geltrockner	Model 583	BioRad
Elektrophoresekammer klein	Mini Protean 3 Gelkammer	BioRad
Elektrophoresekammer groß	Proteax Xi	Bio Rad
Kühlung		Bio Rad
Semi Dry Westernblot	Transblot SD Cell	Bio Rad
Filmentwickler-Automat	Curix 60	Agfa
Fotoapparat	IXUS 100	Canon
Heizblock	Dry Block Heater	STAR LAB
Isotopie:		
Drehinkubator	BFED 53	WTB Binder
Heizblock	Dry Block Heater	STAR LAB
Szintillationsmesser		Beckman Coulter
Wasserbad	SW20	Julabo
Zentrifuge		Eppendorf

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Kryostat	CM 3050 S	Leica
Kühlschrank		AEG
Mikrowelle Vakuum		
Histprocessor	RHS-1	Milestone
Magnetrührer		Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Mikrowelle		Sharp
Mikroplatereader	GENios	TECAN
Mikroskope:		
Lichtmikroskop	TELAVAL 31	ZEISS
Fluoreszenzmikroskop		ZEISS
Paraffin Mikrotom	RM 2155	Leica
Paraffin Mikrotom Wasserbad	HI 2110	Leica
PCR-Gerät	T3 Thermocycler	Biometra
Phosphoimager	BAS-1800II	Fujifilm
Rasierer		Philips
Schüttelinkubator		New Brunswick Scientific
Spektralphotometer	DU 640	Beckmann
Über-Kopf-Schüttler	Rotamix RM1	Elmi
Ultraschallbad	Bransonic	Branson
UltraTurrax®	T 25	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
UVB-Lampe	4 Therapieröhren TL/12 à 40W	Philips
Vortexer	2x ³	UniEquip
Waagen:		
Analysenwaage	CP 124S-OCE	Satorius
Waage	PC 4400	Mettler
Zellkultur:		
Kühlschrank		AEG
Sterilbank		BDK

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Wassermantel Inkubator		Forma Scientific
Wasserbad	1083	GFL
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Plus	Millipore
Zentrifugen:		
Tischzentrifuge	54 15 D	Eppendorf
Kühlzentrifuge klein	Z233 MK	Hermle
Kühlzentrifuge groß	Rotoren: - F34-6-38 - A-4-62 (Schwingrotor)	Eppendorf

3. Methoden

3.1 Gebräuchliche DNA-Techniken

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der DNA-Isolierungs Kits von Qiagen, deren Methode auf einer modifizierten alkalischen Zellyse basiert (Birnboim and Doly, 1979). Bei der alkalischen Lyse wird das unterschiedliche Denaturierungsverhalten von Nukleinsäuren dazu genutzt, Plasmid-DNA von chromosomaler DNA zu trennen. Zur Isolierung kleiner DNA-Mengen wurde das Qiagen Miniprep Kit® und für größere Mengen das Qiagen Midiprep Kit® verwendet. Die DNA-Isolierung wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt.

3.1.2 Präparation von genomischer DNA aus Mausgewebe

Für die Genotypenbestimmung wurde von 3-4 Wochen alten Mäusen eine 0,3-0,5 cm lange Schwanzspitze verwendet.

a) für die Southernblot Analyse

Für die DNA-Analyse per Southernblot wird besonders reine DNA benötigt. Deshalb wurde die DNA für diesen Versuch durch Phenol/Chloroform-Extraktion zur besseren Abtrennung von Proteinen und anderen Zellbestandteilen isoliert. Die Mausschwanzbiopsien wurden über Nacht in 500 µl Lysepuffer mit 300 µg/ml Proteinase K bei 56 °C lysiert. Zur Kontrolle der vollständigen Lyse wurde jede Probe gevortext, bevor die Gewebereste 15 Min. bei 16 200 x g sedimentiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen und mit 250 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1; v/v/v) (Roth) vermischt. Durch Zentrifugation (15 Min.; 16 200 x g; RT) wurde eine Phasentrennung

erreicht, wobei sich die Nukleinsäuren in der oberen Phase befinden. Diese wurde vorsichtig abgenommen und zur Entfernung von Phenolrückständen mit 500 µl Chloroform versetzt, gemischt und abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reagiergefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol fällt die genomische DNA aus und konnte mit Hilfe einer gebogenen Kanüle der Lösung entnommen, in 70% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und anschließend in 100 µl HPLC-H₂O gelöst werden.

b) für die Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Mausschwanzbiopsien wurden über Nacht in 400 µl Lysepuffer mit 300 µg/ml Proteinase K bei 56°C im Schüttelwasserbad lysiert. Die vollständig lysierte Probe wurde mit 166 µl einer 6 M NaCl-Lösung versetzt und erneut für 5 Min. bei 56°C inkubiert. Die Gewebereste wurden durch Zentrifugation pelletiert (15 Min.; 16200 x g). Der Überstand wurde mit 800 µl Isopropanol vermischt, wodurch die genomische DNA ausfällt und mit Hilfe einer gebogenen Kanüle der Lösung entnommen, in 70% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und anschließend in 50 µl HPLC-H₂O gelöst werden konnte.

3.1.3 Präparation von RNA aus Mausgewebe

Diese Methode ermöglicht die Isolation der Gesamt-RNA (rRNA, tRNA, hnRNA und mRNA) aus Geweben. Bei dem verwendeten TrizolTM handelt es sich um eine homogene Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat (Chomczynski and Sacchi, 1987). TrizolTM verhindert die Degradation der RNA während der Homogenisierung des Gewebes und der Zellyse.

Die Gewebeentnahme erfolgte nach zervikaler Dislokation. Die Gewebe wurden zügig entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Gewebe erfolgte bei -80°C. Die tiefgefrorenen Gewebe wurden gewogen und noch tiefgefroren in 1 ml TrizolTM pro 100 mg Gewebe (mindestens jedoch 1 ml TrizolTM) überführt. Während weiche Gewebe mit dem Teflon-in-Glas Potter homogenisiert wurden, mussten Hautproben zunächst in

mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörsern zerkleinert werden. Zur effektiveren Zerkleinerung wurden die Homogenate 10 Mal durch eine 20G Kanüle aufgezogen. Die Abtrennung nicht homogenisierte Gewebereste erfolgte durch Zentrifugation (10 Min.; 16000 x g; 4°C). Der Überstand wurde mit 1/10 des Volumens des verwendeten TrizolsTM an BCP (1-Bromo-3-Chlorpropan) versetzt und zur vollständigen Durchmischung 30 Sek. gevortext. An eine dreiminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 15 Min. bei 16000 x g und 4°C an. Nach der Überführung der oberen, klaren, wässrigen Phase in ein neues Reagiergefäß erfolgte die Fällung der Gesamt-RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro ml verwendetem TrizolTM (30 Min.; 16000 x g und 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen. Die Resuspendierung des getrockneten Pellets (10 Min., RT) erfolgte durch Zugabe eines adäquaten Volumens (100-500 µl) DEPC-H₂O und anschließender Inkubation für 15 Min. bei 65°C, um eine vollständige Lösung des RNA-Pellets zu erreichen. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgt mit Hilfe eines Photometers bei 260 nm. Die qualitative Überprüfung der RNA erfolgte mittels RNA-Gelelektrophorese. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

(Sambrook, 1989)

Die photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 200-400$ nm zu absorbieren. Die photometrische Messung von Nukleinsäuren in Lösung erfolgt bei 260 und 280 nm gegen H₂O in einer Quarzküvette, wobei die Extinktion bei 260 nm ein Maß für die DNA bzw. RNA-Menge und der Quotient aus 260/280 ein Maß für die Reinheit ist. Bei sauberer DNA bzw. RNA (ohne Kontaminationen von Proteinen, Phenol oder Agarose) liegt dieser Wert zwischen 1,7 und 2,0. Die Konzentration von DNA bzw. RNA kann über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt werden:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A = Absorption

ε = Absorptionskoeffizient

c = Konzentration der Probe

l = Schichtdicke der Küvette [cm]

Unter diesen Bedingungen entspricht eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA oder RNA.

3.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Aufreinigung von linearisierter Plasmid-DNA, welche z.B. für die RNA-Sonden genutzt werden soll, erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion zur Entfernung von Proteinen und anderen Verunreinigungen. Dazu wurde das einfache Probenvolumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, durch Invertieren mit der Probe vermischt und 5 Min. bei 15000 x g bei RT zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bilden sich drei Phasen, wobei sich die Proteine in der unteren und in der Interphase befinden, während sich die DNA in der oberen, wässrigen Phase befindet, die in ein neues Reagiergefäß überführt wurde. Zur vollständigen Entfernung des Phenols wurde die wässrige Phase mit dem zweifachen Volumen an Chloroform versetzt, gemischt und erneut für 5 Min. bei 15000 x g bei RT zentrifugiert. Nach Abnahme der oberen Phase kann die DNA daraus durch Zugabe von Isopropanol oder durch eine saure Ethanol-fällung präzipitiert werden.

3.1.6 Saure Ethanolfällung

Mit Hilfe der sauren Ethanolfällung können Nukleinsäuren aus einer Lösung gefällt werden. Hierzu wurde 1/10 des Probenvolumens an Natriumacetat pH 4,6 und das 2,5 fache Probenvolumen an 100%igem Ethanol zur Probe gegeben. Daran schloss sich für DNA-Proben eine 10-30 minütige Inkubation bei -20°C, für RNA-Proben eine 60 minütige Inkubation bei -80°C an. Die DNA bzw. RNA wurde anschließend für 10 Min. bei 18 600 x g und 4°C pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte das Waschen des Pellets in 70%igem Ethanol (5 Min.; 18 600 x g; 4°C). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet kurz getrocknet. Das Nukleinsäurepellet wurde anschließend in einem angemessenen Volumen ddH₂O bzw. DEPC-H₂O gelöst.

3.2 Arbeiten zur Herstellung rekombinanter Plasmide

3.2.1 Spaltung von Plasmid-DNA

(Sambrook, 1989)

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen, meist Palindrome aus 4-8 Basenpaaren, und spalten in dieser Region die Phosphodiesterbindung beider DNA-Stränge. Der Restriktionsverdau dient der Herstellung von DNA-Fragmenten, die zum einen für Klonierungen und zum anderen zur Identifizierung gesuchter DNA verwendet werden können.

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg DNA des Bakteriophagen Lambda in einer Stunde zu spalten.

Für die Spaltung wurde 1µg Plasmid-DNA mit 10 U eines geeigneten Restriktionsenzym für 1 h bei vorgegebener Temperatur inkubiert. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde durch Auftrennung der Fragmente in Agarosegelen überprüft.

3.2.2 Auftrennung von DNA in Agarosegelen und Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

(Sambrook, 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen oder präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren, die sich aufgrund ihrer negativen Ladung im Gleichspannungsfeld auftrennen lassen. Das Prinzip der Elektrophorese ist, dass elektrisch geladene Teilchen durch ein komplexes Polymer (in diesem Fall Agarose) hindurchwandern und so der Größe nach aufgetrennt werden. Während sich die Laufstrecke eines Fragments umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts verhält, wird die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA durch ihr Molekulargewicht, ihre Konformation, ihre Basenzusammensetzung und durch die angelegte Spannung bestimmt. Mit Hilfe von Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert, kann unter UV-Licht bis zu 1 ng DNA nachgewiesen werden.

Die Konzentration der Agarose richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Die erforderliche Agarose-Menge wurde in 1 x TAE-Puffer gelöst (Mikrowellenherd) und nach Abkühlen auf 55°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,7 µg/ml). Die Agarose wurde in eine entsprechende Form gegossen und bei Raumtemperatur abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt, die Proben wurden mit 6x Beladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 3-4 V/cm.

Durch das Auftragen eines Molekulargewichtstandards zusätzlich zu den Proben können die bekannten Größen der Standardfragmente und deren Fluoreszenzintensität mit denen der Probe verglichen bzw. bestimmt werden. Hierfür wurden 0,5 µg λ-DNA Molekulargewichtsstandard auf ein Gel aufgetragen. Als Standard wurden λ/HindIII und λ/EcoRI/HindIII von Fermentas verwendet.

Durch Anwendung dieser Methode kann neben der Konzentrationsabschätzung eine Kontrolle der Qualität der Nukleinsäuren erfolgen.

3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Isolierung aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gelextraction Kit® (Qiagen) und wurde wie vom Hersteller vorgegeben durchgeführt.

3.2.4 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird mRNA in cDNA umgeschrieben. In dieser Arbeit wurde dafür das QuantiTect® Reverse Transcriptase Kit von Qiagen und Oligo (dT)-Primer verwendet. In einem ersten Schritt erfolgte die Entfernung von eventuell vorhandener genomischer DNA aus den RNA-Proben durch Inkubation des folgenden Ansatzes für 2 Min. bei 42 °C:

10 pg - 1 µg	RNA
2 µl	gDNA Wipeout Buffer (7x)
ad 14 µl	DEPC-H ₂ O

Nach der Abkühlung der Ansätze auf Eis, wurden je 6 µl einer Stammlösung zu den RNA-Proben gegeben, der sich wie folgt zusammensetzt:

4 µl	Quantiscript RT Puffer (5x)
1 µl	Quantiscript Reverse Transcriptase
1 µl	RT Primer Mix

Diese Ansätze wurden für 15 Min. bei 42 °C inkubiert, anschließend erfolgte die Erhitzung auf 95 °C für 3 Min., um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt eine leistungsfähige Technik zur automatischen Amplifizierung von DNA-Fragmenten dar.

Über spezifische Oligonukleotid-Primer, welche das zu amplifizierende Fragment flankieren, können mit einer thermostabilen DNA-Polymerase DNA-Fragmente amplifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde für die PCR das RedTaq Ready Mix Kit® von Sigma verwendet. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

10 µl	Red Taq Ready Mix
2 µl	Primer 1 (5 pmol/(µl))
2 µl	Primer 2 (5 pmol/(µl))
x µl	Template
ad 20 µl	PCR-H ₂ O

Die Temperatur für die Primer-Anlagerung hängt von deren Schmelztemperatur und damit von der Länge und Basenzusammensetzung der jeweiligen Primer ab. Die Schmelztemperatur kann über folgende Formel abgeschätzt werden:

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

Die Temperatur für die Primeranlagerung sollte ca. 5-10°C unter der Schmelztemperatur liegen.

Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung wurden in der Regel 25-35 Mal durchgeführt. Die Zeiten und die Temperaturen dieser Schritte können je nach Anwendung modifiziert werden, um optimale Bedingungen zu schaffen und optimale Ausbeuten zu erreichen.

3.2.5 Ligation von DNA-Molekülen

Mittels Ligation kann die durch einen Restriktionsspaltung linearisierte Plasmid-DNA mit einem anderen DNA-Fragment (Insert) verknüpft werden, so dass rekombinante Plasmide entstehen. Ligasen katalysieren die Bildung von

Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphat-Ende des einen und der 3'-OH-Gruppe des anderen DNA-Fragmentes. Die Bildung von Phosphodiesterbindungen erfolgt unter Hydrolyse von ATP. Die Ligation von zwei Fragmenten kann sowohl bei überhängenden Enden als auch bei nicht-überhängenden Enden erfolgen.

In dieser Arbeit wurde für die Ligation von DNA-Fragmenten die T4 DNA-Ligase von Fermentas verwendet. Für eine Ligation wurden äquimolare Mengen der Vektor- und Insert-DNA eingesetzt, deren Menge sich wie folgt berechnen lässt:

$$X \text{ ng Insert} = \frac{(Y \text{ bp Insert}) \cdot (50 \text{ ng Vektor})}{\text{Anzahl der bp des Vektors}}$$

Dem Reaktionsansatz wurde 1 Weiss-Einheit T4 DNA-Ligase zugegeben, bevor dieser für 1 h bei RT inkubiert wurde. Ein solcher Ansatz kann für die Transformation eingesetzt werden.

3.3 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Transformation beschreibt einen Prozess, bei dem Bakterien Plasmid-DNA aus der umgebenden Lösung aufnehmen. Im Gegensatz zu linearer DNA muss Plasmid-DNA für die Replikation nicht in das Bakterienchromosom integrieren, sondern kann als eigenständiges Plasmid verdoppelt und von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. Zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien trägt das Plasmid ein Gen, das dem Bakterium eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum, z.B. Ampicillin, vermittelt. Die Transformation chemisch kompetenter Bakterien wurde wie beschrieben von Sambrook (Sambrook, 1989) durchgeführt.

3.4 PCR-Kolonie-Screening

Mittels PCR-Kolonie-Screening können Klone, die die gewünschte Plasmid-DNA enthalten, per PCR identifiziert und anschließend kultiviert werden.

Mit einer Pipettenspitze wurde ein Klon isoliert und ein PCR-Ansatz einmal hoch- und runterpipettiert. Die Spitze wurde anschließend in 0,5 ml LB-Medium abgeworfen, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt.

Das Ergebnis der PCR wurde auf einem Agarosegel überprüft. Mit denen als positiv identifizierten Ansätzen wurde eine Mini-Plasmid-DNA Präparation durchgeführt.

3.5 Zyklische Sequenzierung

(Sanger et al., 1974)

Das Prinzip der zyklischen Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode. Einem normalen PCR-Ansatz wird für die zyklische Sequenzierung nur ein Primer zugesetzt, aber zusätzlich zu den normalen dNTPs noch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleotide, deren Einbau zum Kettenabbruch führen. Dadurch entstehen PCR-Fragmente, die sich in der Länge um jeweils eine Base unterscheiden und die am Ende farblich markierte Didesoxynukleotide tragen. Dies ermöglicht die Identifizierung der Basenfolge von DNA-Fragmenten. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC durchgeführt.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Kultivierung von Zellkulturzellen

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt in einer wassergesättigten Atmosphäre in Zellkulturschalen. Sämtliche Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen und es wurden ausschließlich hitzesterilisierte Materialien oder Einmalplastikmaterialien verwendet.

3.6.2 Teilen von Zellkulturzellen

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden einmal vorsichtig mit sterilem PBS gewaschen, um die Reste des Mediums zu entfernen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml 0,25%iger Trypsin-Lösung pro 10 cm Schale und 3-5 minütiger Inkubation bei 37°C. Zellkulturzellen sollen so kurz wie möglich mit Trypsin inkubiert werden, weshalb die Ablösung der Zellen mit dem Mikroskop kontrolliert werden musste. Die Zugabe von FCS-haltigem Medium führte zum Stopp der Trypsinierung. Die abgelösten Zellen wurden durch Zentrifugation (5 Min.; 600 x g; RT) sedimentiert und in 9 ml Medium durch mehrmaliges Hoch- und Runterpipettieren vereinzelt und resuspendiert. Auf neuen Kulturschalen wurden die Zellen (je nach Zelltyp) 1:3, 1:5, 1:10, oder 1:20 in frischem Medium verdünnt.

3.6.3 Zählen von Zellkulturzellen

10 µl einer Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. 2 x 16 Quadrate wurden ausgezählt. Die bestimmte Anzahl wurde durch 2 geteilt und mit 10 multipliziert, woraus sich die Zellzahl pro µl ergibt.

3.6.4 Isolierung von Melanozyten

Die Melanozyten machen neben den Keratinozyten einen relativ kleinen Teil der Zellen der Epidermis aus. Trotzdem wurden zunächst alle Zellen der Epidermis isoliert, so dass die Keratinozyten drei Tage nach der Isolierung eine nahezu konfluente Zellschicht bildeten, auf der die Melanozyten wuchsen. Durch Inkubation der Zellen mit Trypsin für 1-2 Min. lösen sich nur die Melanozyten, die so von den Keratinozyten getrennt werden konnten.

Für die Isolierung von Melanozyten wurden 1-3 Tage alte Jungtiere verwendet, die zunächst dekapitiert und bis zur Durchführung der weiteren Schritte an der Sterilbank in einem 50 ml Röhrchen auf Eis gelagert wurden. Hier wurde jedes Jungtier zunächst durch Inkubation in folgenden Lösungen desinfiziert:

50% Betaisodona/50% PBS	1 Min.
1x PBS	1 Min. waschen
70% Ethanol	1 Min.
1xPBS	1 Min. waschen

Anschließend wurden der Schwanz (für die Genotypenbestimmung) sowie die Gliedmaßen entfernt. Die Haut wurde an einer Seite entlang aufgeschnitten, so dass diese in einem Stück entfernt werden konnte. Dieses wurde in ein 2 ml Reagiergefäß mit 1,5 ml einer 5 mg/ml Dispasell-Lösung überführt und über Nacht leicht schüttelnd bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Epidermis von der Dermis getrennt, bevor die Epidermis mit dem Stratum corneum nach obenweisend in die Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgebreitet wurde. 1 ml einer Trypsin-Lösung (0,025% Trypsin in 0,02% EDTA/PBS) wurde so unter die Epidermis gegeben, dass diese schwimmend für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert werden konnte. Danach wurde die Epidermis gewendet und mit einem kleinen sterilen Spatel vorsichtig abgeschabt, so dass sich die Zellen lösen, das Stratum corneum aber intakt bleibt. Die Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen und für 5 Min. bei 600 x g sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium aufgenommen und auf eine 10 cm Zellkulturschale ausgeteilt.

3-4 Tage nach der Isolation wurde das Medium von den Zellen abgenommen, bevor diese sorgfältig mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 1-2 Min. bei 37°C trypsinisiert wurden (0,25% Trypsin). Die durch die kurze Trypsinierung

abgelösten Melanozyten wurden mit etwas Medium von den Keratinozyten gespült, in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 Min. bei 600 x g pelletiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml des Melanozytenmediums resuspendiert und in die Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgeteilt.

3.7 Herstellung von Gewebelysaten

Die nach der Gewebeentnahme bei -80 °C gelagerten Gewebe wurden zunächst gewogen, bevor diese in Lysispuffer (500 µl Lysispuffer pro 100 mg Gewebe) aufgenommen und in einem Glas-in-Teflon Homogenisator bzw. per UltraTurrax® homogenisiert wurden. Daran schloss sich eine 20 minütige Inkubation der Lysate auf Eis an, bevor diese für 3x 15 Sek. im Ultraschallbad geschallt wurden. Dazwischen wurden die Lysate für 30 Sek. auf Eis abgekühlt, um eine zu starke Erwärmung der Lysate zu verhindern. Die Entfernung von Gewebereste erfolgte durch Zentrifugation (20 Min.; 18000 x g; 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.8 Proteinbestimmung

(Lowry et al., 1951)

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des BioRad DC Assay Systems, das auf dem Lowry-Protokoll basiert.

Zur Erstellung einer Standardgeraden wurden folgende Verdünnungen einer BSA- oder IgG-Lösung hergestellt: 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml.

5 µl der Standards und der 5 µl der Proben wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Alle Werte wurden als Dreifachwerte bestimmt. Pro Milliliter Lösung A wurden 20 µl Lösung S zugegeben. Von dieser Lösung A' wurden 25 µl zu jeder Probe gegeben und mit 200 µl Lösung B vermischt. Daran schloss sich eine 15 minütige Inkubation bei RT an, bevor die Werte in

einem Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750 \text{ nm}$ gemessen wurden.

3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Westernblots

3.9.1 SDS-Page

(Laemmli, 1970)

Kleine Gele hatten eine Dicke von 0,75 mm, während für große Gele die Dicke 1,50 mm betrug. Das Trenngelvolumen für kleine Gele betrug 5 ml, das des Sammelgels 1 ml, während für große Gele 30 ml Trenngel und 10 ml Sammelgel benötigt wurden.

Die verwendeten SDS-Gele setzen sich wie folgt zusammen:

Gelvolumen	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
	1 ml	5 ml
H ₂ O	0,604 ml	2,400 ml
40 % Acrylamid	0,125 ml	1,250 ml
Tris HCl pH 6,8	0,250 ml	/
Tris HCl pH 8,8	/	1,250 ml
10 % SDS	0,010 ml	0,050 ml
10 % APS	0,010 ml	0,050 ml
Temed	0,001 ml	0,010 ml

Die mit der entsprechenden Menge an 4x Probenpuffer versetzten Proben wurden zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (Prestained Page Ruler von Fermentas) in die Taschen der Gele aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in kleinen Gelen bei einer Spannung von 80 V-120 V. Proteine in großen Gelen wurden über Nacht bei 15 mA und 16°C elektrophoretisch aufgetrennt.

3.9.2 Westernblot nach dem Semi Dry Verfahren

Unter dem Begriff Westernblot versteht man den Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Membran, die meist aus Nitrozellulose besteht. Der Westernblot ermöglicht eine Identifizierung spezifischer Proteine aus einem Proteingemisch mittels entsprechender Antikörper.

Pro Gel wurden 12 Lagen Whatman-Papier und ein Stück Nitrozellulose-Membran auf die Größe des zu blottenden Gels zugeschnitten und in Blottpuffer angefeuchtet. Danach erfolgte der Aufbau des Blots. Sechs Lagen Whatman-Papier wurden auf die Anode gelegt, gefolgt von der angefeuchteten Nitrozellulose-Membran, dem zu blottenden Gel und den verbleibenden sechs Lagen Whatman-Papier. Bei dem Aufbau des Blots wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen befanden. Mit dem Auflegen des Deckels der Apparatur (die Kathode) war der Aufbau abgeschlossen und der Transfer der Proteine aus dem Gel erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro Quadratcentimeter Gelfläche für 90-120 Min. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation mit der Blocklösung (5% Magermilch in 1x TBS) für 30-60 Min. bei RT unter Schütteln geblockt. An die Blockierung schlossen sich Waschschrte (dreimal fünf Min.) mit TBS/Tween (TBS/T) an, bevor die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte. Der Primärantikörper wurde in einer 1:10 mit TBS/T verdünnten Blocklösung angesetzt. Daran schloss sich eine 60 minütige Inkubation der Membran bei RT in dieser Lösung unter Schütteln an. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Min. mit TBS/T gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde, wie für den Primärantikörper beschrieben, verdünnt und die Inkubation der Membran erfolgte ebenfalls für 60 Min. bei RT auf dem Schüttler. Danach wurde wieder dreimal für fünf Min. mit TBS/T gewaschen.

Die Detektion des Signals erfolgte über das System der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) und wurde nach Angaben des Herstellers (Pierce) durchgeführt.

3.10 Genotypenbestimmung

3.10.1 PCR zum Nachweis der Integration des Tyrosinase-HDGFGen Konstruktes in das Mausgenom

Als Ausgangsmaterial für die Genotypenbestimmung diente die aus Mausschwanzbiopsien isolierte genomische DNA (siehe 3.1.2 b). Die Unterscheidung zwischen der DNA des Tyrosinase-HDGFGen Konstruktes und der des Wildtyp-HDGFs erfolgte mit Hilfe des Primers HDGF-Konstrukt sense (1879) (Abbildung 4.1). Dieser ist komplementär zu einem Bereich des Konstruktes direkt vor dem Anfang des HDGF-Gens, der ursprünglich von dem pBlueskript-Vektor stammt. Aus diesem Grund kann die Genotypenbestimmung dieser Mäuse mit diesem Primer und dem Primer HDGFwt-antisense (1815) nach folgendem Ansatz und Programm erfolgen:

PCR-Ansatz = 20 μ l		Temperatur	Zeit	Zyklen
0,3 μ l (~100 ng)	DNA	95 °C	3 Min.	1
2 μ l	Primer 1879	95 °C	30 Sek.	} 35
2 μ l	Primer 1815	53 °C	30 Sek.	
5,7 μ l	dd H ₂ O	72 °C	1 Min.	
10 μ l	RedTaq Ready Mix ®	72 °C	5 Min.	1
		4 °C	∞	

3.10.2 Genotypenbestimmung von HDGF^{-/-}-Mäusen

Der Genotyp der HDGF^{-/-} Mäuse wurde mit den Primern HDGFwt-sense (1814), HDGFwt-antisense (1815) und HDGFtg-antisense (1816) bestimmt. Aus der Reaktion entstehen zwei Amplifikate mit einer Größe von 554 bp für das Wildtyp-Allel und 835 bp für das Knock-out-Allel (Gallitzendoerfer et al., 2008). Die PCR-Ansätze und das dazugehörige Programm setzen sich wie folgt zusammen:

PCR-Ansatz = 20 μ l		Temperatur	Zeit	Zyklen
0,3 μ l (~100 ng)	DNA	95 °C	3 Min.	1
2 μ l	Primer 1814	95 °C	30 Sek.	} 35
2 μ l	Primer 1815	59 °C	30 Sek.	
2 μ l	Primer 1816	72 °C	1 Min.	
3,7 μ l	dd H ₂ O	72 °C	5 Min.	1
10 μ l	RedTaq Ready Mix ®	4 °C	∞	

3.10.3 PCR-Genotypenbestimmung von *Ink4a*^{-/-}-Mäusen

Die Genotypenbestimmung der *INK4a*^{-/-} Mäuse erfolgte mit einer Kombination aus vier Primern:

- mp16,1 (2596)
- mp16,2 (2597)
- 5'NEO (2598)
- 3'NEO (2599)

Diese Reaktion führt zur Amplifizierung von zwei Fragmenten, wobei das Wildtyp-Fragment 236 bp groß ist, während die Bande für das Knock-out Allel eine Größe von 510 bp hat (Serrano et al., 1996). Die PCR-Ansätze und das dazugehörige Programm setzen sich wie folgt zusammen:

PCR-Ansatz = 20 μ l		Temperatur	Zeit	Zyklen
0,3 μ l (~100 ng)	DNA	95 °C	3 Min.	1
2 μ l	Primer 2596	95 °C	30 Sek.	} 35
2 μ l	Primer 2597	56 °C	30 Sek.	
2 μ l	Primer 2598	72 °C	1 Min.	
2 μ l	Primer 2599	72 °C	5 Min.	1
1,7 μ l	dd H ₂ O	4 °C	∞	
10 μ l	RedTaq Ready Mix ®			

3.10.4 Southernblot-Analyse

Die Southernblot-Analyse ermöglicht den Nachweis einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden (Southern, 1975).

Zunächst erfolgte die Inkubation von 10 µg der isolierten genomischen DNA (siehe 3.1.2 Präparation von genomischer DNA aus Mausgewebe) mit 20 Units eines geeigneten Restriktionsenzymes, in diesem Fall BglIII und HindIII, über Nacht. Nach Zugabe von 6x Ladepuffer wurden 60 µl des Ansatzes auf ein 0,8%iges Agarosegel ohne Ethidiumbromid und der Überschuss auf ein Kontrollgel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte zusammen mit dem Standard λHind III bei einer Spannung von 60 V und wurde mit einem Fluoreszenzlineal als Größenmaßstab mittels eines UV-Transilluminators dokumentiert.

Das Gel wurde als nächstes für 10 Min. in einer 0,25 M HCl Lösung inkubiert, was zur Depurinierung der DNA führt und den Transfer großer DNA-Moleküle (> 15 kb) erleichtert. Nach der Entfernung der Lösung wurde das Gel kurz in ddH₂O gewaschen, woran sich eine 20 minütige Inkubation des Gels in einer Lösung aus 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl anschloss. In diesem Schritt erfolgte die Denaturierung, um Einzelstrang-DNA zu erhalten. Nach der Neutralisierung in 20x SSC, erfolgte der Transfer aus dem Agarosegel auf ein Stück Nylonmembran Hybond-N⁺. Hierfür wurde ein Kapillarblot, wie in Abbildung 8 dargestellt, aufgebaut. Die treibende Kraft ist hierbei ein Flüssigkeitsstrom, der die DNA aus dem Gel zieht, die daraufhin in den Maschen der Membran hängen bleibt.

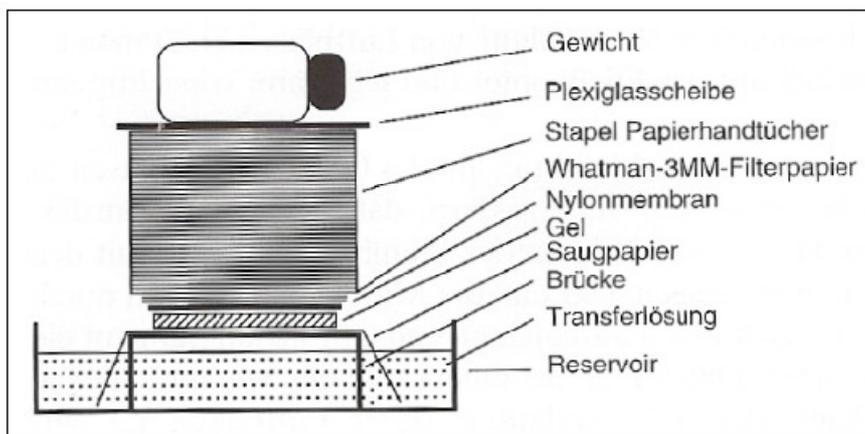


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Kapillarblots.

In dieser Abbildung ist der Aufbau eines Kapillarblots dargestellt. Modifiziert nach Darling (Darling, 1996).

Nach 18-20 h wurde der Blot abgebaut, die Membran in 5x SSC äquilibriert und bei RT für 30 Min. getrocknet, bevor die Kreuzvernetzung der DNA auf der Membran durch Inkubation für 2 h bei 80 °C erfolgte.

Vor der Prähybridisierung wurde die Membran zunächst mit ddH₂O befeuchtet und anschließend in 5x SSC äquilibriert. Die Prähybridisierung erfolgte durch Inkubation der Membran in Hybridisierungspuffer (FBI-Puffer; 0,125 ml pro cm²) in einem Hybridisierungsröhrchen im Drehinkubator für zwei Stunden bei 65°C. In der Zwischenzeit erfolgte die Herstellung der radioaktiven Sonde. Die hier verwendete Sonde ging durch Restriktionsspaltung mit dem Enzym NheI aus dem Plasmid HDGFGenpBSK (SF-205) hervor. Die Aufreinigung und Quantifizierung erfolgte über ein Agarosegel. Für die Markierung der Sonde wurde das Megaprime-DNA labeling Kit® der Firma Amersham verwendet. Das Verfahren beruht darauf, dass hexamere Primer zufälliger Sequenzen mit der Sonden-DNA hybridisieren und anschließend vom Klenow-Fragment in Anwesenheit von [³²P]-dCTP verlängert werden. 25 ng der Sonden-DNA wurden mit ddH₂O auf ein Volumen von 28 µl aufgefüllt, mit 5 µl der hexameren Primern versetzt und bei 95°C für 5 Min. erhitzt. Nachdem der Ansatz abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von 10 µl Markierungspuffer, der nicht radioaktives dATP, dGTP und dTTP enthielt, bevor im Isotopenlabor das radioaktive [³²P]-dCTP und 2 µl der Klenow-Polymerase dazugegeben wurden. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Abtrennung freier, radioaktiver Nukleotide über eine ProbeQuant™ G-50 Säule (Amersham) mittels Zentrifugation (2 Min.; 3000 x g; RT). Zur Bestimmung der Rate des radioaktiven Einbaus wurden vor und nach der Aufreinigung je 2 µl entnommen und im Szintillationszähler vermessen.

Nach der Denaturierung der Sonde (5 Min. bei 95°C), wurden 1x10⁶ Counts pro Minute (cpm) der radioaktiv markierten Sonde pro cm² Membran in die Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 65°C im Drehinkubator hybridisiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der Membran in ein geeignetes Gefäß, worin zwei Waschschrte (25 Min. bei RT) mit 2x SSC + 0,1 % SDS erfolgten. Als nächstes wurde die Membran bei ca. 55°C im Wasserbad so lange gewaschen bis die radioaktive Strahlung auf eine Stärke von 100-200 cpm reduziert war. Nahm die Strahlung bei dieser Temperatur nicht ausreichend ab, erfolgte die schrittweise Erhöhung der Temperatur des Wasserbades.

Die Detektion erfolgte in einer lichtdichten Kassette, in die zunächst ein Röntgenfilm, dann die eingeschweißte Membran und darauf ein Phosphor-Imager-Screen gelegt wurde. Die Exposition erfolgte für mindestens 24 Stunden.

3.11 Anfertigung von Gewebeschnitten

3.11.1 Kryoschnitte

Für histologische und Immunfluoreszenz-Analysen werden je nach Fragestellung Kryo- oder Paraffinschnitte benötigt.

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden die präparierten Gewebe direkt nach der Entnahme in TissueTek® auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Vor dem Schneiden der Gewebe mit Hilfe des Kryostaten von Leica wurden die Präparate in dessen Kühlkammer auf -20 °C erwärmt. Anschließend können bei einer Umgebungstemperatur von -20 °C und einer Objekttemperatur von -16 °C bis -30 °C Gewebeschnitte angefertigt werden. Das Trimmen des Gewebes erfolgte mit einer Schnittdicke von 30 µm, während die Schnittdicke der Gefrierschnitte bei 10-12 µm lag. Die Schnitte wurden auf Superfrost®Plus Objektträger aufgezogen, für ca. 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und sofern nicht direkt weiter verarbeitet, bei -80 °C gelagert.

3.11.2 Paraffinschnitte

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die entnommenen Gewebeproben über Nacht bei 4 °C in 4% PFA/10% Sucrose/PBS fixiert. Nach dem Entfernen der Fixierlösung durch dreimaliges waschen der Gewebe mit PBS, konnten diese zum Entwässern in den Gewebeentwässerungsautomaten gegeben werden. Die Maschine führt automatisch folgende Schritte aus:

70 % Ethanol	60 Min.
70 % Ethanol	60 Min.
96 % Ethanol	60 Min.
96 % Ethanol	60 Min.
100 % Ethanol	60 Min.
100 % Ethanol	60 Min.
100 % Ethanol	60 Min.
Xylol	60 Min.
Xylol	60 Min.
Paraffin	45 Min.

Am nächsten Morgen wurden die entwässerten Gewebe in kleinen Formen in Paraffinblöcke gegossen. Nach ca. 30 Min. auf einer Kühlplatte waren die Blöcke ausgehärtet und konnten direkt weiterverarbeitet oder bei RT gelagert werden.

Die auf einer Kühlplatte vorgekühlten Paraffinblöcke wurden zunächst am Mikrotom mit einer Schnittdicke von 15 µm getrimmt und anschließend mit einer Schnittdicke von 4-6 µm geschnitten. Die Überführung der Schnitte in ein 42°C warmes Wasserbad erfolgte mit Hilfe von feinen Pinseln. Aus diesem konnten die Schnitte auf Superfrost®Plus Objektträger aufgezogen werden. Die Trocknung der Schnitte erfolgte bei 37°C für mindestens 3 h, bevor sie weiterverarbeitet werden konnten. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei 4°C.

3.12 Histochemische Färbungen und Nachweise

3.12.1 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin- -Färbung ist eine Routinefärbung zur Darstellung des Gewebes für histologische Untersuchungen, wobei die Zellkerne durch das Hämatoxylin dunkelblau/violett und das Zytoplasma durch das Eosin pink gefärbt werden. Interzelluläre Strukturen werden ebenfalls angefärbt, so erscheinen z.B. Fasern in pink oder Knorpel in violett (Bancroft, 1994).

Für die HE-Färbung wurden Paraffinschnitte durch Inkubation in Xylol (2x 10 Min.) und in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 70% und

50%) in Wasser überführt. Kryoschnitte wurden aufgetaut und direkt verwendet. Für die HE-Färbung wurden die Schnitte mehrmals über 15 Sek. in eine Hämalaun-Lösung eingetaucht und anschließend in warmem Leitungswasser gebläut, bis die überschüssige Farbe entfernt war. Die Eosin-Färbung erfolgte durch Inkubation der Schnitte für 30-60 Sek. in einer 1%igen Lösung. Daran schloss sich die Entfernung überschüssiger Farblösung durch mehrmaliges Eintauchen in ddH₂O an. Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol überführt. Zum Schluss erfolgte das Einbetten der Schnitte in DPX-Mounting Medium®.

3.12.2 DOPA-Färbung

Die DOPA-Färbung dient dem Nachweis von Melanozyten und beruht darauf, dass α -3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) von dem Melanozyten-spezifischen Protein Tyrosinase als Substrat für die Pigmentbiosynthese verwendet werden kann. Die Inkubation von Zellen oder Schnitten mit 0,1% DOPA/PBS Lösung für 3 h bei 37°C führt daher zu einer dunkelbraun/schwarzen Färbung der Melanozyten. Die Färbelösung wurde durch Waschen mit 1x PBS entfernt. Bevor die Präparate in DPX-Mounting Medium® eingebettet werden konnten, erfolgte die Gegenfärbung der Präparate mit Eosin und die Entwässerung durch Eintauchen in eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylol.

3.12.3 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen von Paraffinschnitten wurden diese durch Inkubation in folgenden Lösungen entparaffiniert:

Xylol	2 x 10 Min.
100% Ethanol	2 x 10 Min.
96% Ethanol	2 x 5 Min.
70% Ethanol	1 x 5 Min.
50% Ethanol	1 x 5 Min.
ddH ₂ O	kurz

Nachdem die Schnitte für 5 Min. in 1x TBS gewaschen wurden, folgte die Deaktivierung der endogenen Peroxidasen durch 10 minütige Inkubation in 1% H₂O₂. An die Entfernung dieser Lösung schloss sich zunächst ein Waschschrift an (5 Min. mit 1x TBS), bevor die Permeabilisierung der Präparate durch Inkubation in 0,5% TX-100/TBS erfolgte. Die Schnitte wurden anschließend für 5 Min. mit 1x TBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Blocken zur Vermeidung unspezifischer Signale durch Inkubation der Schnitte in 2% BSA/TBS für 30 Min. Nach dem Entfernen der Blocklösung wurden die Schnitte 5 Min. mit 1x TBS gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper, verdünnt in Blocklösung, über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Schnitte für 5 Min. in 1x TBS entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x TBS folgte die Inkubation mit der ABC-Lösung für 1 h bei RT. Die Visualisierung der Färbung erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer DAB-Lösung (0,03% H₂O₂ in 0,05% DAB/PBS). Die Farbentwicklung wurde mit Hilfe eines Mikroskops beobachtet und bei ausreichender Intensität durch Waschen mit ddH₂O gestoppt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt und wie folgt entwässert:

70% Ethanol	30 Sek.
96% Ethanol	30 Sek.
96% Ethanol	30 Sek.
100% Ethanol	30 Sek.
100% Ethanol	30 Sek.
Xylol	30 Sek.
Xylol	30 Sek.

Nach der Entwässerung wurden die Schnitte in DPX Mounting Medium® fixiert.

3.12.4 Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten

Paraffinschnitte wurden wie unter 3.12.1 beschrieben entparaffiniert, während Kryoschnitte aufgetaut und für 10 Min. in Formalin (Methanolfrei) bei RT fixiert wurden. Daran schloss sich die Permeabilisierung der Schnitte in 0,5% TX-100

in TBS (5 Min.) und die Entfernung der Lösung durch Waschen mit 1x TBS an (dreimal 5 Min.) Anschließend erfolgte das Blocken zur Vermeidung unspezifischer Signale durch Inkubation der Schnitte in 2% BSA/TBS für 30 Min. Nach dem Entfernen der Blocklösung wurden die Schnitte 5 Min. mit 1x TBS gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper, verdünnt in Blocklösung, über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Entfernen von überschüssigen Primärantikörpern wurden die Schnitte dreimal für 5 Min. in 1x TBS gewaschen, bevor die Schnitte für 1 h bei RT mit dem in Blocklösung verdünnten sekundären Fluoreszenzantikörper inkubiert wurden. Dieser Lösung wurde der Kernfarbstoff DAPI zugesetzt. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in 1x TBS erfolgte ein letzter Waschschriff mit ddH₂O, bevor die Einbettung der Schnitte in Mowiol erfolgte.

3.12.5 Bleichen von pigmentiertem Gewebe

Die Pigmentierung von Geweben, wie Haut, Auge oder Tumoren, kann sowohl Expressionsanalysen durch Überlagerung der Fluoreszenzfärbung, als auch die pathologische Begutachtung von Tumoren durch Überlagerung der HE-Färbung beeinträchtigen. Aus diesem Grund wurden, wenn nötig, Schnitte vor der jeweiligen Färbung gebleicht. Das Bleichen von Kryoschnitten erfolgte nach der Fixierung mit Formalin, während das Bleichen von Paraffinschnitten sich an die Antigendemaskierung anschloss. Die Schnitte wurden je nach Stärke der Pigmentierung für 15-120 Min. in einer Lösung aus Benzylalkohol (5 ml), Aceton (2,5 ml), 10% H₂O₂ (1,5 ml) und 25%iger Ammonium Lösung (1 Tropfen) bei 37°C inkubiert. Der Bleichvorgang wurde mehrmals kontrolliert um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Sobald das Pigment ausreichend gebleicht war, erfolgte die Entfernung der Bleichlösung durch mehrmaliges Waschen in 1x PBS. Die Schnitte wurden anschließend entsprechend gefärbt.

3.12.6 *In Situ* Hybridisierung (ISH)

Die Technik der *in situ* Hybridisierung (ISH) erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (DNA, RNA) an histologischen Gewebepräparaten und ermöglicht es, die Lokalisation von Nukleinsäuren in Bezug zur Gewebemorphologie zu analysieren. Hierbei werden einzelsträngige Nukleinsäuren, die eine komplementäre Sequenz zur Ziel-DNA oder -RNA aufweisen und mit einer Markierung, in diesem Fall Digoxigenin, versehen wurden, als Sonden eingesetzt. Für die Detektion von RNA ist es essentiell, dass alle Lösungen RNase frei sind.

a) Herstellung, Testen und Quantifizierung der RNA-Sonden

Für die Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden wurde das Dig-RNA Labeling Kit® von Roche verwendet. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

1 µg	linearisierte Plasmid-DNA
2 µl	Dig RNA Labelling Mix
2 µl	10x Transkriptionspuffer
2 µl	T7 RNA Polymerase (20 U/µl)
ad 20 µl	DEPC-H ₂ O

Die Ansätze wurden für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Degradierung der unmarkierten Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 2 µl DNase I (RNase frei; 10 U/µl) und Inkubation für 15 Min. bei 37°C. Bevor die Sonden eingesetzt werden konnten, wurden diese durch eine Na-Acetat/Ethanol Fällung von den Proteinen der Reaktion befreit. Die Lagerung der Sonden erfolgt bei -80°C.

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz wurde ein Dot-Blot durchgeführt. Auf ein Stück Hybond™-N+ Nylonmembran wurde folgende Verdünnungsreihe der hergestellten Sonden und einer bekannten funktionsfähigen Sonde aufgetragen: unverdünnt, 1:20, 1:200, 1:2000, 1:20000, 1:200000. Die Fixierung der RNA erfolgte durch Erhitzen der Membran für 30 Min. bei 120°C, bevor die Detektion der Digoxigenin-RNA-Sonden wie folgt durchgeführt wurde:

1 Min.	Waschpuffer
60 Min.	Blocklösung
30 Min.	Anti-Digoxigenin-Ak 1:10 000 verdünnt in Blocklösung
2x 15 Min.	Waschpuffer
2 Min.	Entwicklungspuffer
3 h	NBT/BCIP 1:50 verdünnt in Entwicklungspuffer
5 Min.	Entwicklungspuffer

Daran schloss sich die Trocknung und Dokumentation des Ergebnisses an.

b) In Situ Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, so dass zunächst die Entparaffinierung der Präparate erfolgte:

Xylol	10 Min.
Xylol	10 Min.
Xylol	10 Min.
100% Propanol	5 Min.
100% Propanol	5 Min.
100% Propanol	5 Min.
96% Propanol	5 Min.
90% Propanol	5 Min.
75% Propanol	5 Min.
50% Propanol	2 Min.
1x PBS (DEPC)	5 Min.

An die Entparaffinierung schließen sich Fixierung, Permeabilisierung, sowie die Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung an:

4% Paraformaldehyd	90 Min.	RT
1x PBS	5 Min.	RT
1x PBS	5 Min.	RT
10 µg/ml Proteinase K (in PBS)	4 Min.	RT
1x PBS	5 Min.	RT
1x PBS	5 Min.	RT
0,25% TX-100 (in PBS)	4 Min.	RT
1x PBS	5 Min.	RT
0,2 M HCl (in DEPC-H ₂ O)	8 Min.	RT
0,1 M TEA-Puffer	10 Min.	RT
2x SSC	10 Min.	50 °C

Während der Inkubationsschritte erfolgte die Vorbereitung der Sonden. Zunächst wurde eine Sondenvorverdünnung angesetzt, indem 0,2 µl einer RNA-Sonde in 19,8 µl 1x SSC Puffer verdünnt wurde. Anschließend erfolgte die

Zugabe von je 4 µl 4 M DTT und 176 µl Hybridisierungslösung, bevor die fertige Sondenverdünnung für 5 Min. bei 80°C erhitzt wurde. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt waren, erfolgte die Abgrenzung der Gewebeschnitte durch Plastikrahmen, so dass die darauf pipettierte Sondenverdünnung die Schnitte vollständig bedeckte und nicht verfloss. Die Schnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 70°C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Entfernung der Sondenverdünnung durch folgende Waschschritte:

2x SSC	60°C	5 Min.
2x SSC	60°C	30 Min.
50% Formamid/50% 1x SSC	60°C	20 Min.
0,1x SSC	70°C	45 Min.

Nachdem die Schnitte für 5 Min. in Maleinsäurepuffer (MAB) äquilibriert wurden, erfolgte ein Blockschritt mit einer 2%igen Blocklösung für 60 Min. bei RT. Daran schloss sich die Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper (1:5000 in MAB) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C an.

Nicht gebundener Antikörper wurde durch fünf maliges Waschen der Schnitte mit MAB für je 1 h entfernt. Vor der Entwicklung erfolgte die Äquilibrierung der Schnitte für 5 Min. in Entwicklungspuffer. Die Entwicklung erstreckte sich nach Zugabe von BM Purple® inklusive 2 mM Levamisol über 7-10 Tage. Bei einer ausreichenden Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Waschen in ddH₂O gestoppt, bevor die Einbettung der Schnitte in Mowiol erfolgte.

3.13 Tierexperimentelle Arbeiten

3.13.1 Allgemeine Haltung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes und sind durch das Regierungspräsidium Köln (Genehmigungsnummer: 8.87-50.10.31.09.024) genehmigt worden. Die Mäuse wurden in geschlossenen Käfigsystemen (Filter

Tops) bei einem konstanten Licht-Dunkel Rhythmus von 12/12 Stunden mit Wasser und Futter *ad libitum* gehalten.

Zur Organentnahme wurden adulte Tiere zunächst mit Diethylether betäubt und daraufhin durch zervikale Dislokation getötet. Alle unter zwei Wochen alte Tiere wurden durch Dekapitierung getötet.

3.13.2 Bestrahlung der Mäuse mit UVB-Licht

Die Behandlung von Mäusen der Genotypen HDGF^{Tyr}/INK4a^{+/-}, Ink4a^{+/-}, HDGF^{-/-}/INK4a^{+/-}, HDGF^{Tyr} und HDGF^{-/-} mit einer einmaligen UVB Dosis von 6,14 kJ/m² UVB erfolgte zur Induktion von Melanomen in einem Alter von 1-3 Tagen. Die hierfür verwendete Lampe verfügt über vier TL/12 UVB-Therapieröhren (Philips). Die Mäuse wurden mehrmals pro Woche auf Hautveränderungen hin untersucht und beim Auftreten von Hautveränderungen durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden rasiert und fotografiert. Des Weiteren erfolgte die Vermessung und Dokumentation der Hautveränderungen mit Hilfe einer Schieblehre.

3.13.3 Behandlung der Mäuse mit DMBA

Für die vergleichende Untersuchung von Tumoren von HDGF^{-/-} und Wildtyp-Mäusen wurden in 2-4 Tage alten Jungtieren durch Applikation von 40 µl einer 0,2%igen DMBA/Aceton Lösung auf den Rücken Plattenepithelkarzinome induziert. Die Mäuse wurden mehrmals pro Woche auf Hautveränderungen hin untersucht und beim Auftreten von Tumoren durch zervicale Dislokation getötet. Die Tiere wurden rasiert und fotografiert. Des Weiteren erfolgte die Vermessung und Dokumentation der Hautveränderungen mit Hilfe einer Schieblehre.

3.14 Statistische Analysen

3.14.1 Chi-Quadrat-Vierfeldertest

Für die statistische Analyse der UVB-induzierten Hautveränderungen wurde ein Chi-Quadrat-Vierfeldertest durchgeführt, der eine Aussage über die statistischen Verteilungseigenschaften einer Grundgesamtheit erlaubt. Mit Hilfe dieses Tests konnten je Test nur zwei Genotypen miteinander verglichen werden. Der Test wurde für folgende Paarungen durchgeführt:

- HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-} zu Ink4a^{+/-}
- HDGF^{Tyr} /Ink4a^{+/-} zu HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-}
- Ink4a^{+/-} zu HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-}

3.15.2 Exakter Test nach Fisher

Der exakte Test nach Fisher ist ein Signifikanztest, welcher auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert. Dieser Test wurde für die statistische Auswertung der durch die äußerliche Behandlung der Mäuse mit DMBA aufgetretenen Nicht-Hauttumore angewendet.

3.15.3 T-Test

Die statistische Analyse der gezählten Lymph- und Blutgefäße der PEK erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob das Ergebnis der Zählung normalverteilt war. Im Falle einer Normalverteilung erfolgte die Durchführung eines T-Tests.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemein

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Mausmodelle erzeugt werden. Ein erstes Modell, in dem der Hepatoma-derived Growth Factor (HDGF) spezifisch in den pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, exprimiert wird. Dieses Mausmodell sollte als Grundlage dienen, um zu klären, ob eine zusätzliche Expression von HDGF die Entstehung von Tumoren fördert, also ob HDGF die Eigenschaft eines Onkogens besitzt.

Ein zweites Mausmodell sollte Aufschluss darüber geben, ob es Unterschiede zwischen Tumoren gibt, die HDGF exprimieren und Tumoren die HDGF defizient sind. Hierfür sollten in Wildtyp- und HDGF-Knockout- (HDGF^{-/-}) Mäusen Tumore induziert und histologisch charakterisiert werden.

4.2 Melanom-Mausmodell

4.2.1 Charakterisierung der Tyrosinase-HDGF transgenen Mäuse

4.2.1.1 Genotypenbestimmung

Die Erzeugung der Tyrosinase-HDGF (HDGF^{Tyr}) transgenen Mäuse erfolgte durch Injektion des mit BssIII linearisierten DNA-Konstruktes (Abbildung 9) in den Pronukleus. Dieses Konstrukt wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit hergestellt und auf seine Funktionalität überprüft, bevor es für die Herstellung einer transgenen Mauslinie verwendet wurde. Aus den Injektionen gingen 61 Tiere hervor. Im Alter von 4-6 Wochen erfolgte bei den Tieren die Entnahme einer Schwanzspitzenbiopsie und die Tiere wurden auf Integration des Tyr-HDGF Gen Konstruktes ins Genom hin untersucht.

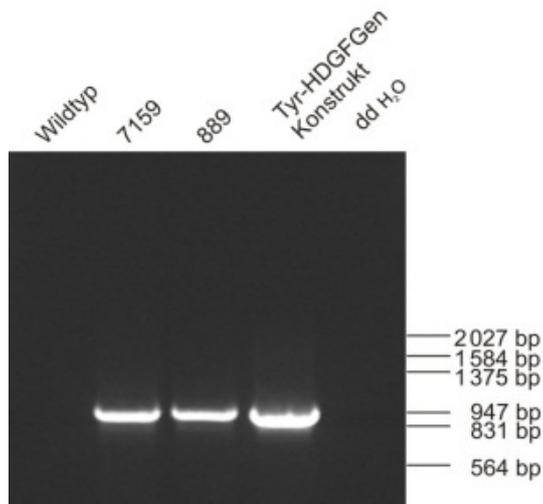


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung des Ergebnisses einer Genotypisierungs-PCR. Die PCR mit den Primern 1879 und 1815 wurde auf der DNA einer Wildtyp-Maus, der Mäuse 7159 und 889, sowie auf dem Tyr-HDGFGen Konstrukt als Positivkontrolle und mit ddH₂O als Negativkontrolle durchgeführt. Die Reaktion auf der DNA der Mäuse 7159 und 889 sowie auf 10 ng des Tyr-HDGFGen Konstruktes führte zur Amplifizierung eines 943 bp großen Fragments, während von der Wildtyp DNA und der Wasserkontrolle kein PCR-Produkt gebildet werden konnte.

Die PCR-Genotypenbestimmung der durch Pronukleusinjektion erzeugten Tiere ergab, dass das Tyr-HDGFGen Konstrukt in 15 der 61 Mäuse ins Genom integriert war.

Das Ergebnis der PCR-Genotypenbestimmung konnte durch die Analyse der genomischen DNA mittels Southernblot-Analyse verifiziert werden. Neben den 15 DNA-Proben der Tiere, die laut PCR das Tyr-HDGFGen Konstrukt ins Genom integriert hatten, wurde die DNA von einer injizierten Maus ohne Integration (7165) und die einer nicht injizierten Maus (WT) für die Analyse eingesetzt. Dafür erfolgte die Inkubation der genomischen DNA mit den Restriktionsenzymen BglII und HindIII (Abbildung 9). Die Sonde umfasst Exon IV, Intron IV und Exon V und wurde durch Inkubation des Plasmids HDGFgenepBSK mit NheI hergestellt. Die Markierung des so gewonnenen 686 bp großen Fragmentes erfolgte mit Hilfe des Klenow-Fragments und radioaktivem [α -³²P]-dCTP.

In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass mit Hilfe der HDGF-spezifischen Sonde für alle Tiere ein 4386 bp großes Fragment detektiert werden konnte. Dieses entsteht durch die Restriktion der genomischen DNA aus dem HDGF-Gen und entspricht dem Wildtyp-Gen. In den Proben aller PCR-positiven Mäuse, außer Maus 892, konnte ein zweites DNA-Fragment mit einer Größe von 2570 bp

detektiert werden. Dieses Fragment zeigt die Integration des Tyr-HDGFGen Konstruktes mit dem verkürzten Intron I an. Die Southernblot-Analyse bestätigte für fast alle PCR-positiven Mäuse die Integration des Tyr-HDGFGen Konstruktes ins Genom.

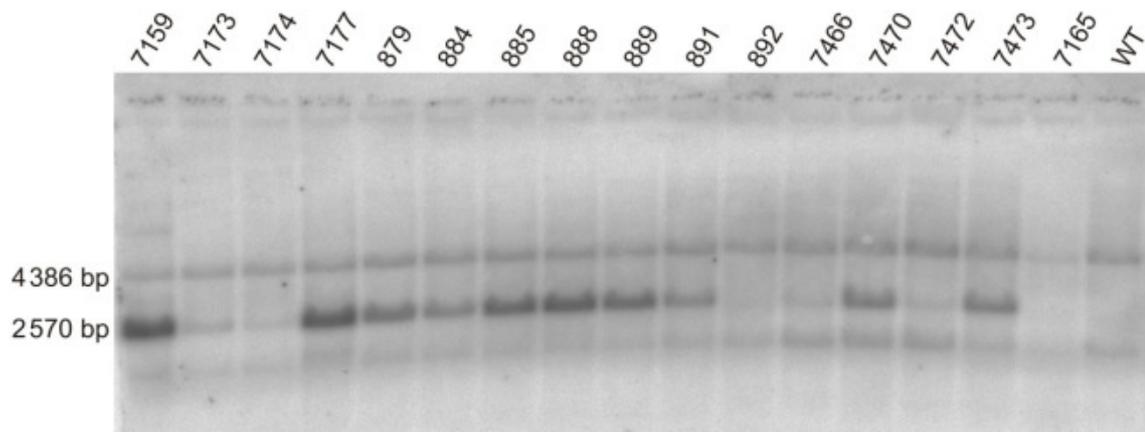


Abbildung 11: Ergebnis der Southernblot-Analyse.

Zur Detektion des HDGF Gens wurde die Membran mit einer radioaktiven ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$) Sonde inkubiert. Es ist zu erkennen, dass mit Hilfe der HDGF-Sonde zwei DNA-Fragmente detektiert wurden. Die 4386 bp Bande ist dem Wildtyp-HDGF Gen zuzuordnen, während die 2570 bp Bande auf das Tyr-HDGFGen Konstrukt zurückzuführen ist. Bei allen Tieren, bis auf Maus 892, die in der PCR positiv waren, konnte die 2570 bp Fragment detektiert werden. Für Probe 7165, die in der PCR negativ war und die Wildtyp-Kontrolle (WT) konnte kein 2570 bp Fragment detektiert werden.

Für die Charakterisierung der Mäuse erfolgte die Züchtung von zwei separaten Mauslinien. Als Ursprung dienten die Mäuse 889 und 7159, deren Nachkommen auf die Expression von HDGF vom Tyr-HDGFGen Konstrukt hin untersucht wurden. Die Ergebnisse der Mauslinie 7159 befinden sich in diesem Ergebnisteil, während die zur Linie 889 im Anhang (8.1) aufgeführt sind. Die transgenen Mäuse werden im Folgenden mit HDGF^{Tyr} bezeichnet.

4.2.1.2 Expressionsanalyse des Tyr-HDGFGen Konstruktes in Mäusen

Die Expressionsanalyse des Tyr-HDGFGen Konstruktes erfolgte auf Protein- und mRNA-Ebene. Für die Analysen wurden Proben von HDGF^{Tyr} - und Wildtyp-Mäusen verglichen.

a) Westernblotanalyse

Als Gewebe wurden neben Haut und Auge, welche Melanozyten enthalten, Gehirn, Milz und Leber zu Vergleichszwecken für die Analyse ausgewählt. Die Herstellung der Gewebelysate erfolgte durch Homogenisierung der Gewebe in einem Glas-in-Teflon Homogenisator mit Lysispuffer. Die Hautproben wurden vor dem Homogenisieren mit Hilfe des UltraTurrax® zerkleinert. Der Proteingehalt wurde durch eine Proteinbestimmung ermittelt und 40 µg Gesamtprotein wurden je Probe für die Westernblot-Analyse eingesetzt. In allen Proben konnte das auf einer Höhe von 38 kDa migrierende HDGF detektiert werden (Abbildung 12). Allerdings ist keine Zunahme von HDGF in Geweben, welche pigmentbildende Zellen enthalten, bei Vergleich von transgenen und Wildtyp-Mäusen erkennbar (weiße Pfeile in Abbildung 12). Das transgene HDGF kann nicht vom Wildtyp-HDGF unterschieden werden, da auf die Verwendung eines Anhangs (Tag) an das Protein verzichtet wurde. Neben dem HDGF-Protein detektierte der HDGF-Antikörper (HDGF-AK) in den Proben der Rückenhaut und der Leber ein Protein, das bei ca. 100 kDa migriert (grüne Pfeile in Abbildung 12). Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um HRP-2. Aufgrund der starken Sequenzhomologie von HRP-2 und HDGF im N-terminalen Bereich detektiert der HDGF-AK auch dieses Protein.

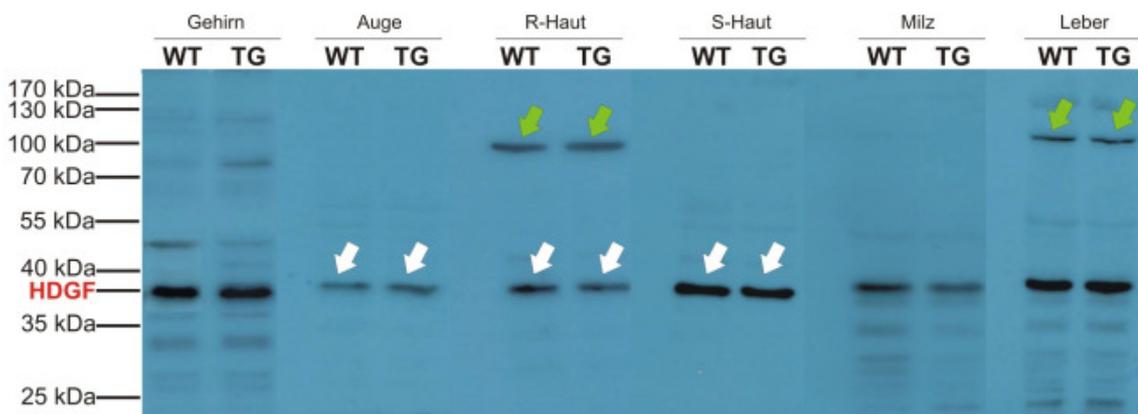


Abbildung 12: Westernblot von Gehirn-, Auge-, Rückenhaut- (R-Haut), Schwanzhaut- (S-Haut), Milz- und Leberlysaten einer Wildtyp- (WT) und HDGF^{Ty}- (TG) Maus.

40 µg Gesamtprotein wurden von jeder Probe eingesetzt. Die weißen Pfeile deuten auf das in Geweben mit pigmentbildenden Zellen enthaltende HDGF. Grüne Pfeile deuten auf das vom HDGF-AK detektierte HRP-2. Die Detektion des HDGF erfolgte durch Inkubation mit dem Kaninchen-anti-Maus-HDGF Antikörper in Kombination mit einem Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Zweitantikörper. HDGF konnte in allen Lysaten auf einer Laufhöhe von 38 kDa detektiert werden. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL.

b) mRNA-Analyse

Die Unterscheidung der transgenen HDGF-mRNA von der Wildtyp HDGF-mRNA erfolgte erneut mit Hilfe des Primers 1879 (Abbildung 13). Dieser Primer ist komplementär zu einem Teil des pBluescript Vektors, der direkt vor der kodierenden Sequenz der HDGF-mRNA liegt, welche von dem Tyr-HDGFGen Konstrukt gebildet wird. In Kombination mit Primer 1850 kann so spezifisch diese mRNA detektiert werden. Im Vergleich dazu konnte mit Hilfe der Primer 1559 und 1850 die gesamte, also Wildtyp und transgene, mRNA amplifiziert werden.

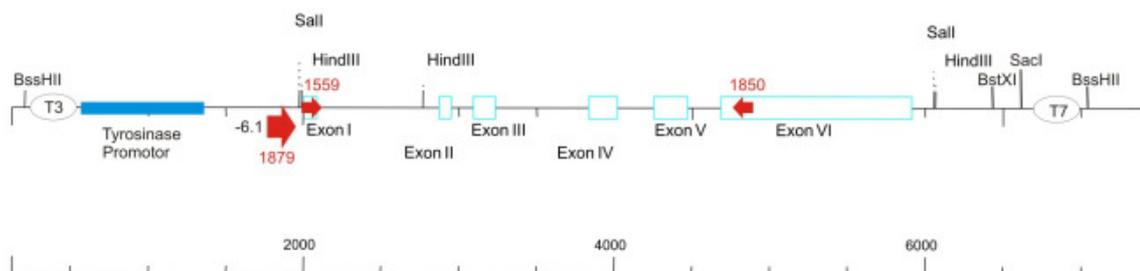


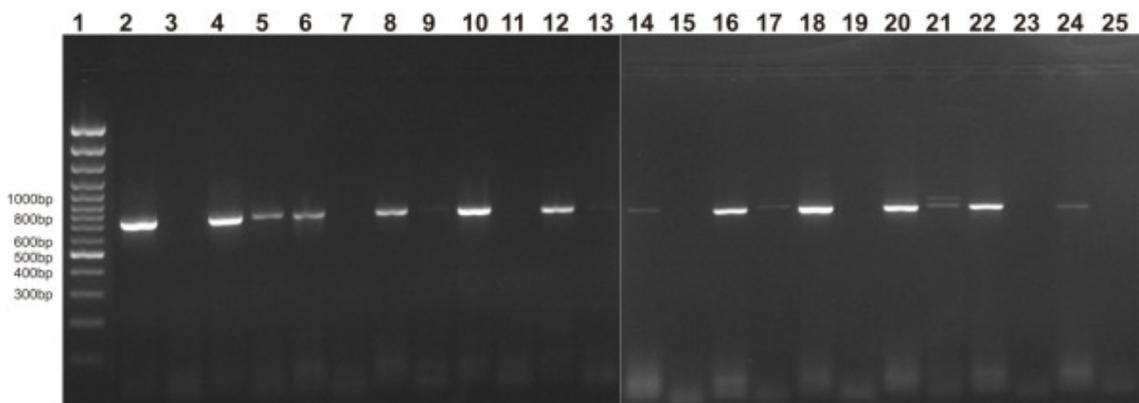
Abbildung 13: Lokalisation der Primer zur mRNA-Analyse im Tyr-HDGFGen Konstrukt.

Dargestellt ist das Tyr-HDGFGen Konstrukt und die Primer, die für die Expressionsanalyse auf der hergestellten cDNA verwendet wurden. Die Primer 1879 und 1850 amplifizieren spezifisch die auf das Tyr-HDGFGen Konstrukt zurückgehende cDNA mit einer erwarteten Fragmentgröße von 861 bp. Die Primer 1559 und 1850 amplifizieren die gesamte HDGF-cDNA (841 bp).

Ein HDGF^{Tyr}- und ein Wildtyp-Tier wurden für die mRNA-Analyse von Haut, Auge (die Melanozyten enthalten), Gehirn, Milz und Leber (zu Vergleichszwecken) ausgewählt. Dafür wurde zunächst die gesamte RNA isoliert, anschließend erfolgte die Umschreibung in cDNA mittels Oligo-(dT)-Primer. Diese cDNA diente als Ausgangsmaterial für die durchgeführten PCR-Reaktionen.

In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass in allen Organen des Wildtyp-Tieres mit den Primern 1559/1850 HDGF-cDNA detektiert wurde (Spur 2, 6, 10, 14, 18, und 22) während mit den Primern 1879/1850 keine cDNA amplifiziert werden konnte (Spur 3, 7, 11, 15, 19 und 23). Die PCR auf der cDNA des transgenen Tieres ergab mit dem allgemeinen HDGF Primer (1559) ebenfalls in allen Organen ein Amplifikat (Spur 4, 8, 12, 16, 20 und 24). Die Reaktion mit dem für das Tyr-HDGFGen Konstrukt spezifischen Primern 1879 führte zur Amplifizierung eines PCR-Produktes mit der erwarteten Größe von 861 bp in

den Haut- und Augenproben, welche pigmentbildende Zellen besitzen, aber auch in allen anderen untersuchten Organen (Spur 5, 9, 13, 17, 21 und 25). Dies deutet darauf hin, dass von dem ins Mausgenom integrierten Tyr-HDGFGen Konstrukt HDGF-mRNA gebildet wird. Das mit Hilfe der Primer 1879/1850 hervorgegangene Amplifikat auf der Schwanzhaut der HDGF^{Tyr}-Maus (Spur 17) wurde in den pBlueskript Vektor kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung (Sequenzvergleich siehe Anhang 8.2.1, Abbildung 44) ergab eine absolute Übereinstimmung des Amplifikats mit der bekannten kodierenden Sequenz von HDGF (publiziert von Nakamura et al. 1994, NCBI-ID: bc21654).



Nr.	Tier/Organ	Primer	Nr.	Tier/Organ	Primer
2	WT Gehirn	1559/1850	14	WT S-Haut	1559/1850
3	WT Gehirn	1879/1850	15	WT S-Haut	1879/1850
4	TG Gehirn	1559/1850	16	TG S-Haut	1559/1850
5	TG Gehirn	1879/1850	17	TG S-Haut	1879/1850
6	WT Auge	1559/1850	18	WT Milz	1559/1850
7	WT Auge	1879/1850	19	WT Milz	1879/1850
8	TG Auge	1559/1850	20	TG Milz	1559/1850
9	TG Auge	1879/1850	21	TG Milz	1879/1850
10	WT R-Haut	1559/1850	22	WT Leber	1559/1850
11	WT R-Haut	1879/1850	23	WT Leber	1879/1850
12	TG R-Haut	1559/1850	24	TG Leber	1559/1850
13	TG R-Haut	1879/1850	25	TG Leber	1879/1850

Abbildung 14: mRNA-Analyse von Gehirn-, Auge-, Rückenhaut- (R-Haut), Schwanzhaut- (S-Haut), Milz- und Leberproben einer Wildtyp- (WT) und HDGF^{Tyr}- (TG) Maus.

In Spur 1 wurde der Größenstandard 100 bp DNA Ladder plus aufgetragen. Die Primerkombination 1559/1850 führte zur Amplifizierung der gesamten HDGF cDNA mit einer Fragmentgröße von 841 bp, während mit Hilfe der Primer 1879/1850 ein Fragment von 861 bp vervielfältigt wurde, das nur die cDNA nachweist, die auf das Tyr-HDGFGen Konstrukt zurückgeht.

In Spur 21 wurden von der cDNA der Milz der transgenen Maus zwei Fragmente amplifiziert. Das untere migriert auf der Höhe des 861 bp

Fragments, während das obere Fragment bei ca. 950 bp migriert. Beide Fragmente wurden ebenfalls in den pBluescript Vektor kloniert und sequenziert. Das untere Fragment ist identisch zu der HDGF cds (Spur 17), während das Obere zusätzlich dazu 70 bp aus Intron III beinhaltet (siehe Anhang Abbildung 44). Die Translation dieser Sequenz würde jedoch aufgrund eines Stoppcodons in Intron III zu einem stark verkürzten Protein führen, das kaum mehr als die HATH-Region (116 Aminosäuren; ~14 kDa) umfasst (siehe Anhang Abbildung 45). Sequenzvergleiche mit bekannten exprimierten Sequenzen (ESTs; BLAST) zeigten, dass diese Sequenz schon bekannt ist (siehe Anhang; Abbildung 46) und dass die zusätzlichen 70 bp zwischen mehreren Spezies (Maus, Ratte, Mensch, Hund, Rind) konserviert sind (siehe Anhang Abbildung 47).

c) Immunfluoreszenzfärbung

Um zu überprüfen, ob es in der Haut und im Auge die pigmentbildenden Zellen sind, die HDGF vom Tyr-HDGFGen Konstrukt exprimieren, beziehungsweise welche Zellen im Gehirn HDGF exprimieren, erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung mit Schnitten dieser Gewebe. Hierfür wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte entparaffiniert und mit dem primären Kaninchen-anti-HDGF Antikörper inkubiert. Mit Hilfe des Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 konnte das HDGF-Protein spezifisch in diesen Schnitten detektiert werden (Abbildungen 15-17).

Für die Analyse der Rückenhaut wurden Mäuse im Alter von 10 Tagen verwendet, da sich zu diesem Zeitpunkt der Haarzyklus in der anagenen Phase befindet und der Tyrosinase-Promotor aktiv ist. Abbildung 15 zeigt die Färbung eines Querschnitts von einer transgenen und einer Wildtyp-Maus. Es ist zu erkennen, dass in Tieren beider Genotypen HDGF in den meisten Zellen der Haut exprimiert wird und nukleär lokalisiert ist, unter anderem auch in den pigmentierten Bereichen der Haarfollikel (A und C). In manchen Haarfollikeln der HDGF^{Tyr}-Maus scheint das HDGF Signal in wenigen Zellen stärker zu sein (grüner Pfeil) als in den entsprechenden Zellen der Wildtyp-Maus. Ob dieses verstärkte Signal auf eine zusätzliche HDGF-Expression vom Tyr-HDGFGen Konstrukt zurückgeht, kann aber anhand dieser Bilder nicht festgestellt werden.

Die Spezifität der HDGF-Detektion konnte durch die fehlende Färbung in den Präparaten der Antikörper-Kontrollen (AK-Kontrolle) gezeigt werden (B, F, K Q und D, I, M, T).

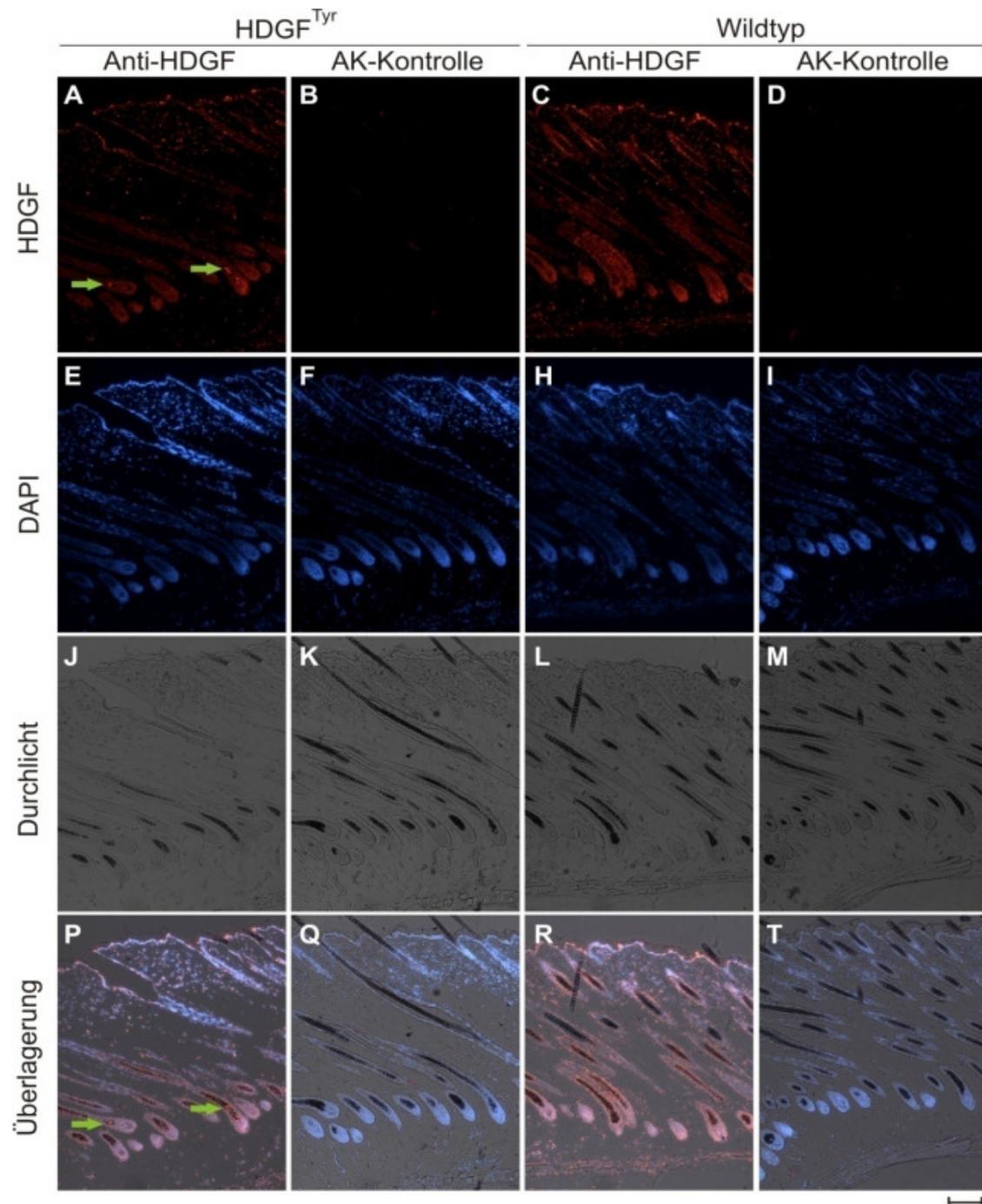


Abbildung 15: HDGF-Immunfluoreszenzfärbung der Rückenhaut.

Dargestellt sind die Färbungen von 4 μm dicken Hautpräparaten einer HDGF^{Tyr}- und einer Wildtyp-Maus. Die grünen Pfeile deuten auf die HDGF-positiven Zellkerne im Bereich der Haarfollikel. Die Detektion von HDGF erfolgte durch Inkubation mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 (AK-Kontrolle nur mit dem 2. AK inkubiert). Von oben nach unten sind Bilder folgender Färbungen zu sehen: HDGF (rot), DAPI (blau), Durchlicht und die Überlagerung der jeweils darüber abgebildeten Bilder. Zu jeder Färbung ist in der rechts anstehenden Spalte die AK-Kontrolle abgebildet. Die Bilder wurden mit einer 100 fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Messbalken entspricht 100 μm .

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass HDGF (rot) in der Netzhaut (Ganglienzellen, in der äußeren Nuklearschicht und im Retinalen Pigmentepithel (RPE); roter Balken in Abbildung 16 P), sowie in der Aderhaut (Chorioidea; grüner Balken in P) und in der Lederhaut (gelber Balken in P) des Auges nukleär lokalisiert ist. Dagegen ist HDGF in der inneren Nuklearschicht der Netzhaut zytosolisch lokalisiert. Die AK-Kontrollen zeigen, dass die Detektion von HDGF spezifisch ist.

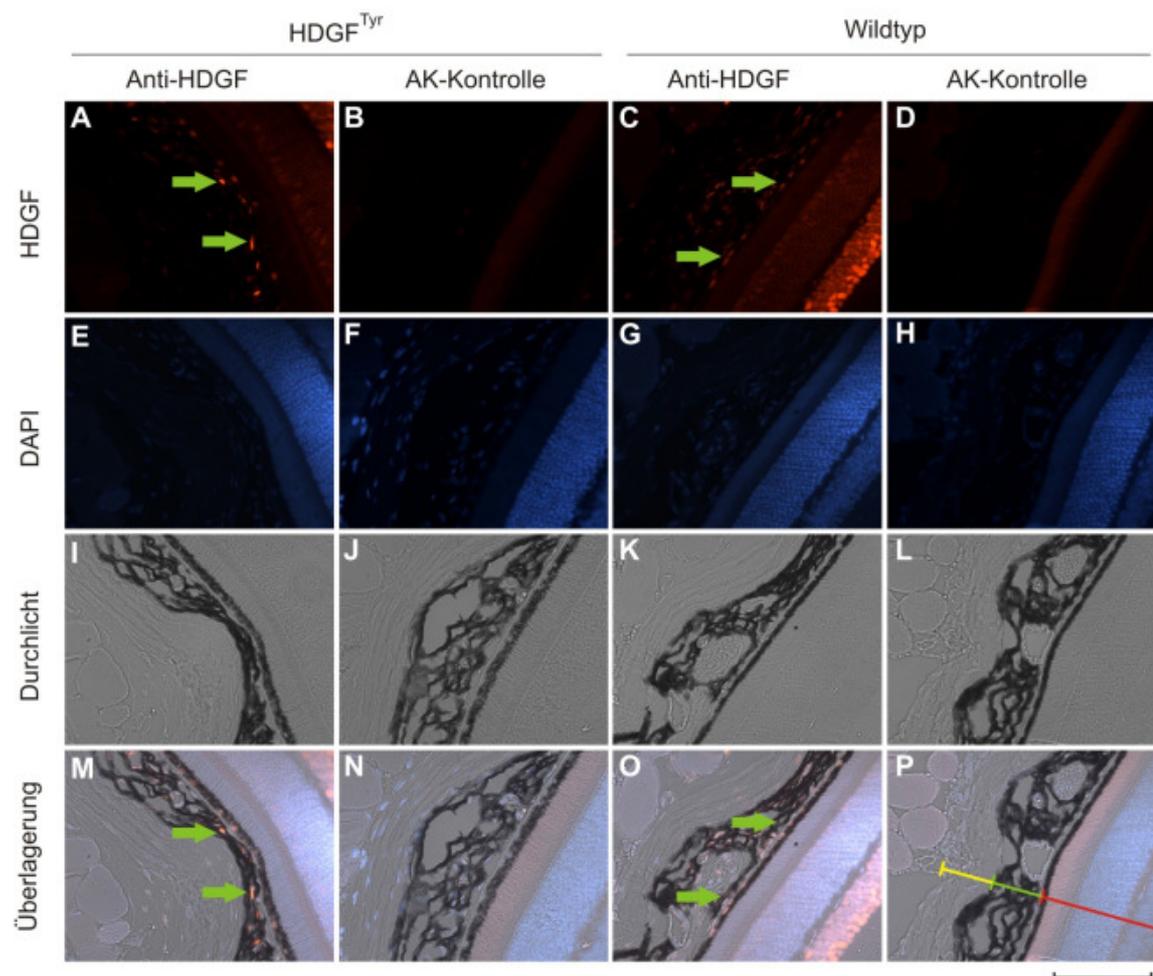


Abbildung 16: HDGF-Immunfluoreszenzfärbung des Auges.

Dargestellt sind die Färbungen von 4 μm dicken Augenschnitten einer HDGF^{Tyr}- und einer Wildtyp-Maus. In den Bildern ist ein Ausschnitt zu sehen, der von links nach rechts die Lederhaut (gelber Balken in P), die Aderhaut (Chorioidea, grüner Balken in P) und die Netzhaut (roter Balken in P) des Auges umfasst. Die grünen Pfeile deuten auf Zellkerne, die ein HDGF-Signal in den Zellen der Chorioidea aufweisen. Die Detektion von HDGF erfolgte durch Inkubation mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 (AK-Kontrolle nur mit dem 2.AK inkubiert). Von oben nach unten sind Bilder folgender Färbungen zu sehen: HDGF (rot), DAPI (blau), Durchlicht und die Überlagerung der jeweils darüber abgebildeten Bilder. Zu jeder Färbung sind in der rechts anstehenden Spalte die AK-Kontrolle abgebildet. Die Bilder wurden mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Der Messbalken entspricht 100 μm .

Die pigmentbildenden Zellen des Auges im Retinale Pigmentepithel und der Chorioidea zeigen in beiden Genotypen eine positive HDGF-Färbung. Das Signal in den Pigmentzellen der Chorioidea des transgenen Tieres (Pfeil in A und M) scheint in diesem Zelltyp stärker zu sein, als in denen des Wildtyp-Tieres (Pfeil in C und O). Ob dieses stärkere Signal auf eine zusätzliche HDGF-Expression vom Tyr-HDGF Gen Konstrukt zurückgeht, kann wiederum nicht festgestellt werden.

Im Gehirn wird HDGF in den meisten Zellen exprimiert und zeigt eine nukleäre Lokalisation. Abbildung 17 zeigt exemplarisch die Detektion von HDGF im Cerebellum und im Cortex. Die Expression von HDGF im Gehirn einer HDGF^{Tyr}-Maus wurde mit der einer Wildtyp-Maus in Bezug auf Intensität und Expressionsort verglichen. In den Präparaten beider Genotypen ist eine Expression in den Zellen der Körnerzellschicht des Cerebellums (A, G, M und D, J, P), als auch in vielen Zellen des Cortex (B, H, N und E, K, Q) zu erkennen. Anhand dieser Färbung konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden.

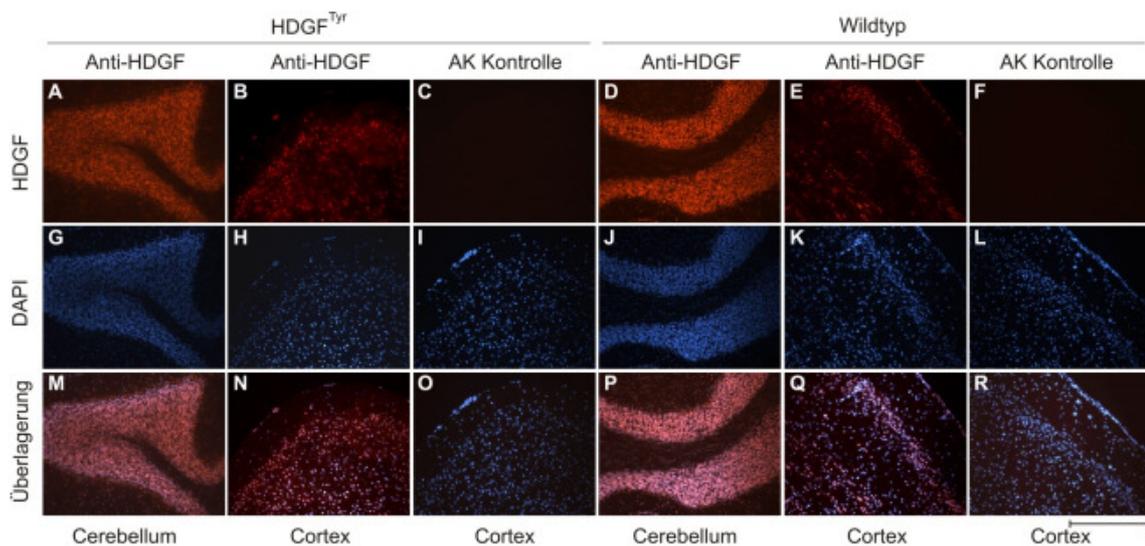


Abbildung 17: HDGF-Immunfluoreszenzfärbung des Gehirnes.

Gezeigt ist die Detektion von HDGF in Gehirnarealen (Cerebellum und Cortex) einer HDGF^{Tyr} und einer Wildtyp-Maus. Zu den Cortexfärbungen ist jeweils in der rechts anstehenden Spalte die dazugehörige AK-Kontrolle abgebildet. In der oberen Reihe ist die HDGF Färbung (rot), in der mittleren Reihe die Anfärbung der Zellkerne durch DAPI (blau) und in der unteren Reihe die Überlagerung der Bilder der beiden oberen Reihen dargestellt. Die Detektion von HDGF erfolgte durch Inkubation mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 (AK-Kontrolle nur mit dem 2. AK inkubiert). Die Bilder wurden mit einer 400 fachen Vergrößerung erstellt. Der Messbalken entspricht 100 µm.

Bisher konnte nur anhand der mRNA-Analyse eindeutig gezeigt werden, dass HDGF von dem Tyr-HDGFGen Konstrukt exprimiert wird, nicht jedoch, ob das Protein gebildet wird und in welchen Zellen der Organe es zusätzlich exprimiert wird. Um eine Mauslinie zu erhalten, die nur das transgene HDGF exprimiert, wurden die HDGF^{Tyr}-Mauslinien 7159 und 889 jeweils in die HDGF-Knockout-Mauslinie (HDGF^{-/-}) gekreuzt. Die daraus entstandenen Tiere werden im Folgenden als HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-} bezeichnet.

4.2.1.3 Analyse der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Mäuse

Die HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Mäuse sind wie die HDGF^{-/-}-Mäuse lebensfähig, fertil und zeigen keine phänotypischen Ausprägungen.

Die Untersuchung der HDGF-Expression vom Tyr-HDGFGen Konstrukt erfolgte in diesen Tieren mittels Westernblotanalyse und anhand von Immunfluoreszenzfärbungen.

a) Westernblotanalyse

Für die Westernblotanalyse wurden Lysate folgender Organe von HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}- und HDGF^{-/-}-Tieren durch Homogenisierung der Gewebe in Lysispuffer hergestellt: Gehirn, Auge, Rückenhaut (R-Haut), Schwanzhaut (S-Haut), Milz und Leber. Als Positivkontrolle diente Gehirnlisat einer Wildtyp-Maus. Für die Analyse wurden 40 µg Gesamtprotein je Probe eingesetzt.

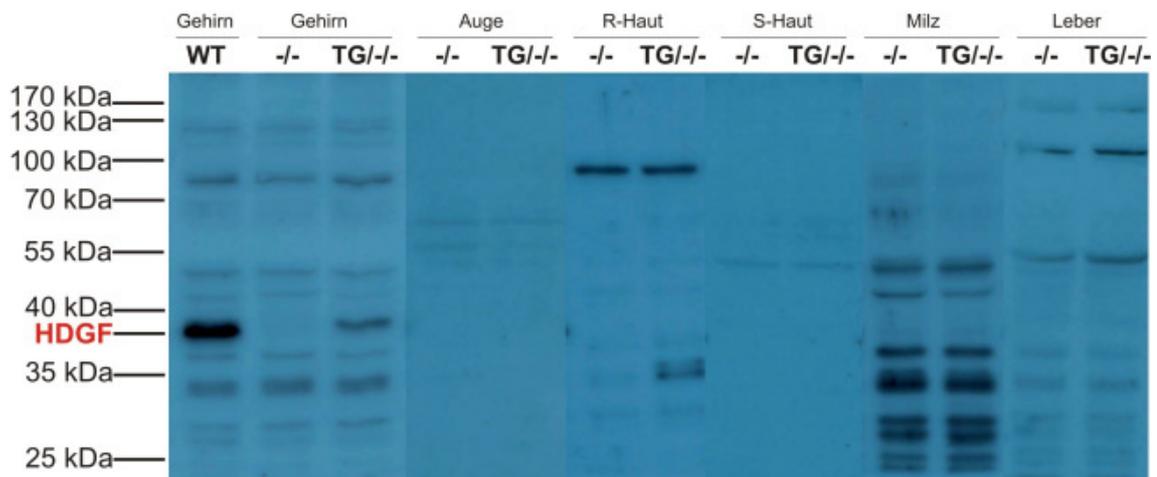


Abbildung 18: Westernblotanalyse von Organlysaten von HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-} (TG^{-/-}) und HDGF^{-/-} (-/-) Mäusen.

Je 40 µg Gesamtprotein der Organlysate von Gehirn, Auge, Rückenhaut (R-Haut), Schwanzhaut (S-Haut), Milz und Leber wurden je Probe aufgetragen. In Spur 1 wurde als Positivkontrolle 40 µg Gehirnlisat einer Wildtyp Maus aufgetragen, in der HDGF auf einer Laufhöhe von 38 kDa detektiert wurde. Die Detektion des HDGF erfolgte durch Inkubation mit dem Kaninchen-anti-HDGF Antikörper in Kombination mit einem Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Zweitantikörper. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL.

Wie erwartet konnte mit Hilfe des Kaninchen-anti-HDGF Antikörpers HDGF, welches bei 38 kDa migriert, im Lysat der Positivkontrolle (Abbildung 18, Spur 1), aber nicht in den Organlysaten der HDGF^{-/-} Maus (Spuren: -/-) detektiert werden. In den Lysaten der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-} Maus ist nur im Gehirnlisat eine Bande für HDGF erkennbar (Spur: Gehirn TG^{-/-}). In den Milzproben der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}- und HDGF^{-/-}-Maus sind einige Proteine verschiedener Größen zu erkennen. Keines dieser Proteine migriert auf einer Höhe von 38 kDa und es ist kein Unterschied zwischen den Proben der beiden Genotypen zu erkennen. In der Milz liegen sehr viele Immunzellen vor, deren Proteine z.T. Antikörper binden können. Es ist daher möglich, dass es sich hierbei um eine unspezifische Bindung der für die Detektion verwendeten Antikörper mit diesen Proteinen handelt.

b) Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden an Haut-, Auge- und Gehirnschnitten von HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}- und HDGF^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Diese Färbungen sollten Aufschluss darüber geben, ob es Zellen in der Haut und im Auge gibt,

die transgenes HDGF exprimieren, beziehungsweise welche Zellen in welchen Bereichen des Gehirnes HDGF vom Tyr-HDGF Gen Konstrukt exprimierten.

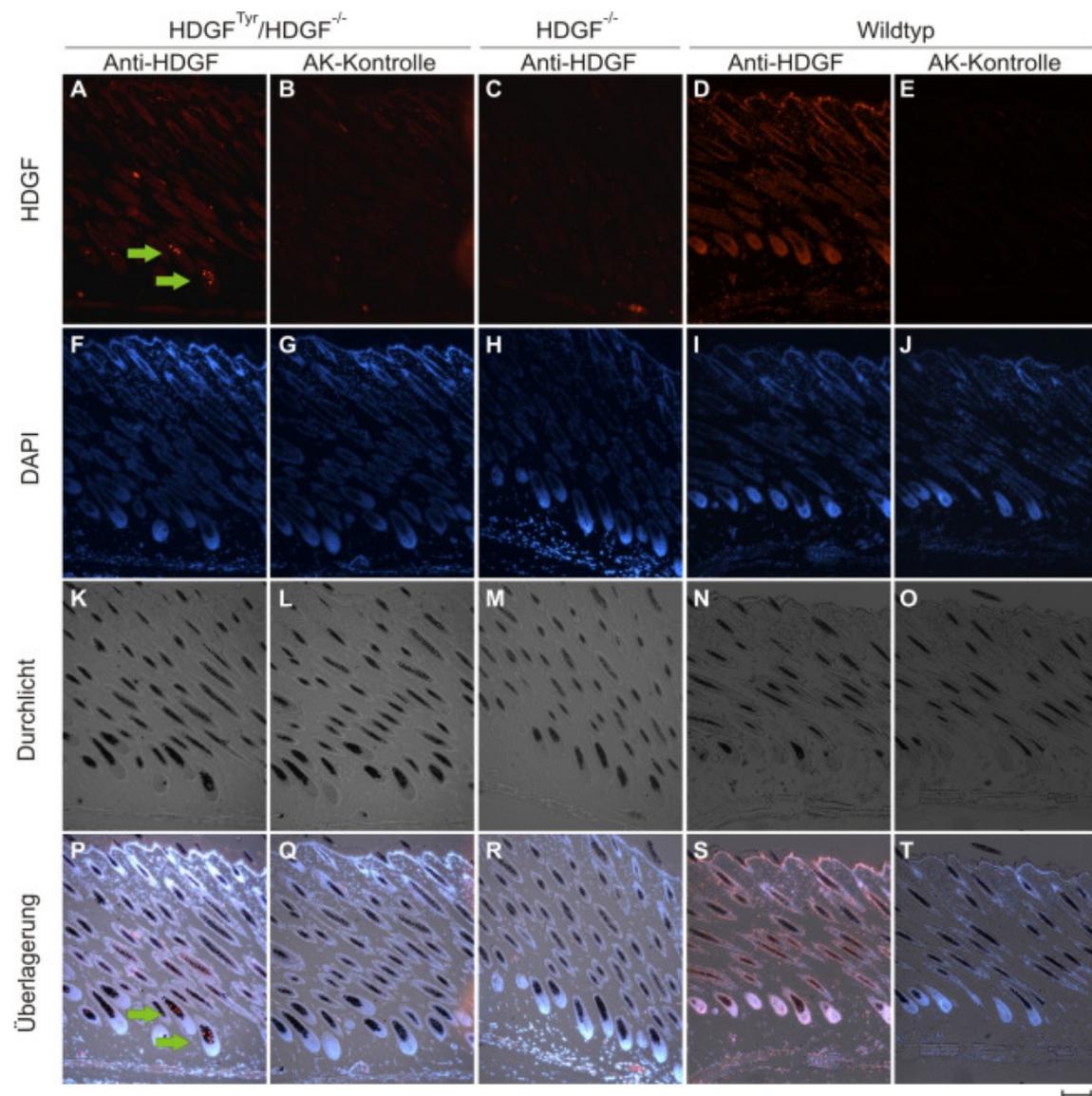


Abbildung 19: HDGF-Immunfluoreszenzfärbung der Rückenhaut.

Färbungen von drei Genotypen sind von links nach rechts abgebildet: HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}, HDGF^{-/-} und Wildtyp. Die grünen Pfeile deuten auf die HDGF-positiven Zellkerne im Bereich der Haarfollikel. Die Schnitte wurden mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 inkubiert (AK-Kontrolle nur mit dem 2. AK inkubiert). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Von oben nach unten sind Bilder folgender Färbungen zu sehen: A-E HDGF (rot), F-J DAPI (blau), K-O Durchlicht und die P-T Überlagerung der jeweils darüber abgebildeten Bilder. Die Bilder wurden mit einer 100 fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Messbalken entspricht 100 µm.

In Abbildung 19 sind Bilder der Rückenhaut von 10 Tage alten Tieren dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der Haarzyklus in der anagenen Phase. Es ist deutlich zu sehen, dass in dem Schnitt der HDGF^{-/-}-Haut (C und R) im Vergleich zur Wildtyp-Haut (D und S) kein HDGF detektiert werden

konnte. Auch in dem Schnitt der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Maus ist die für HDGF typische Expression in den Zellen der Haarschäfte oder der Epidermis nicht erkennbar. Allerdings konnten bei diesem Genotyp einzelne Zellen in den Haarfollikeln durch den HDGF-AK angefärbt werden (Pfeile in A und P). Da die Negativkontrollen ohne Primärantikörper kein Signal zeigten (B, Q und E, T), deutet die Färbung in den Bildern A und P auf eine Expression des transgenen HDGFs hin.

Die immunhistochemischen Färbungen der Augen erfolgte an Präparaten von 6 Wochen alten Mäusen (Abbildung 20). Die Färbung des HDGF^{-/-}-Präparats zeigt im Vergleich zu dem des Wildtyps kein positives Signal für HDGF. Im Bereich der Chorioidea zeigen einzelne Zellen in Schnitten der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Mäuse eine nukleäre HDGF-Färbung (Pfeile in A und P). Die Spezifität des HDGF-Signals konnte durch die Abwesenheit einer entsprechenden Färbung im Präparat der HDGF^{-/-}-Maus (C, R) und die negativen Antikörperkontrollen bestätigt werden (B, Q und E, T).

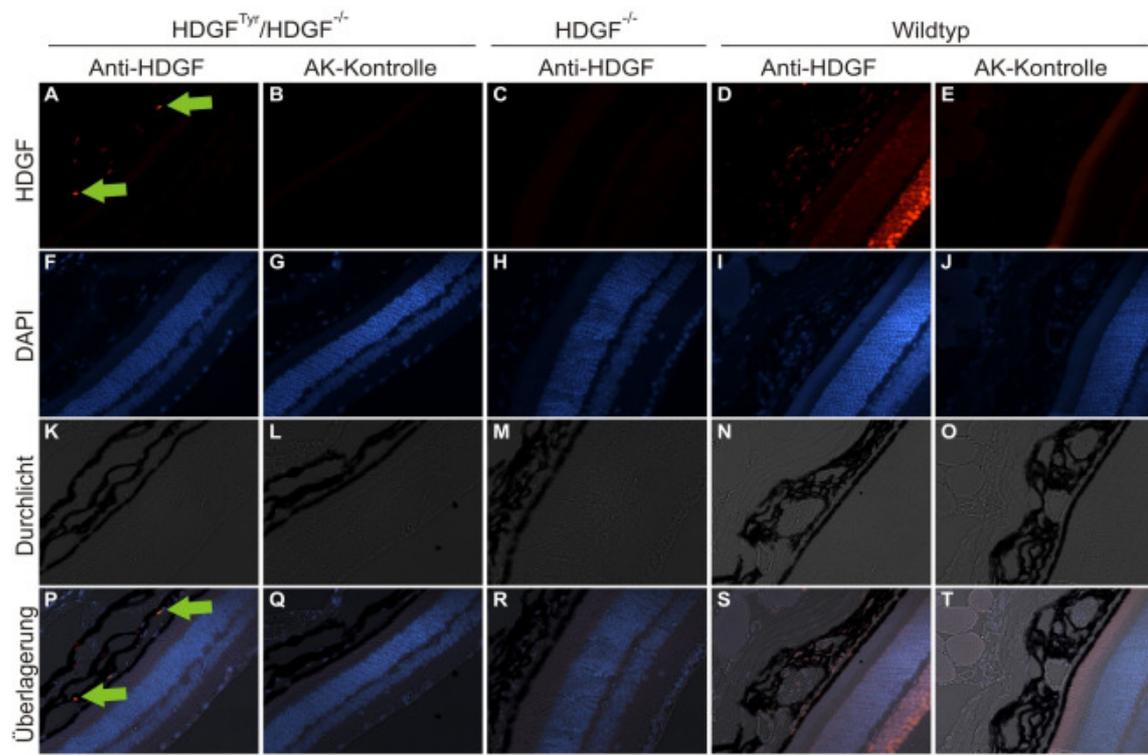


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von Augenpräparaten.

Färbungen von drei Genotypen sind von links nach rechts abgebildet: HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}, HDGF^{-/-} und Wildtyp. Die grünen Pfeile deuten auf die HDGF-positiven Zellkerne im Bereich der Chorioidea. Die Schnitte wurden mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 inkubiert (AK-Kontrolle nur mit dem 2.AK inkubiert), die Kerne mit DAPI angefärbt. Von oben nach unten sind Bilder folgender Färbungen zu sehen: HDGF (rot), DAPI (blau), Durchlicht und die Überlagerung der jeweils darüber abgebildeten Bilder. Die Bilder wurden mit einer 400 fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Messbalken entspricht 100 µm.

Die Ergebnisse der mRNA-Analyse (Abbildung 14) und der Westernblotanalyse (Abbildung 18) haben gezeigt, dass im Gehirn transgenes HDGF exprimiert wird, obwohl dort weder pigmentbildende Zellen vorhanden sind, noch der Tyrosinase-Promotor aktiv sein sollte. Immunfluoreszenzfärbungen des Gehirns von sechs Wochen alten Mäusen sollten zeigen, in welchem Bereich des Gehirns das Konstrukt exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden Gehirnschnitte von HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}, HDGF^{-/-} und Wildtyp-Mäusen gefärbt und die Signale verglichen.

Im oberen Teil der Abbildung 21 sind Färbungen des Cerebellums von HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}, HDGF^{-/-} und Wildtyp-Mäusen gezeigt. Während im Wildtyp HDGF stark in der inneren Körnerzellschicht exprimiert wird, kann im entsprechenden Bereich einer HDGF^{-/-}-Maus wie erwartet kein HDGF detektiert werden. Da auch im Präparat der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Maus kein HDGF detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass der Tyrosinase-Promotor in den Zellen dieser Hirnregion nicht aktiv ist. Bilder des Cortex im unteren Teil der Abbildung zeigen hingegen ein anderes Ergebnis. Im Wildtyp-Präparat ist zu erkennen, dass Zellen über den Cortex verteilt ein nukleäres Signal für HDGF aufweisen (C und K). Dieses Signal konnte im Präparat der HDGF^{-/-}-Maus nicht detektiert werden (B und J). Dahingegen zeigt die Färbung des HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Cortex ein nukleäres Signal, welches sich vom Wildtyp hinsichtlich der Verteilung der angefärbten Zellkerne unterscheidet (A und I).

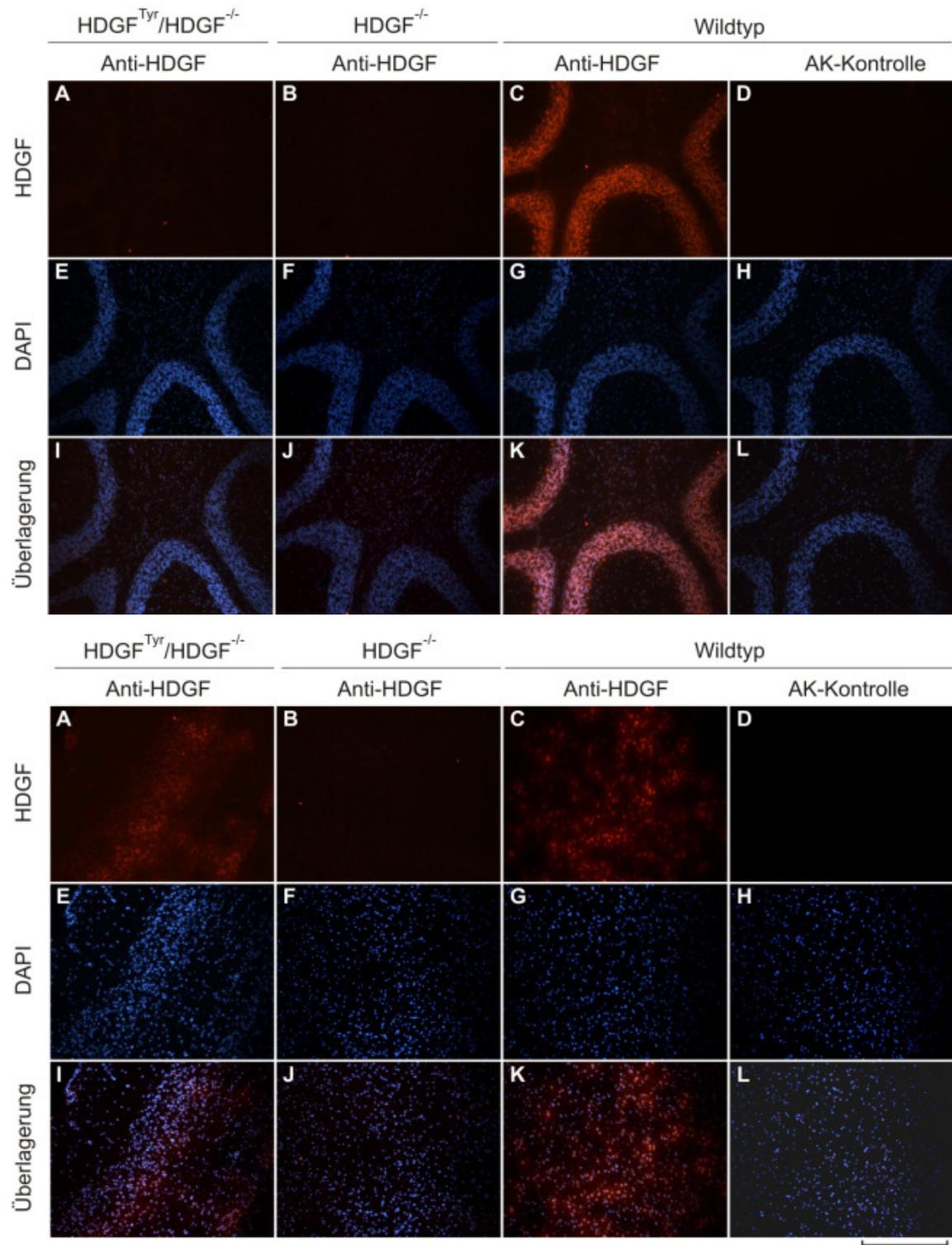


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von Cerebellum (oben) und Cortex (unten).

Für die Färbungen wurden sagittale 10 µm dicke Kryoschnitte verwendet. Färbungen von drei Genotypen sind von links nach rechts abgebildet: HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}, HDGF^{-/-} und Wildtyp. Die Schnitte wurden mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 inkubiert (AK-Kontrolle nur mit dem 2.AK inkubiert). Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Von oben nach unten sind Bilder folgender Färbungen zu sehen: HDGF (rot), DAPI (blau), Durchlicht und die Überlagerung der jeweils darüber abgebildeten Bilder. Die Bilder wurden mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Der Messbalken entspricht 100 µm.

4.2.1.4 *In Situ* Hybridisierung (ISH)

In Abbildung 19 konnte gezeigt werden, dass es im Bereich der Haarfollikel Zellen gibt, die transgenes HDGF exprimieren. Zum Nachweis, dass in diesem Bereich Melanozyten lokalisiert sind und dass es diese Zellen sind, die das Konstrukt exprimieren, wurde eine *in situ* Hybridisierung (ISH) zur Detektion der Tyrosinase mRNA und eine Immunfluoreszenzfärbung auf Folgeschnitten durchgeführt.

a) Klonierung der Sonden

Für die ISH erfolgte die Klonierung von zwei Sonden, die verschiedenen Bereichen der Tyrosinase-mRNA (Tyr-mRNA) entsprechen. Diese wurden in den pBluescript-Vektor kloniert, der sowohl einen T3- als auch einen T7-Promotor besitzt. Um eine vergleichbare Expression der sense und antisense RNA-Sonden zu erreichen, sollte nur ein Promotor verwendet werden, so dass die Klonierung der Sonden sowohl in sense als auch in antisense Richtung in den Vektor erfolgte. Hierfür wurde auf cDNA aus Rückenhaut eine PCR mit den Primern 3019/3020 bzw. 3021/3022 durchgeführt. Die PCR Produkte wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen PstI und HindIII bzw. HindIII und XhoI gespalten, so dass jedes PCR-Produkt einmal in sense und einmal in antisense Richtung in den entsprechend gespaltenen pBSK-Vektor kloniert werden konnte. Die Sequenzen der positiven Klone wurden durch Sequenzierung bestätigt (Vektorkarten siehe Anhang 8.3). Folgende Plasmide fanden für die ISH Verwendung:

- SF-541 mTyr-Sonde1-s-pBSK
- SF-542 mTyr-Sonde1-as-pBSK
- SF-543 mTyr-Sonde2-s-pBSK
- SF-544 mTyr-Sonde2-as-pBSK

b) Herstellung und Testen der mRNA-Sonden

Die Expression und Markierung der RNA-Sonden erfolgte mit Hilfe der T7-Polymerase und Digoxigenin-markiertem UTP von der mit BamHI linearisierten Plasmid-DNA. Die Überprüfung der Transkription und Quantifizierung der RNA-Sonden erfolgte mittels Dot-Blot im Vergleich zu einer β -Aktin Sonde (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Abschätzung wurden die Tyr-Sonden 1:1 000 in der ISH zur Detektion der Tyr-mRNA eingesetzt.

In Vorversuchen wurden beide antisense und sense Sonden verglichen. Als Kontrollen dienten die in unserem Labor schon mehrfach verwendeten Lass 4 antisense und sense Sonden. Der Vergleich zeigte, dass beide Tyr-antisense Sonden zu einer Markierung von Zellen im Bereich der Haarfollikel führten, während die Inkubation mit der Lass 4 antisense Sonde zu einer Anfärbung von Zellen im Bereich der Talgdrüsen führte (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung der sense Sonden führte nicht zur Färbung der Präparate. Da es keinen erkennbaren Unterschied zwischen den beiden Tyr-antisense Sonden in Bezug auf die Lokalisation des Signals oder die Signalstärke gab, wurden für die weiteren Versuche die Sonden verwendet, die auf den Plasmiden SF-541 (antisense Sonde Tyr-as) und SF-542 (sense Kontrolle Tyr-s) basieren.

c) *In Situ* Hybridisierung

Im oberen Teil von Abbildung 22 sind Bilder von Haarfollikeln dargestellt, die Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt oder an denen eine ISH mit der Tyr-as bzw. Tyr-s Sonde durchgeführt wurde. Die Untersuchung erfolgte erneut an Präparaten der Genotypen HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}, HDGF^{-/-} und Wildtyp. Die HE-Färbung zeigt, dass der Haarzyklus die anagene Phase durchläuft, die Phase in der Melanozyten das Melanin zur Einlagerung in das Haar bilden, so dass eine braune Pigmentierung der Haarfollikel vorliegt. Für die ISH wurden 4 μ m dicke Paraffinschnitte verwendet und unter RNase freien Bedingungen behandelt. Die Detektion der Digoxigenin-markierten RNA Sonden erfolgte durch anti-Digoxigenin Antikörper, an die das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde BM Purple verwendet.

Abbildung 22 zeigt, dass die Präparate, die mit der Tyr-antisense (Tyr-as) Sonde inkubiert wurden, eine deutliche Lilafärbung im Bereich der Haarfollikel aufweisen (Pfeil in D, E und F). Die Detektion der Tyrosinase mRNA in den Melanozyten zeigt auch, dass es keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Genotypen HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}, HDGF^{-/-} und Wildtyp gibt. Die Inkubation mit der Tyr-sense-Kontrolle (Tyr-s), führte zu keiner Farbentwicklung in den Präparaten (Pfeile in G, H, I). Zum Nachweis, dass es die lila gefärbten Melanozyten sind, die transgenes HDGF exprimieren, wurde an den jeweiligen Folgeschnitten eine immunhistochemische Färbung gegen HDGF durchgeführt (Abbildung 22 J-S). Es ist zu erkennen, dass in den Haarfollikeln der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Maus genau im Bereich der Lilafärbung aus Bild D HDGF exprimiert wird (Pfeil in A und P). Im Gegensatz dazu ist im HDGF^{-/-}-Präparat keine Färbung zu erkennen (L und Q). Die HDGF-Färbung des Wildtyp Präparates zeigt ein schwaches nukleäres Signal in den meisten Zellen des Haarfollikels einschließlich der Melanozyten (Pfeil in M und R), welches sich deutlich von der Färbung des HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Präparates unterscheidet.

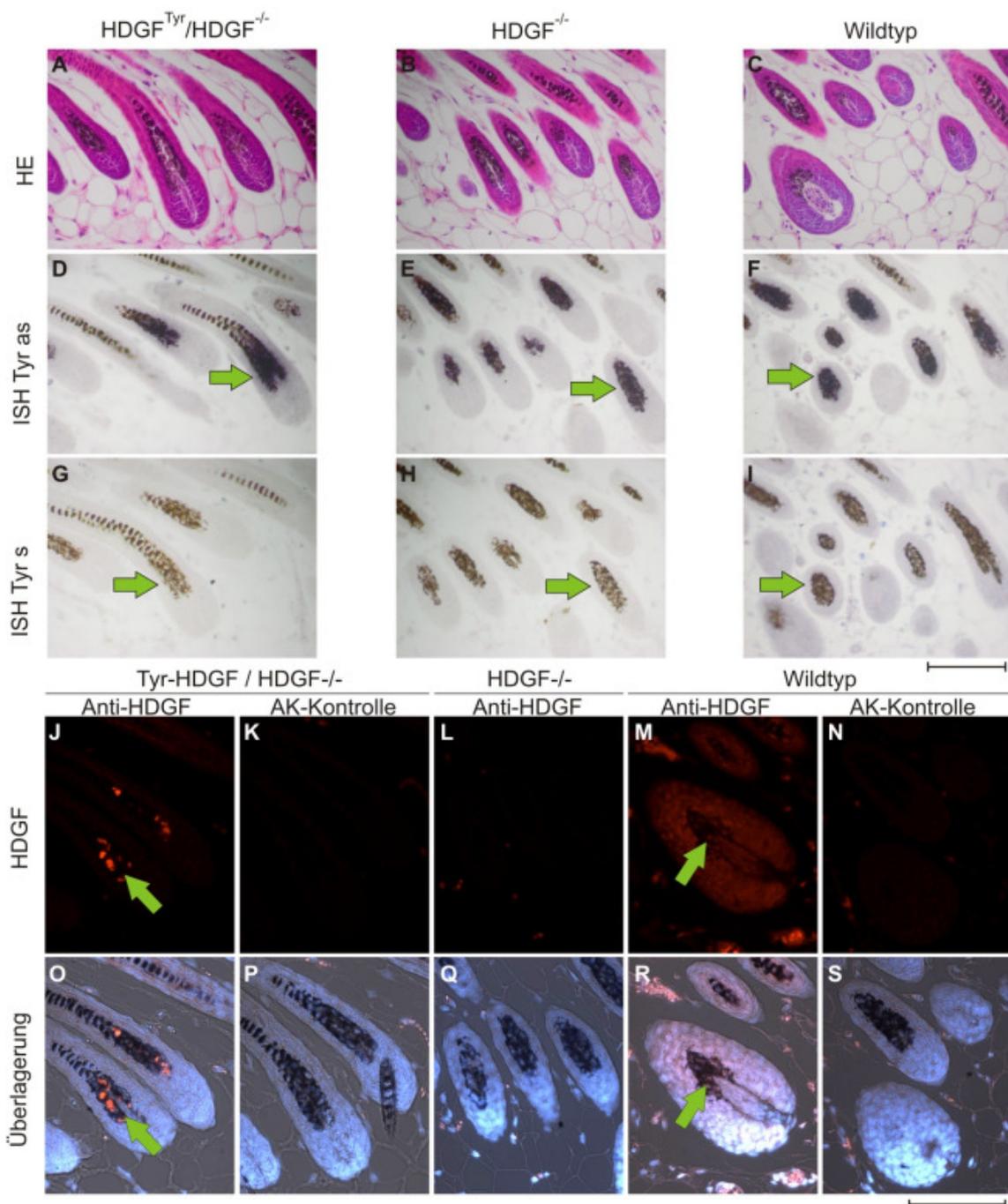


Abbildung 22: *In Situ* Hybridisierung (ISH) und Immunfluoreszenzfärbung der Folgeschnitte.

Im oberen Teil der Abbildung (A-I) sind Bilder der HE-Färbungen und der ISH dargestellt. Der untere Teil gibt einen Überblick über die HDGF-Immunfluoreszenzfärbungen, welche auf den jeweiligen Folgeschnitten angefertigt wurden. Für alle Färbungen wurden 4 μm dicke Paraffinschnitte der Haut der Genotypen HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}, HDGF^{-/-} und Wildtyp (von links nach rechts) verwendet. Von oben nach unten sind folgende Färbungen dargestellt: HE, Detektion der Tyr-as Sonde, Detektion der Tyr-s Sonde, HDGF-Färbung (rot) und die Überlagerung (HDGF-Färbung, DAPI-Färbung und Durchlicht). Die Schnitte wurden mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 inkubiert (AK-Kontrolle nur mit dem 2. AK inkubiert). Die Kerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. HE – Hämatoxylin/Eosin Färbung; ISH – *In Situ* Hybridisierung; Tyr as – Tyrosinase antisense Sonde; Tyr s – Tyrosinase sense Sonde. Die Bilder wurden mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Messbalken entsprechen 100 μm .

4.2.1.5 Histologie der HDGF^{Tyr}-, Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäuse

Nachdem gezeigt werden konnte, dass transgenes HDGF vom Tyr-HDGFGen Konstrukt in Melanozyten exprimiert wird, folgte die histologische Untersuchung der HDGF^{Tyr} im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Dafür wurden Rückenhaut (R-Haut), Schwanzhaut (S-Haut) und Augen von sechs Wochen alten HDGF^{Tyr}-, Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen verglichen. Die Analyse der Augen zeigte keine Unterschiede in Bezug auf die Pigmentierung des Retinalenen Pigmentepithels (RPE) und der Chorioidea (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 23 sind HE-Färbungen von R-Haut und S-Haut der drei Genotypen dargestellt. Es konnte kein Unterschied in Bezug auf Hautdicke oder Pigmentierung der Haarfollikel erkannt werden.

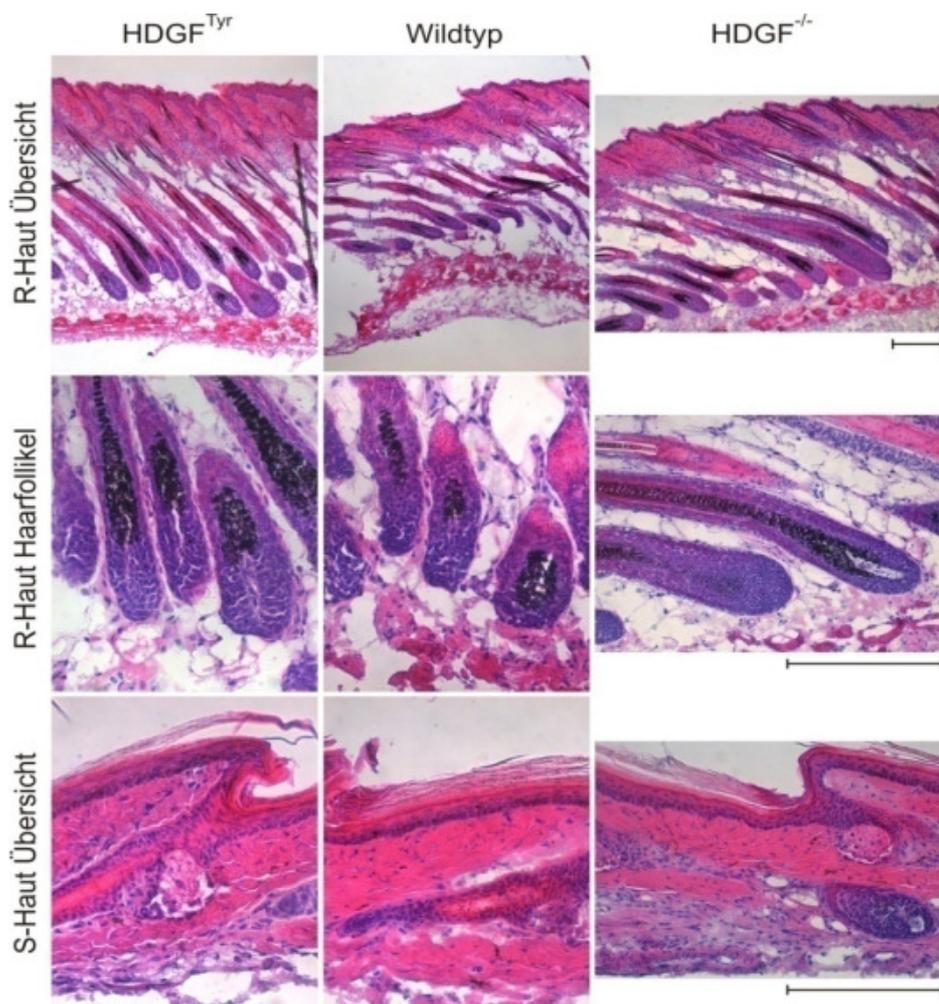


Abbildung 23: Histologische Analyse der HDGF^{Tyr}-, Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäuse. Dargestellt sind HE-Färbungen der Rückenhaut (R-Haut) und Schwanzhaut (S-Haut) der drei Genotypen. Die Bilder in der obersten Reihe wurden in 100 facher Vergrößerung, die Bilder darunter in 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Messbalken entsprechen 100 μ m.

Um eventuelle Unterschiede zwischen diesen Genotypen in Bezug auf Lokalisation und Anzahl der Melanozyten zu erkennen, wurden die Präparate der Rücken- und Schwanzhaut zur besseren Darstellung der Melanozyten mit α -3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) angefärbt. Die DOPA-Färbung dient dem Nachweis von Melanozyten und beruht darauf, dass DOPA von dem Melanozyten-spezifischen Protein Tyrosinase als Substrat für die Pigmentbiosynthese verwendet werden kann. In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass im Präparat der Rückenhaut Melanozyten nur im Bereich der Haarfollikel zu finden sind. In der Schwanzhaut findet man zusätzlich Melanozyten im Übergang zwischen Epidermis und Dermis. Es konnte jedoch kein Unterschied in Bezug auf Menge und Lokalisation der Melanozyten beobachtet werden.

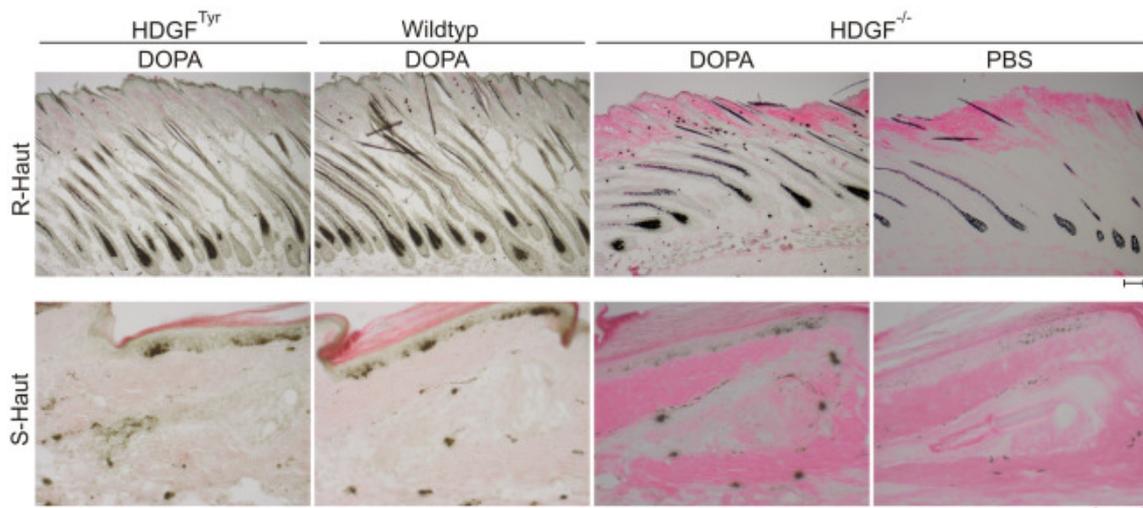


Abbildung 24: DOPA-Färbung von Rücken- und Schwanzhaut von HDGF^{Tyr}-, Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen.

Die Hautpräparate wurden zuerst mit 0,1% DOPA in PBS inkubiert und dann mit Eosin gefärbt. Die Kontrolle wurde nur mit PBS inkubiert und ebenfalls mit Eosin gegengefärbt. Die Bilder in der oberen Reihe wurden mit 100 facher, die Bilder darunter mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Messbalken entsprechen 100 μ m.

Mäuse der Genotypen HDGF^{Tyr} (n=21) und Wildtyp (n=24) wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren beobachtet. Keines der Tiere entwickelte über diesen Zeitraum spontan Melanome oder andere Hautveränderungen.

4.2.1.6 Isolierung kutaner Melanozyten aus $HDGF^{Tyr-/-}$, Wildtyp- und $HDGF^{-/-}$ -Mäusen

Die Isolierung der kutanen Melanozyten erfolgte aus der Epidermis von 1-3 Tage alten Mäusen. Erst nach 7-10 Tagen in Kultur war eine deutliche Pigmentierung der Zellen erkennbar.

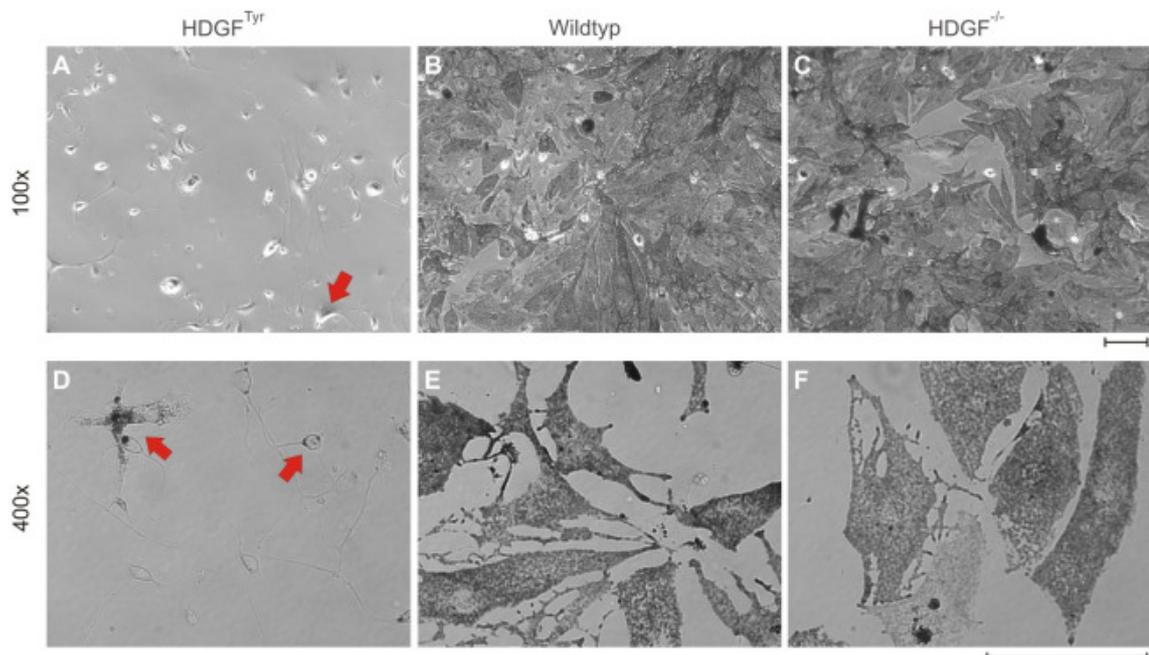


Abbildung 25: Darstellung isolierter Melanozyten aus $HDGF^{Tyr-/-}$, Wildtyp- und $HDGF^{-/-}$ -Mäusen.

Die Melanozyten wurden nach der Isolation 30 Tage in Kultur gehalten, bevor diese fixiert und fotografiert wurden. Die Bilder in der oberen Reihe wurden mit 100 facher, die darunter mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Messbalken entsprechen 100 μ m.

Überraschenderweise zeigte sich ein Unterschied in der Kultivierbarkeit der Melanozyten der verschiedenen Genotypen. Isolierte primäre Melanozyten aus Wildtyp- und $HDGF^{-/-}$ -Mäusen zeigten nach Inkubation der Zellen über 30 Tage eine starke Vermehrung und eine deutliche Pigmentierung (Abbildung 25 B, C). Die Detailaufnahmen verdeutlichen die starke Pigmentierung der Wildtyp und $HDGF^{-/-}$ Melanozyten und zeigen eine zum Teil flächige, zum Teil dendritische Form der Zellen (E, F). Die aus den $HDGF^{Tyr-/-}$ -Mäusen isolierten Zellen bilden keine konfluente, pigmentierte Zellschicht. Nach gleicher Inkubationszeit waren lediglich einzelne abgerundete und nur selten pigmentierte Zellen zu finden (roter Pfeil in A). Die Detailaufnahme zeigt, dass die wenigen pigmentierten Zellen sich in ihrer Form und Ausdehnung deutlich von den Wildtyp- und

HDGF^{-/-}-Melanozyten unterscheiden. Die HDGF^{Tyr}-Melanozyten sind deutlich kleiner und dendritischer (rote Pfeile in D).

Die Unfähigkeit der Melanozyten aus transgenen Mäusen *in vitro* zu überleben ist die einzige Veränderung, die aufgrund des Transgens beobachtet werden konnte. Diese Veränderung deutet aber darauf hin, dass die Expression des Tyr-HDGF Gen Konstruktes und damit eine Zunahme der HDGF Menge unter bestimmten Umständen einen Einfluss auf diesen Zelltyp hat.

4.2.2 Rückkreuzung und Analyse der HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}, Ink4a^{-/-} und HDGF^{-/-}/Ink4a^{-/-}-Mäuse

4.2.2.1 Allgemein

Da die Expression von HDGF in Melanozyten unter Kontrolle des Tyrosinase Promotors nicht zur Entstehung von Hautveränderungen, wie Melanomen, führte und keine veränderte Lokalisation oder Zunahme der Melanozyten beobachtet werden konnte, wurden die Mauslinien 889 und 7159 in die Ink4a-Knockout- (Ink4a^{-/-}) Mauslinie gekreuzt (zur Verfügung gestellt von Clemens Schmitt (Charité-Universitätsmedizin, Berlin) mit Genehmigung von Manuel Serrano (Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain)). Die Unterbrechung des Ink4a-Genlokus bewirkt eine verstärkte Neigung zur Tumorentwicklung. Des Weiteren wurde die HDGF^{-/-}-Maus in die Ink4a^{-/-}-Linie gekreuzt, um einen eventuellen Einfluss der HDGF-Defizienz auf die Tumorentstehung beurteilen zu können. Alle Mäuse waren lebensfähig, fertil und zeigten keine Auffälligkeiten in Bezug auf Haarentwicklung oder Fellfarbe.

4.2.2.2 Histologie der $HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}$, $Ink4a^{-/-}$ und $HDGF^{-}/Ink4a^{-/-}$ -Mäuse

Die histologische Analyse der R- und S-Haut der $HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}$, $Ink4a^{-/-}$ und $HDGF^{-}/Ink4a^{-/-}$ -Mäuse wurde anhand von HE- und DOPA-Färbungen von Kryoschnitten durchgeführt. Die Präparate der drei hier untersuchten Genotypen unterscheiden sich in Bezug auf Hautdicke oder Pigmentierung der Haarfollikel weder untereinander (Daten nicht gezeigt) noch im Vergleich zu den Präparaten der $HDGF^{Tyr}$ -, Wildtyp- und $HDGF^{-}$ -Mäuse (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24).

Die histologische Analyse der $Ink4a^{-/-}$ -Mäuse weist lediglich den bekannten Augenphänotyp auf, der sich durch eine unvollständige Regression des hyaloid vaskulären Systems, einhergehend mit einem Linsenkatarakt und einer Retinadysplasie, äußert (Cheong et al., 2006). In Abbildung 26 sind Bilder der Augenpräparate je einer Wildtyp-, $Ink4a^{-/-}$ -, $HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}$ - und $HDGF^{-}/Ink4a^{-/-}$ -Maus dargestellt. Das Bild des Wildtyp Auges zeigt den Querschnitt durch ein gesundes Auge mit einer normalen Retina (grüner Pfeil in A). In Teilabbildung B-D ist die Retinadysplasie in den Präparaten der $Ink4a^{-/-}$ -Mäuse deutlich zu erkennen. Die Retina ist aufgefalteter, verdickt und die charakteristische Anordnung der Zellschichten ist kaum noch gegeben (grüne Pfeile in B-D). Weiter ist zu erkennen, dass sich im Auge der $Ink4a^{-/-}$ -Mäuse große vaskuläre Strukturen vom optischen Nerv hin zum posterioren Teil der Linse erstrecken (roter Pfeil in B-D). Da in nicht-albino Mäusen auch pigmentierte Zellen in diesen vaskulären Strukturen zu finden sind, wurden die Augen $HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}$ -, $Ink4a^{-/-}$ - und $HDGF^{-}/Ink4a^{-/-}$ -Mäuse verglichen um einen eventuellen Einfluss des transgenen HDGFs auf die pigmentierte Zellmasse zu untersuchen. Es konnte jedoch in Bezug auf die Pigmentierung kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden.

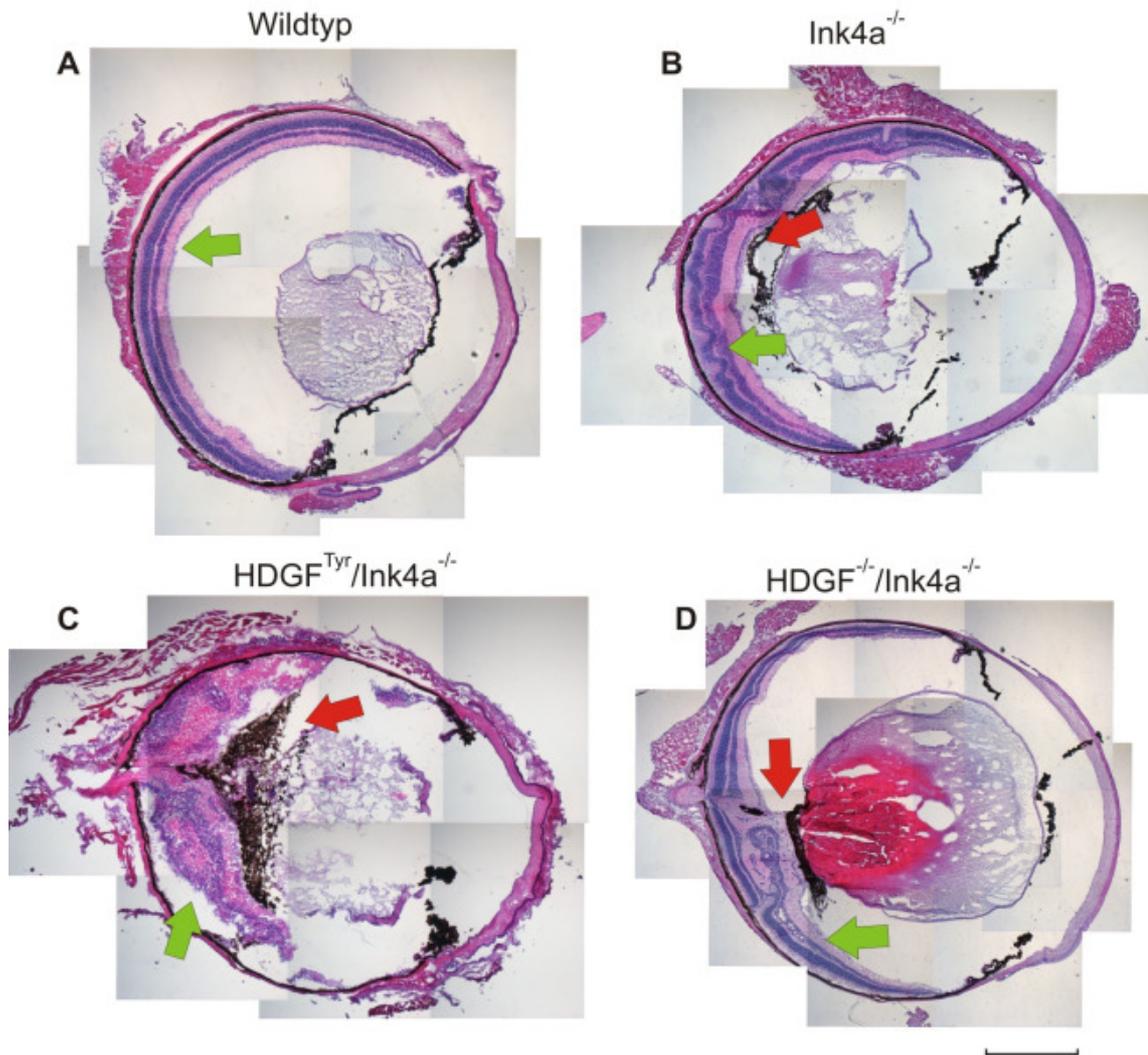


Abbildung 26: HE-Färbung der Augenpräparate einer Wildtyp-, $Ink4a^{-/-}$ -, $HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}$ -, und $HDGF^{-/-}/Ink4a^{-/-}$ -Maus.

Dargestellt sind die HE-Färbungen von 10 μm dicken Kryoschnitten. Die roten Pfeile zeigen auf die im Auge vorliegende Zellmasse; die grünen Pfeile deuten auf die Retinadysplasie (B-D) bzw. auf die intakte Retina in A. Die Übersichten der Augenschnitte setzen sich aus Einzelbildern zusammen, die mit einer 100 fachen Vergrößerung aufgenommen wurden. Der Messbalken entspricht 1 mm.

$Ink4a^{-/-}$ -Mäuse haben nur eine Lebenserwartung von maximal zwölf Monaten, da sie dazu tendieren, Lymphome und Sarkome zu entwickeln (Serrano et al., 1996). Des Weiteren wurde die Ausbreitung der Lymphome auf die Leber beschrieben (Schmitt et al., 1999). Das Organ zeigt sich durch die Infiltrierung von Lymphomzellen ins gesamte Leberparenchym stark vergrößert. Die Tumorinzidenz, sowie die Größe von Leber und Milz von erkrankten Tieren unterscheiden sich nicht zwischen $HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}$ - und $Ink4a^{-/-}$ - und $HDGF^{-/-}/Ink4a^{-/-}$ -Mäusen. Außerdem besteht kein Unterschied in Bezug auf die Lebenserwartung (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 UVB-Bestrahlung

4.2.3.1 Makroskopische Analyse der UVB-bestrahlten Mäuse

Die bisher durchgeführten histologischen Analysen ergaben keinen Hinweis auf einen Einfluss der zusätzlichen HDGF-Expression in Melanozyten. Die Behandlung von Mäusen mit UVB-Strahlen bietet die Möglichkeit die Hautzellen zu schädigen und so in bestimmten Genotypen Hautveränderungen zu induzieren. Für die Bestrahlung der Mäuse mit UVB wurden jeweils Tiere aus beiden transgenen Linien (889 und 7159) verwendet. Von den auf Ink4a Hintergrund zurück gekreuzten Mäusen wurden nur heterozygote Mäuse verwendet (HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-}, Ink4a^{+/-} und HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-}), da Ink4a^{-/-}-Mäuse nach einer solchen Behandlung vermehrt und verfrüht Sarkome entwickeln. Die weiter verkürzte Lebensdauer dieser Tiere könnte zu gering sein, um eine melanozytäre Veränderung zu entwickeln. Des Weiteren wurden Mäuse auf Wildtyp-Hintergrund behandelt (HDGF^{Tyr}, Wildtyp und HDGF^{-/-}). Alle Genotypen wurden im Alter von 2-3 Tagen einmalig mit einer Dosis von 6,14 kJ/m² UVB auf den Rücken bestrahlt. Die zu diesem Zeitpunkt noch nackten Mäuse entwickelten ein UV-Erythem (Sonnenbrand), das nach 6-8 Tagen zur Abschälung der Haut führte. Es trat keine Blasenbildung oder Bildung von offenen Wunden auf. Die behandelten Mäuse zeigen normalen Haarwuchs. Ab einem Alter von acht Monaten konnte beobachtet werden, dass am Rücken und am Schwanz der HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-}, Ink4a^{+/-}, und HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-}-Mäuse verdickte, pigmentierte Hautveränderungen auftraten, die bei Mäusen der Genotypen HDGF^{Tyr}, Wildtyp und HDGF^{-/-} nicht beobachtet werden konnten. Abbildung 27 zeigt exemplarisch für die drei behandelten Genotypen die entstandenen Hautveränderungen (rote Pfeile). Die großen, flächig-schwarzen Hautstellen (grüne Pfeile) sind keine Hautveränderungen, sondern stellen Bereiche dar, in denen sich der Haarzyklus in der anagenen Phase befindet. In diesem Stadium des Haarzyklus sind die Haarfollikel stark pigmentiert und die Haut erscheint schwarz.

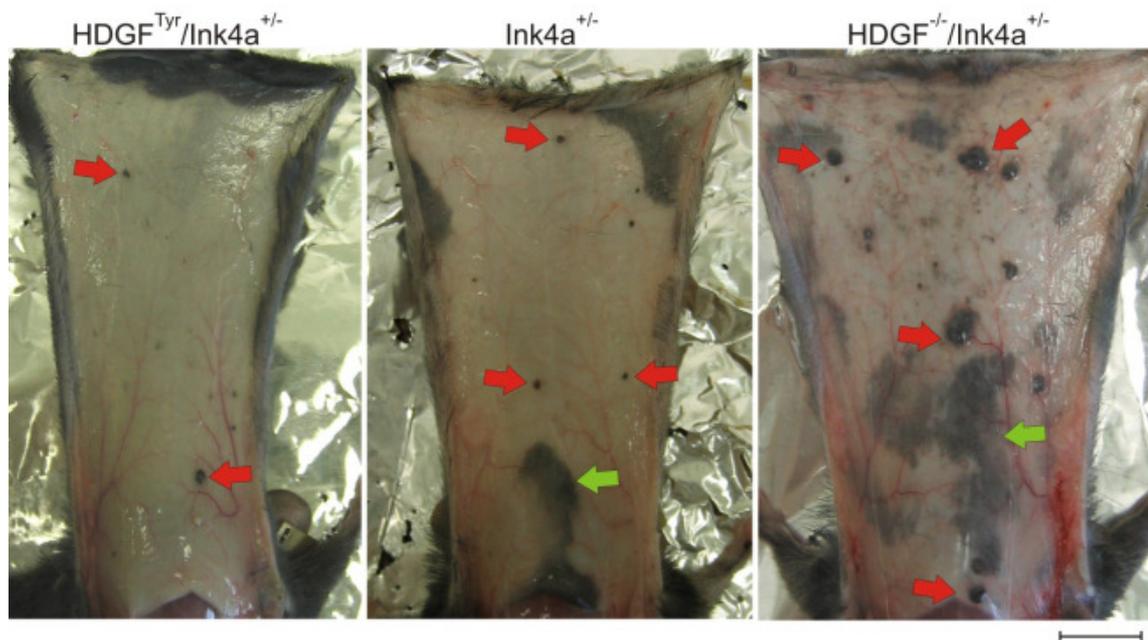


Abbildung 27: Darstellung der durch UVB-Bestrahlung induzierten Hautveränderungen. Die Rücken­haut wurde von der Innenseite fotografiert. Die roten Pfeile zeigen auf pigmentierte Hautveränderungen; die grünen Pfeile deuten auf Bereiche mit Haarfollikeln in der anagenen Phase des Haarzyklus. Der Messbalken entspricht 1 cm.

4.2.3.2 Statistische Analyse der UVB-induzierten Hautveränderungen

Die Häufigkeit und Größe der auftretenden Hautveränderungen wurden dokumentiert, den Genotypen ($\text{HDGF}^{\text{Tyr}}/\text{Ink4a}^{+/-}$, $\text{Ink4a}^{+/-}$ und $\text{HDGF}^{-/-}/\text{Ink4a}^{+/-}$) nach sortiert und statistisch ausgewertet. Das Ergebnis der Auflistung ist in Abbildung 28 A dargestellt und deutet darauf hin, dass die $\text{HDGF}^{-/-}/\text{Ink4a}^{+/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den $\text{Ink4a}^{+/-}$ - und den $\text{HDGF}^{\text{Tyr}}/\text{Ink4a}^{+/-}$ -Mäusen mehr und größere Hautveränderungen entwickelten.

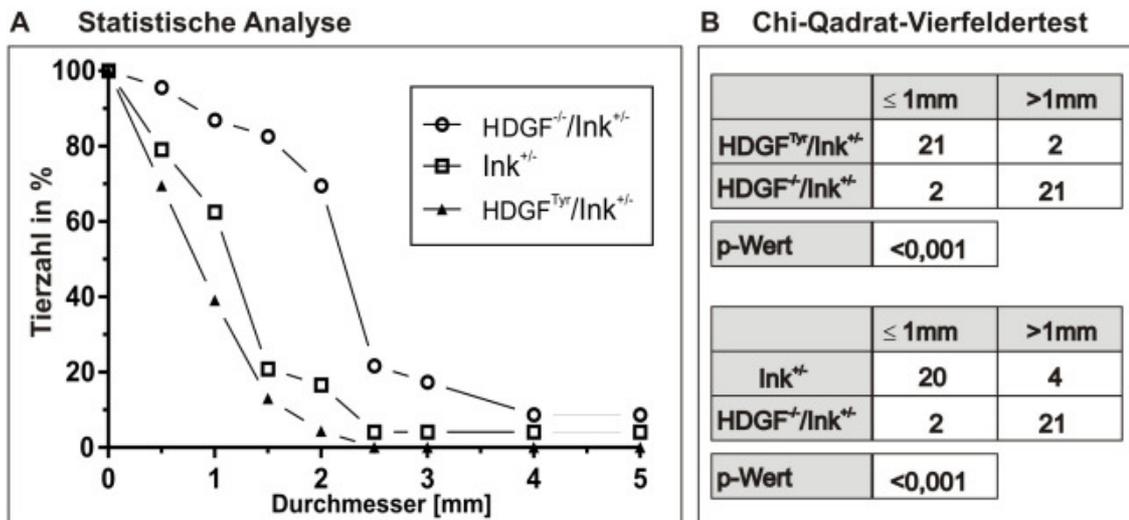


Abbildung 28: Statistische Analyse der Hautveränderungen der UVB-behandelten Mäuse. In A wurde der Durchmesser der Hautveränderungen in mm gegen die Tierzahl in % aufgetragen. B zeigt die Überprüfung auf Signifikanz mit Hilfe des Chi-Quadrat-Vierfeldertests. Für die Analyse wurden folgende Tierzahlen verwendet: HDGF^{Tyr}/Ink^{+/-} n= 23; Ink^{+/-} n=24; HDGF^{-/-}/Ink^{+/-} n=23.

Mittels Chi-Quadrat-Vierfeldertest kann untersucht werden, ob zwei Gruppen sich in einem Merkmal signifikant unterscheiden. Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Vierfeldertestes weist einen signifikanten ($p < 0,001$) Unterschied zwischen den Genotypen HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-} und HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-} und den Genotypen Ink4a^{+/-} und HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-} auf (Abbildung 28 B). Zwischen den Genotypen HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-} und Ink4a^{+/-} dagegen besteht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Größe der Hautveränderungen. Demnach entwickelten die HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-} Mäuse nach neonataler UVB-Bestrahlung eine kaum geringere Anzahl an Hautveränderungen als die gleich behandelten Ink4a^{+/-} Mäuse. Die UVB bestrahlten HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-} Mäuse entwickelten jedoch im Vergleich zu beiden Genotypen (HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-} und Ink4a^{+/-}) signifikant mehr und größere Hautveränderungen, wobei der Unterschied zu den Ink4a^{+/-} Mäusen etwas geringer war.

4.2.3.3 Histologische Analyse der pigmentierten Hautveränderungen

Die Hautveränderungen der UVB behandelten Mäuse wurden entnommen und für die Anfertigung von Schnitten in Paraffin eingebettet.

In Abbildung 29 sind exemplarisch für die Genotypen HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-}, Ink4a^{+/-} und HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-} die HE-Färbungen der pigmentierten Hautveränderungen der Rückenhaut dargestellt. In den Übersichtsbildern der HE-Färbungen (A, C, E) ist zu erkennen, dass die Hautveränderungen nicht uniform pigmentiert sind. Vielmehr ähneln die Veränderungen stark humanen Epidermoidzysten, an deren Rändern und zum Teil auch im Inneren pigmentierte Bereiche zu erkennen sind (grüne Pfeile in A, C, E). Die dunkle Farbe des Pigments macht eine histologische Beurteilung des Gewebes unmöglich, weshalb Folgeschnitte zu jedem Präparat vor der HE-Färbung in einer Bleichlösung inkubiert wurden. Die Übersichtsbilder (B, D, F) der geblichenen Präparate zeigen, dass die dunkle Färbung des Pigments geblichen werden konnte und kein Pigment mehr zu erkennen ist (grüne Pfeile). Die HE-Färbung der geblichenen Präparate zeigt auch, dass im Inneren der Zyste hauptsächlich verhorntes Gewebe zu finden ist, in dem keine Zellkerne oder zellulären Strukturen erkannt werden können (gelbe Pfeile in Abbildung 4.21 G, H, I, J). Dahingegen ist bei einem Vergleich der pigmentierten Randbereiche zu erkennen, dass das Pigment um Zellkerne herum lokalisiert ist (rote Pfeile in M, N, O, P, Q, R).

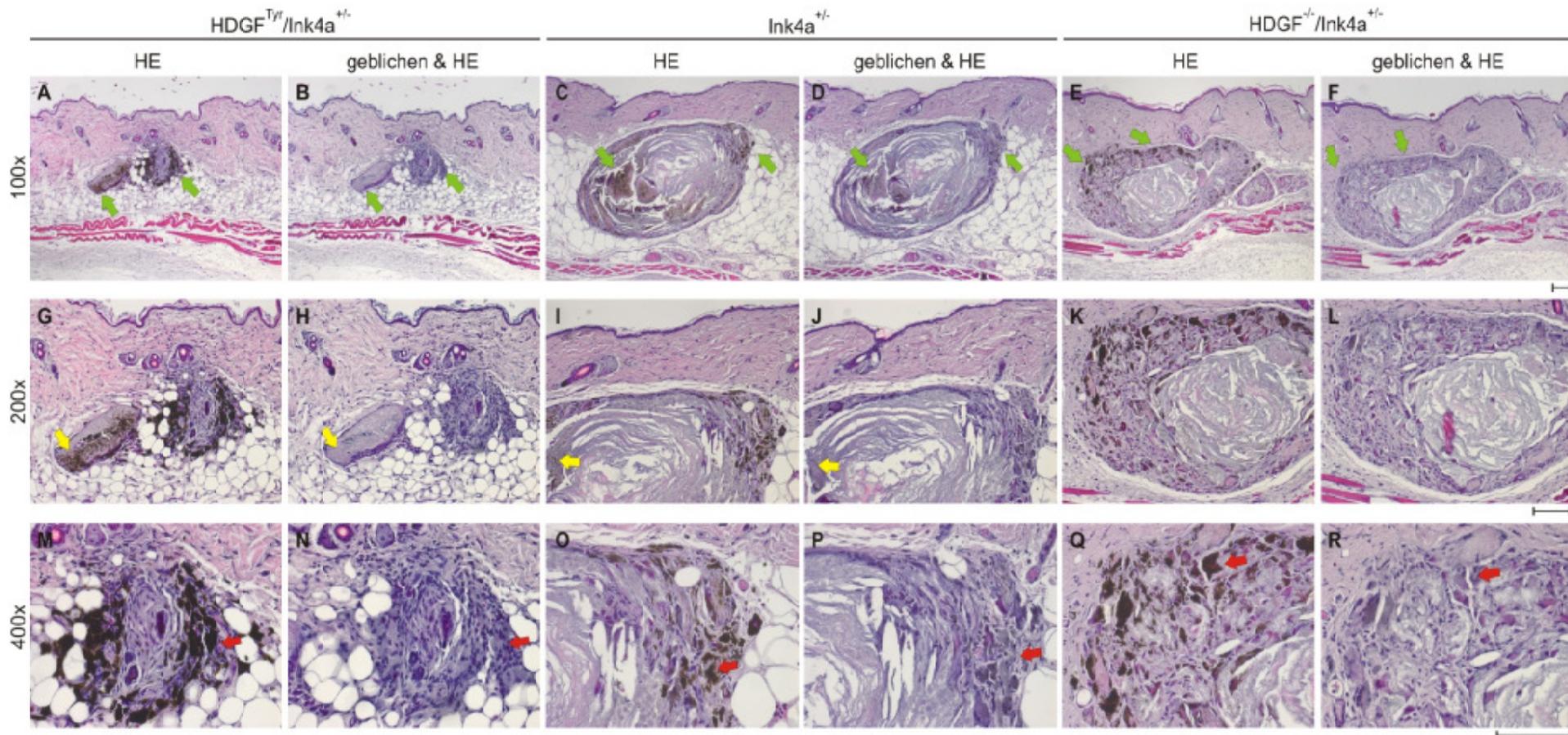


Abbildung 29: Darstellung der Veränderung der Rückenhaut nach neonataler UVB-Bestrahlung von HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-}, Ink4a^{+/-} und HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-} Mäusen.

4 µm dicke Paraffinschnitte jedes Genotyps wurden HE gefärbt. Die jeweiligen Folgeschnitte wurden zunächst geblichen und anschließend HE gefärbt. Die Übersichtsbilder (obere Reihe) wurden mit 100 facher Vergrößerung, die Detailbilder in 200 facher (mittlere Reihe) bzw. 400 facher Vergrößerungen aufgenommen. Die Messbalken entsprechen 100 µm.

Die Expression von HDGF in den Hautveränderungen wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen der Folgeschnitte zu den Präparaten aus Abbildung 29 untersucht und ist in Abbildung 30 dargestellt.

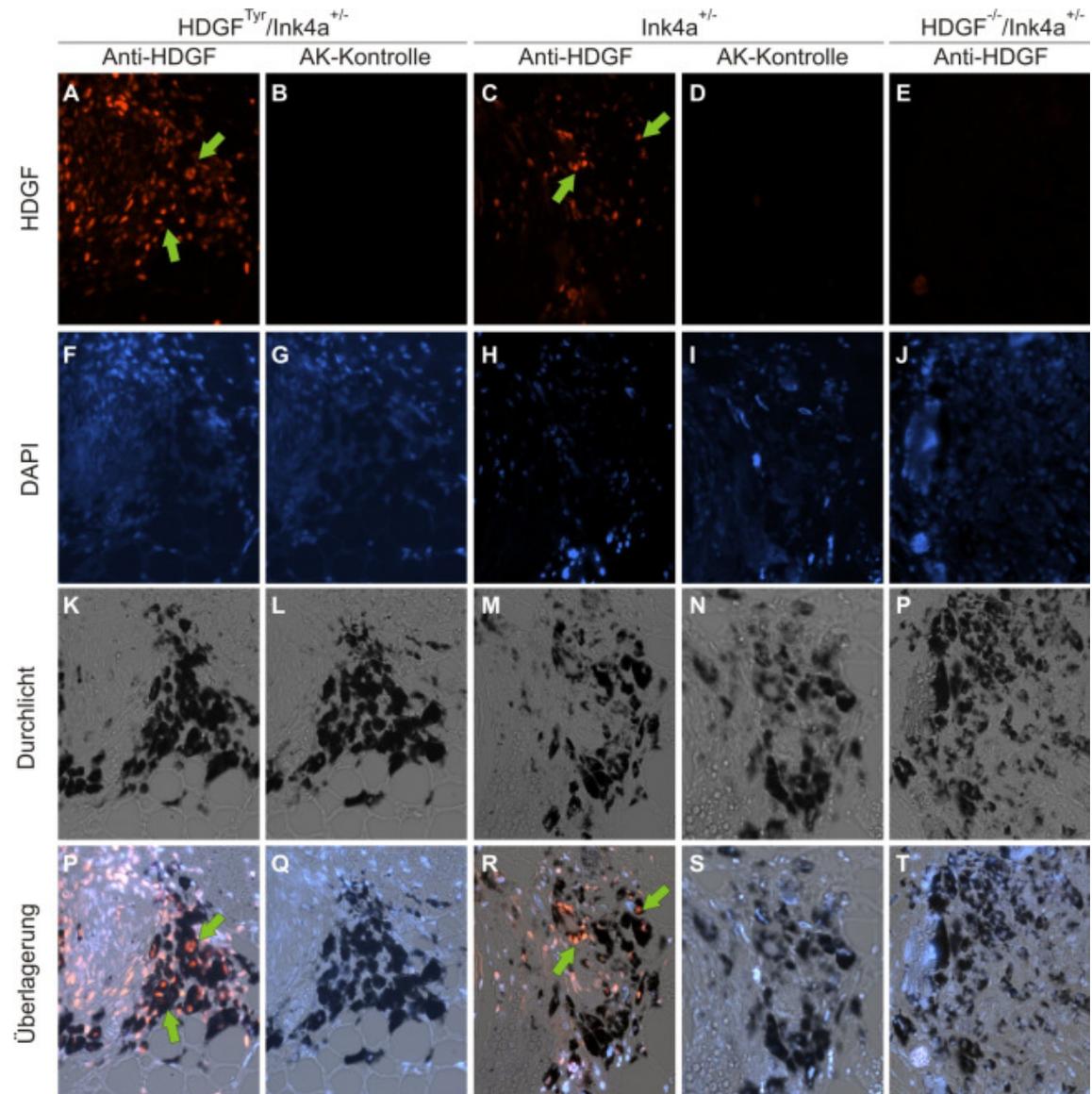


Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung der Hautveränderungen von HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-}-, Ink4a^{+/-}- und HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-}-Mäusen.

Dargestellt ist die Detektion von HDGF in den pigmentierten Geweben aus Abbildung 29. Zu den HDGF-Färbungen ist jeweils in der Spalte daneben die dazugehörige AK Kontrolle abgebildet. In der oberen Reihe ist die HDGF Färbung (rot), darunter die Anfärbung der Zellkerne durch DAPI (blau) und die Durchlichtbilder abgebildet. In der untersten Reihe ist die Überlagerung der jeweils darüber abgebildeten Bilder dargestellt. Die grünen Pfeile zeigen auf HDGF-positive Zellkerne im Bereich der Pigmentierung. Die Detektion von HDGF erfolgte durch Inkubation mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 (AK-Kontrolle nur mit dem 2.AK inkubiert). Die Bilder wurden mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Der Messbalken entspricht 100 µm.

Die HDGF-Immunfluoreszenzfärbung der Folgeschnitte zeigt, dass HDGF mit Hilfe des HDGF-spezifischen Antikörpers nur in den Präparaten der

HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-}- und Ink4a^{+/-}-Mäuse detektiert werden konnte. Trotz des Pigments ist die Färbung mehrerer Zellkerne zu erkennen, die von schwarzem Pigment umgeben sind (grüne Pfeile). Im Präparat der HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-}-Maus konnte wie erwartet kein HDGF nachgewiesen werden.

4.3 Plattenepithelkarzinom-Modell (PEK-Modell)

4.3.1 HDGF Expression in humanen PEK

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es die Expression von HDGF in einem noch nicht auf HDGF Überexpression untersuchten humanen Tumor zu analysieren. Im Falle einer Überexpression sollten diese Tumore in HDGF-defizienten und Wildtyp-Mäusen durch Behandlung mit einem Karzinogen induziert werden. Der zweite Teil dieser Dissertation beschäftigt sich mit der HDGF-Expression in humanen Plattenepithelkarzinomen (PEK) und der Fragestellung, ob sich HDGF exprimierende PEK von HDGF defizienten PEK unterscheiden.

Präparate humaner PEK wurden freundlicherweise von Prof. Dr. N. Wernert (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt. Von diesen wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und immunhistochemisch gegen humanes HDGF gefärbt. In Abbildung 31 ist zum einen ein Randbereich eines humanen PEK (A, B, E, F), und zum anderen ein Bereich mitten im PEK (C, D, G, H) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass HDGF im Randbereich des PEK in einigen Zellen der Epidermis (Pfeile in B) exprimiert wird und nukleär lokalisiert ist. Im Vergleich dazu konnte im PEK eine stark erhöhte HDGF-Expression detektiert werden (Pfeile in D). Die Lokalisation von HDGF ist hauptsächlich nukleär, allerdings weist der Tumor zusätzlich eine leichte, extranukleäre HDGF-Färbung auf (C, D), die im normalen Gewebe nicht zu erkennen ist (A, B). Die Spezifität des humanen HDGF-AK (huHDGF-AK) wurde durch Anfertigung einer AK-Kontrolle an Folgeschnitten überprüft und führte zu keinem Signal in den Präparaten.

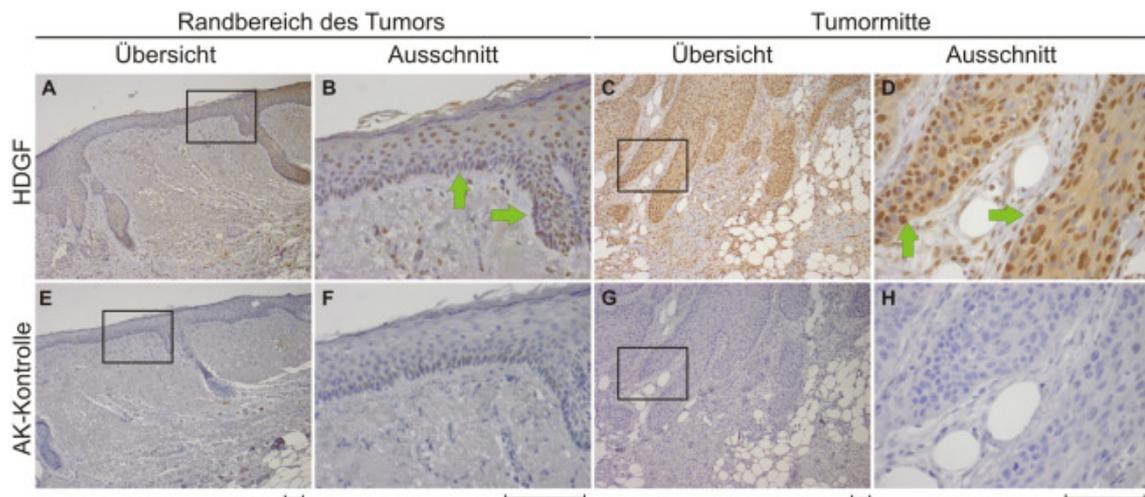


Abbildung 31: HDGF Immunhistochemie eines humanen Plattenepithelkarzinoms.

In humanen Plattenepithelkarzinomen (PEK) wurde HDGF mit Hilfe des huHDGF-Antikörpers detektiert. Die hauptsächlich nukleäre Färbung (grüne Pfeile) ist in den Abbildung B und D zu erkennen, während in den Bildern der Antikörperkontrolle kein Signal sichtbar ist (E-H). Die Detektion erfolgte mit Hilfe der Antikörper Kaninchen-anti-huHDGF und Ziege-anti-Kaninchenbiotinyliert. Für die Entwicklung wurden die Präparate in der Lösung des ABC-Kits und DAB inkubiert. Die Übersichtsbilder wurden mit 100 facher Vergrößerung aufgenommen, die Ausschnitte mit 400 facher Vergrößerung. Die Messbalken entsprechen 100 μm .

Zur besseren Beurteilung der humanen PEK in Bezug auf die Vaskularisierung der Tumore wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen gegen D240 (Podoplanin) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) angefertigt. Der anti-D240-AK bindet an das auf Endothelzellen von Lymphgefäßen vorkommende Sialoglycoprotein Podoplanin. Da Podoplanin spezifisch von Endothelzellen der Lymphgefäße, nicht aber von Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert wird, fand es schon vielfach Verwendung als spezifischer Marker für Lymphgefäße und Lymphangiogenese (Breiteneder-Geleff et al., 1999; Rodrigo et al., 2010). Der anti-VEGF-AK detektiert den Wachstumsfaktor VEGF-A, der in den Zellen der Blutgefäßepithelien, Makrophagen, aktivierten T-Zellen und einigen anderen Zellen exprimiert wird. VEGF-A wird in vielen Tumoren überexprimiert, fördert die Angiogenese und dadurch die Tumorprogression und Metastasierung. Die Expression von VEGF-A dient als spezifischer Marker für die Angiogenese in Tumoren (Takahashi and Shibuya, 2005; Maharaj et al., 2006).

Die Anfertigung der HE-Färbung diente der besseren histologischen Darstellung des Gewebes. Bilder aller Färbungen sind in Abbildung 32 zusammengestellt. Anhand der immunhistologischen Färbungen ist zu erkennen, dass HDGF in invasiven PEK stark exprimiert wird (E-H). Des Weiteren wird HDGF in diesen

Tumoren, wie auch in normalem Gewebe, in den Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert (gelbe Pfeile in H). Die D240- und VEGF-Färbungen zeigten, dass in den PEK einige Blutgefäße zu finden waren (gelbe Pfeile in P), während die Anzahl der Lymphgefäße gering war (gelber Pfeil in J, L). Die Spezifität der Antikörper konnte durch die Abwesenheit einer Färbung in der Antikörper-Kontrolle gezeigt werden.

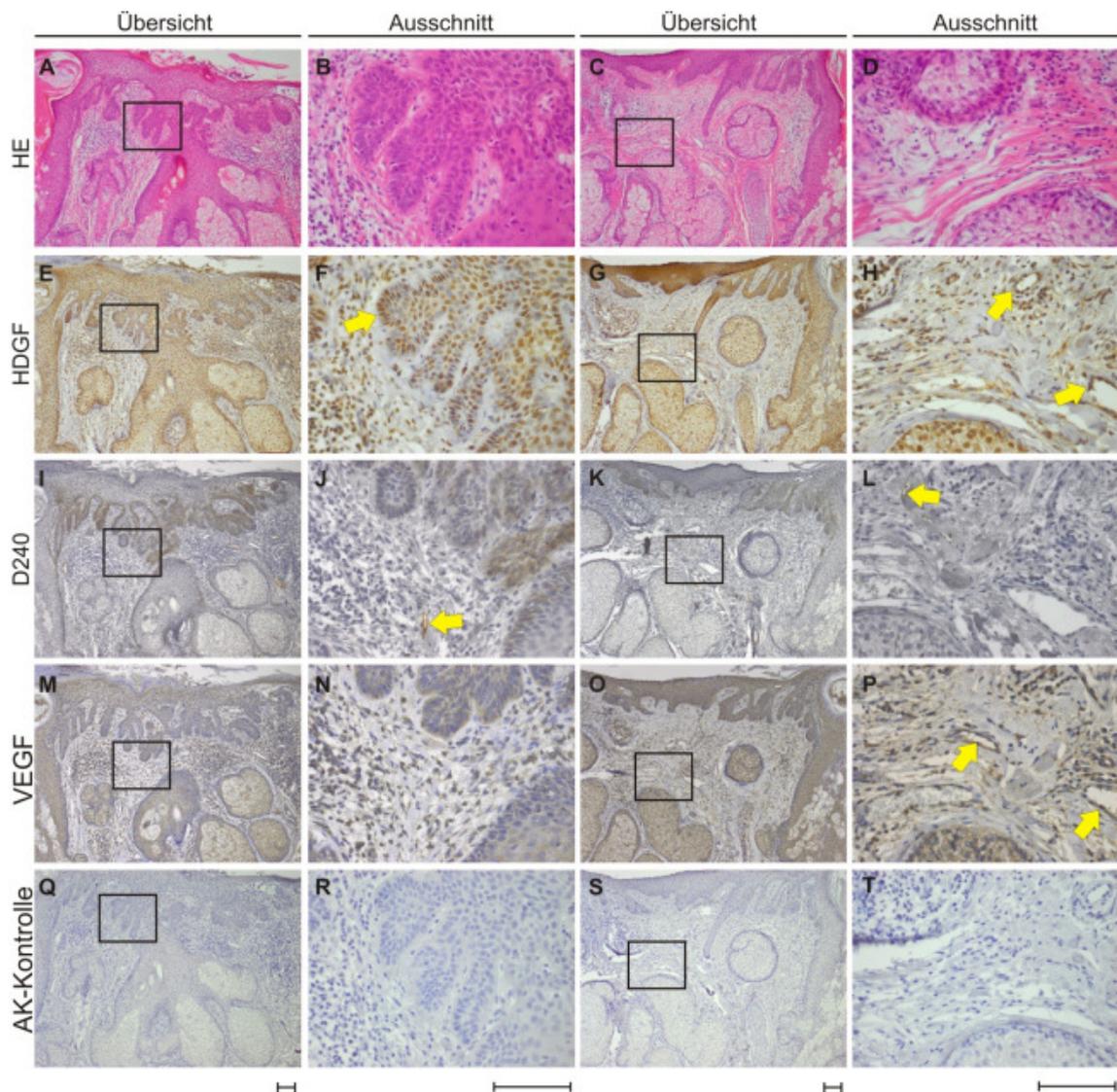


Abbildung 32: HE-Färbung und Immunhistochemie eines humanen Plattenepithelkarzinoms.

Dargestellt sind die Färbungen von Folgeschnitten eines humanen PEK: A-D HE-Färbung; E-H HDGF; I-L D240; M-P VEGF; Q-T AK-Kontrolle. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit Hilfe der entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper. Für die Entwicklung wurden die Präparate in der Lösung des ABC-Kits und DAB inkubiert. Die gelben Pfeile deuten auf die von dem jeweiligen Antikörper angefärbten Strukturen. In der ersten und dritten Spalte sind jeweils Übersichtsbilder (100 fache Vergrößerung), daneben die Ausschnittsvergrößerungen (400 fache Vergrößerung) abgebildet. Die Messbalken entsprechen 100 µm.

4.3.2 Plattenepithelkarzinom-Mausmodell

4.3.2.1 Induktion von Plattenepithelkarzinomen (PEK) in Mäuse

Beim Menschen entstehen PEK häufig in stark lichtgeschädigter Haut und aus Narbengewebe. In Mäusen können sie durch eine Behandlung mit 7,12-Dimethylbenzanthrazen (DMBA) induziert werden. Dafür wurden Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäuse verwendet. Im Alter von 2-4 Tagen erfolgte die einmalige Applikation von 40 µl einer 0,2%igen DMBA/Aceton Lösung auf den Rücken der Tiere. Die zu diesem Zeitpunkt noch nackten Mäuse entwickelten keine Hautschäden, wie z.B. offene Wunden, und zeigten normalen Haarwuchs.

4.3.2.2 Makroskopische Analyse der DMBA induzierten Hautveränderungen

Ab einem Alter von vier Monaten traten am Rücken der behandelten Mäuse warzenförmige Hautveränderungen auf, welche die Pathologie von PEK aufwiesen. Die Mäuse wurden rasiert und jede sichtbare Hautveränderung vermessen und dokumentiert. In Abbildung 33 ist exemplarisch für jeden Genotyp eine makroskopische Aufnahme der PEK von Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen dargestellt (rote Pfeile). Es konnte kein Unterschied in Bezug auf Größe oder Anzahl der PEK zwischen den Genotypen festgestellt werden.

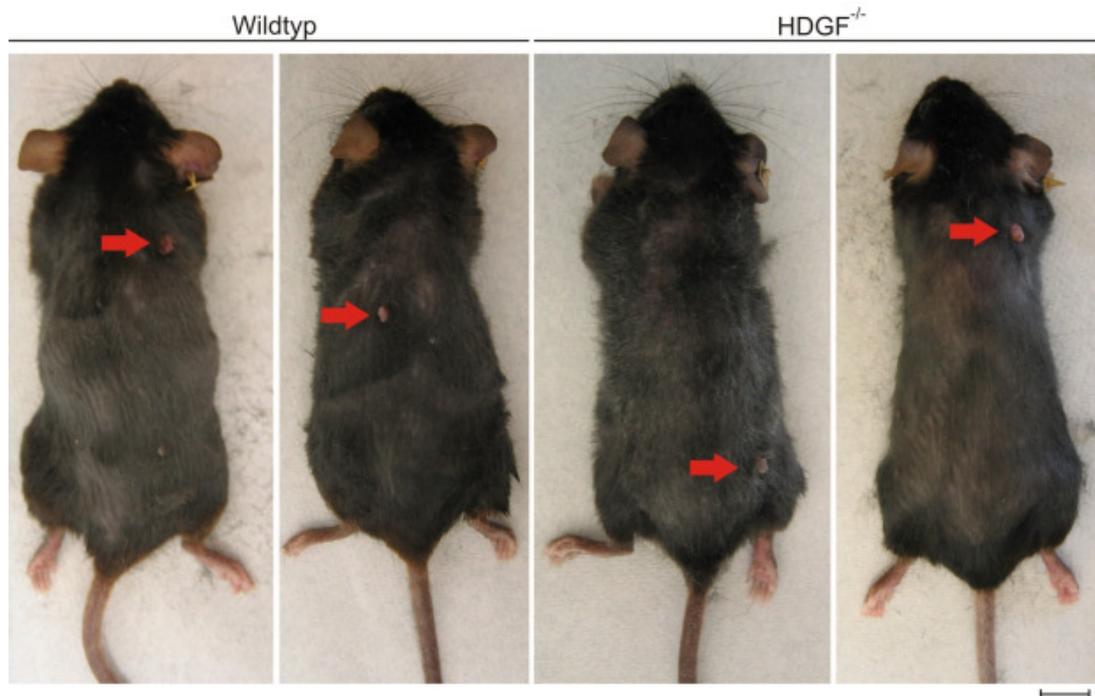


Abbildung 33: Plattenepithelkarzinome von Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen.

Rasierte Mäuse wurden zur Dokumentation der PEK photographiert. Die PEK sind deutlich als warzenartige Hautverdickungen zu erkennen (rote Pfeile). Der Messbalken entspricht 1 cm.

4.3.2.3 HDGF-Expression in murinen PEK

Für mikroskopische Analysen wurden die PEK entnommen, in Paraffin eingebettet und 4 µm dick geschnitten. Zunächst erfolgte eine immunhistochemische HDGF-Färbung, um zu überprüfen, ob die in den humanen PEK festgestellte Überexpression auch in den murinen Tumoren zu finden ist. In Abbildung 34 ist exemplarisch die HDGF-Färbung eines PEK im Vergleich zu gesunder Haut dargestellt. Im Bild der gesunden Haut (A) ist die für HDGF bekannte, nukleäre Lokalisation von HDGF in Zellen der Epidermis (A, grüner Pfeil), der Talgdrüse (A, roter Pfeil), des Haarschaftes (A, gelber Pfeil) und der Haarfollikel (A, schwarzer Pfeil) zu sehen. Im Übersichtsbild (B) ist ein PEK mit angrenzender gesunder Haut zu sehen. Die Tumorfrente wird durch die gestrichelte Linie hervorgehoben. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Bereich des Tumors HDGF verstärkt exprimiert wird. Die Vergrößerung (C) zeigt noch deutlicher den Unterschied zwischen der HDGF-Expression außerhalb des Tumors in der intakten Epidermis (C, grüner Pfeil) und dem

tumorösen Gewebe (C, gelber Pfeil). Im Tumor konnte für HDGF eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation festgestellt werden, wobei einige Zellen auch eine zytoplasmatische Färbung aufwiesen.

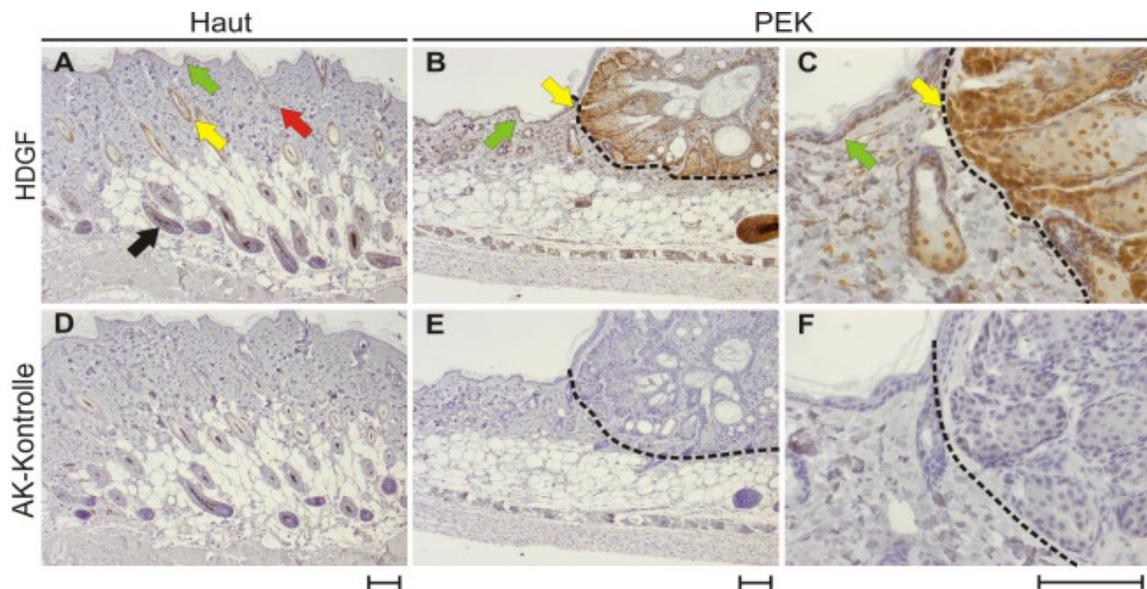


Abbildung 34: Immunhistochemische HDGF-Färbung von muriner Wildtyp-Haut im Vergleich zum PEK.

In der oberen Reihe ist die HDGF-Färbung von gesunder Haut (A) und einem induzierten PEK (B-C) dargestellt. Die untere Reihe zeigt die dazugehörigen AK-Kontrollen. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf der Tumorfront an. Die Detektion erfolgte durch Kombination der Antikörper Kaninchen-anti-HDGF und biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen mit dem ABC-Kit und DAB. Die Bilder A, B, D, E wurden mit 100 facher, die Bilder C und F mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Messbalken entsprechen 100 μm .

Der quantitative Nachweis der HDGF-Überexpression in PEK erfolgte durch eine vergleichende Westernblotanalyse von PEK und Haut von mehreren Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen. Hierfür wurden von jedem Tier ein PEK und eine Probe gesunder Haut entnommen. Die Proben wurden mit Hilfe des UltraTurrax® homogenisiert, der Gesamtproteingehalt bestimmt und je 40 μg Gesamtprotein eingesetzt. Abbildung 35 zeigt, dass in allen Lysaten der Wildtyp-PEK mehr HDGF enthalten war, als in den Proben der gesunden Haut. Außerdem wurde in den Lysaten der PEK eine Proteinvariante, die bei 43 kDa migriert, detektiert (roter Pfeil), die in den Proben der gesunden Haut nicht nachgewiesen werden konnte (weißer Pfeil). Dagegen wurde weder in den Lysaten der HDGF^{-/-}-PEK noch in den dazugehörigen Hautproben die beiden HDGF-Proteinvarianten nachgewiesen. Eine Quantifizierung der 38 kDa HDGF-Proteinvariante der Hautproben (=100%) und der zugehörigen PEK-Probe ergab, dass diese in PEK um das 1,37 bis 2,5 fache erhöht war. Zusätzlich

wurde das Verhältnis der 38 kDa und 43 kDa HDGF-Proteinvarianten bestimmt. Die 43 kDa enthält das 0,54 bis 0,67 fache an Protein, wie die 38 kDa Proteinvariante.

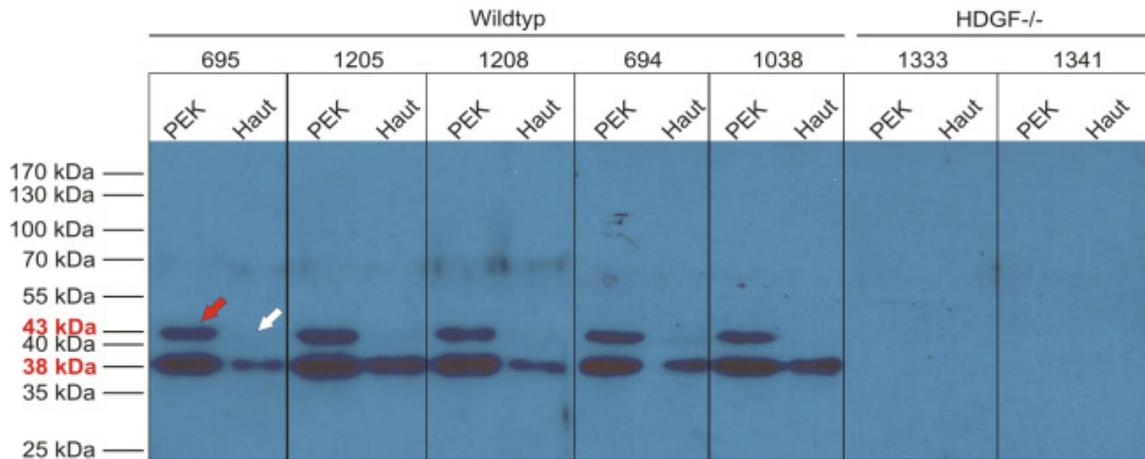


Abbildung 35: Westernblotanalyse von PEK und Haut von Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen. Zum Vergleich der HDGF-Expression in PEK und gesunder Haut wurden von jedem Tier jeweils Lysate eines PEK und gesunder Haut aufgetragen. Für die Westernblotanalyse wurden 40 µg Gesamtprotein je Probe eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch die Antikörper Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-POX. Die Entwicklung erfolgte durch Inkubation mit ECL. In allen Proben der Wildtyp-Mäuse konnte das bei 38 kDa migrierende HDGF detektiert werden. Zusätzlich dazu ist eine 43 kDa große Proteinvariante (roter Pfeil) in den Proben der Wildtyp-PEK zu sehen, die in den jeweiligen Hautproben nicht detektiert werden konnte (weißer Pfeil). Die Nummern 695, 1205, 1208, 694, 1038, 1333 und 1341 stehen für die Tiere, denen die Proben entnommen wurden.

4.3.2.4 Histologie und Pathologie der PEK

Für die histologische Beurteilung wurden mehrere PEK von Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen HE gefärbt. Die pathologische Beurteilung mehrerer Tumore ergab keine Unterschiede zwischen den Genotypen in Bezug auf Größe und Invasivität. Die entnommenen Tumore bestehen aus Zellen des Plattenepithels, der Haarfollikel und der Talgdrüsen, sind meistens fraglich invasiv, selten peripher invasiv, und hochdifferenziert. Immunhistochemisch wurden HDGF, VEGF-A und Podoplanin in den Geweben in Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Präparaten detektiert (Abbildung 36). Anhand der immunhistologischen Färbungen ist zu erkennen, dass HDGF hauptsächlich im Bereich der Keratinozyten der PEK stark exprimiert wird (gelbe Pfeile in F). Des Weiteren wird HDGF in diesen Tumoren, wie auch in normalem Gewebe, in den Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert (roter Pfeil in F). In den HDGF^{-/-}-Präparaten konnte kein HDGF

detektiert werden (G, H). Die Podoplanin und VEGF Färbungen zeigten, dass in den PEK beider Genotypen einige Blutgefäße (gelbe Pfeile in N und P) und Lymphgefäße zu finden waren (gelbe Pfeile in J, K, L). Die Inkubation mit dem Podoplanin-AK führte spezifisch zur Anfärbung der Lymphgefäße, da die benachbarten, mit Erythrozyten gefüllten Blutgefäße, keine Endothelzellularfärbung aufwiesen (roter Pfeil in J). Die Spezifität der Antikörper konnte durch die Abwesenheit einer Färbung in der Antikörper-Kontrolle gezeigt werden.

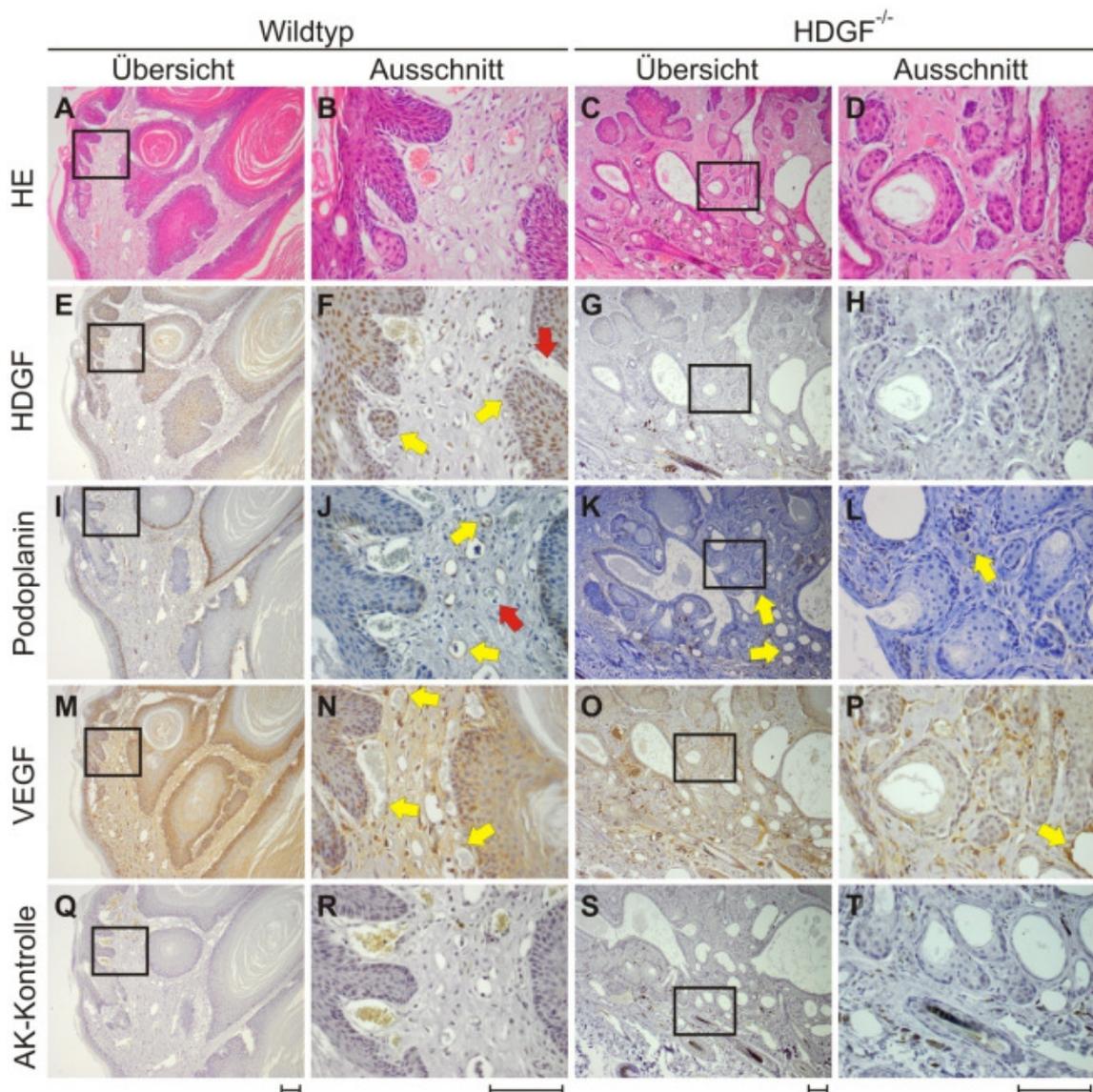


Abbildung 36: Mikroskopische Analyse der Plattenepithelkarzinome.

Dargestellt sind Präparate der Genotypen Wildtyp und HDGF^{-/-}. In der ersten und dritten Spalte sind die Übersichtsaufnahmen und in der jeweils rechts anstehenden Spalte die Detailaufnahmen zu sehen. In der obersten Reihe ist die HE-Färbung, darunter sind die immunhistochemischen Färbungen gegen HDGF, Podoplanin und VEGF sowie die AK-Kontrolle abgebildet. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit Hilfe der entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper. Für die Entwicklung wurden die Präparate in der Lösung des ABC-Kits und DAB inkubiert. Die Pfeile deuten auf die von dem jeweiligen Antikörper angefärbten Strukturen. Die Übersichtsbilder wurden mit 100 facher, die Detailbilder mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Messbalken entsprechen 100 µm.

4.3.2.5 Statistik der Blut- und Lymphgefäße der PEK

In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von HDGF in Tumoren und der Tumorangiogenese beschrieben. Die immunhistochemisch angefärbten Blut- und Lymphgefäße von je acht Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen wurden blind gezählt und statistisch ausgewertet. Eine Unterscheidung fand statt zwischen Gefäßen, die im Tumor, und solchen, die außerhalb des Tumors zu finden waren. In Abbildung 37 ist die statistische Auswertung der ausgezählten Blut- und Lymphgefäße abgebildet.

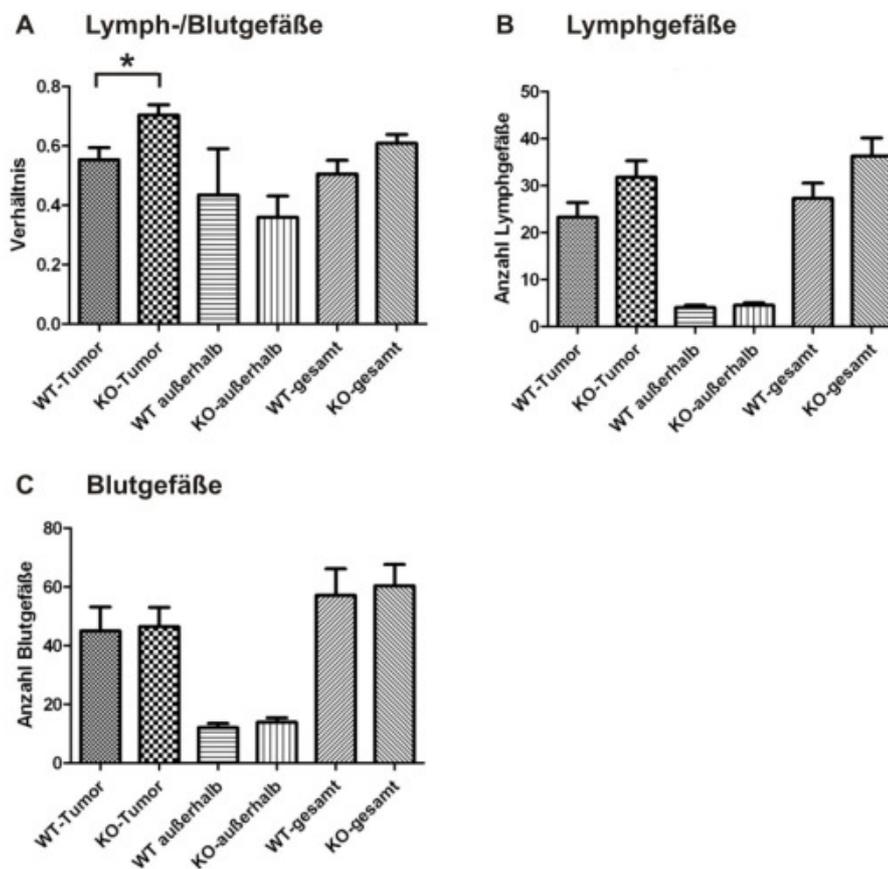


Abbildung 37: Statistische Analyse der Blut- und Lymphgefäße der PEK von Wildtyp- (WT) und HDGF^{-/-} (KO) Mäusen.

Die Blut- und Lymphgefäße von Wildtyp- und HDGF^{-/-}-PEK wurden blind ausgezählt. Nachdem ermittelt worden war, dass es sich um eine normalverteilte Auszählung handelte, erfolgte die Auswertung durch Anwendung des T-Testes. Der Stern steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den durch die Klammer verbundenen Säulen ($p < 0,05$).

In Teilabbildung A wurde das Verhältnis von Lymph- zu Blutgefäßen gebildet, um die Größe der einzelnen Tumore zu berücksichtigen. Es ist zu erkennen, dass in den PEK der HDGF^{-/-}-Mäuse das Verhältnis signifikant erhöht ist im

Vergleich zu den PEK der Wildtyp-Mäuse ($p < 0,05$). Die Erhöhung ist jedoch nicht auf eine geringere Anzahl an Blutgefäßen (Abbildung 37 C) in den PEK der HDGF^{-/-}-Mäuse zurückzuführen, sondern auf eine erhöhte Anzahl an Lymphgefäßen (Abbildung 37 B). Im angrenzenden Gewebe der PEK (außerhalb) konnte dagegen kein Unterschied in Bezug auf die Anzahl der Blut- oder Lymphgefäße festgestellt werden.

4.3.2.6 Weitere Befunde der DMBA behandelten Tiere

Die makroskopische und mikroskopische Begutachtung der inneren Organe der DMBA behandelten Mäuse ergab, dass bei ca. 10% der Wildtyp-Mäuse (11 von 102 Mäusen) Leberkarzinome auftraten, während in keiner der behandelten HDGF^{-/-}-Mäuse ($n=30$) eine solche Erkrankung beobachtet werden konnte. Des Weiteren entwickelten drei der Wildtyp Mäuse (ca. 3%) Ovarkarzinome. Auch diese Art von Tumor konnte in keiner der behandelten HDGF^{-/-}-Mäuse diagnostiziert werden. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des exakten Fisher-Testes (Abbildung 38 A). Diese ergab, dass die HDGF^{-/-}-Mäuse statistisch signifikant weniger Nicht-Hauttumore entwickelten, als die Wildtyp-Tiere ($p < 0,038$).

Von den Lebertumoren und Bereichen gesunder Leber wurden Proben entnommen und mit Hilfe einer Westernblotanalyse auf HDGF-Überexpression untersucht. In Abbildung 38 B ist das Ergebnis der Analyse dargestellt. Der Vergleich der Tumorproben (rote Pfeile) zu den Proben gesunder Leber (weiße Pfeile) lässt erkennen, dass in den Tumorproben mehr HDGF enthalten war. Diese Beobachtung wurde durch Quantifizierung der Banden der jeweiligen Leberproben (=100%) gegen die der zugehörigen Leberkarzinomproben näher untersucht. Die Quantifizierung ergab, dass HDGF in den Tumoren um das 1,17 bis 1,53 fache im Vergleich zu gesunder Leber erhöht war.

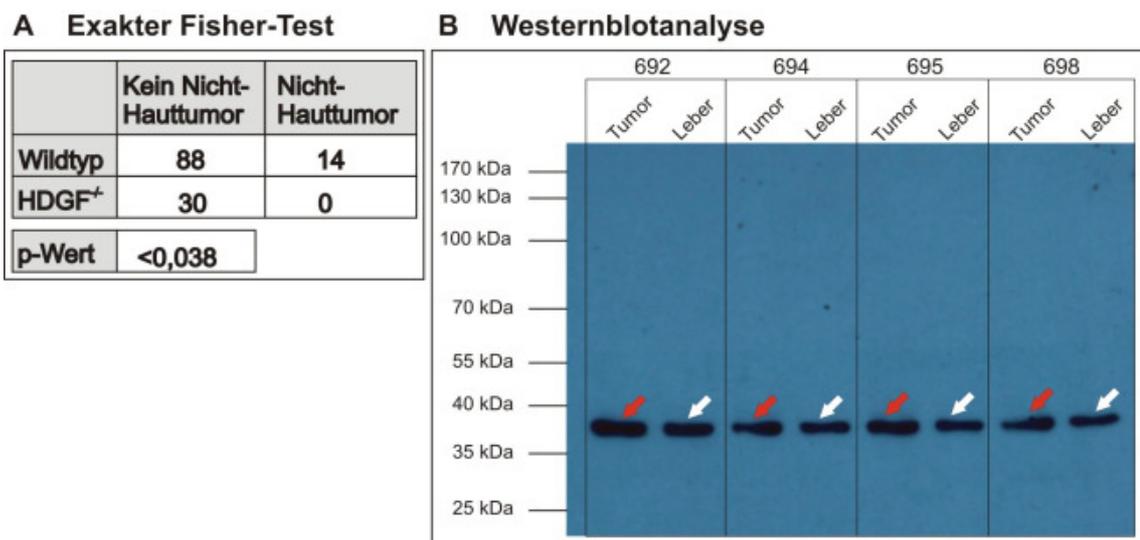


Abbildung 38: Exakter Fisher-Test zur Bestimmung der Signifikanz und Westernblotanalyse der DMBA-induzierten Lebertumore.

In A ist die Auswertung mit Hilfe des exakten Fisher-Tests dargestellt. Die Bewertung über den Vierfeldertest zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,038$) zwischen Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen in Bezug auf die Entstehung von Nicht-Hauttumoren. B zeigt die Westernblotanalysen der Lebertumore. Zum Vergleich der HDGF-Expression in Lebertumoren und gesunder Leber wurden von jedem Tier Tumorproben und Leberproben entnommen. Für die Westernblotanalyse wurden 40 µg Gesamtprotein je Probe eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch die Antikörper Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-POX, sowie durch Inkubation mit ECL. In allen Proben konnte das bei 38 kDa migrierende HDGF detektiert werden.

5. Diskussion

In den Industriestaaten sind nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) Krebserkrankungen für ~25% der Todesfälle verantwortlich und stellen nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Sie belasten die Gesundheitssysteme dadurch mit immensen Kosten. Eine Strategie effektivere Krebstherapien zu entwickeln basiert auf der Erforschung von Genetik und Biochemie der Tumore. Dabei spielen Proteine, die sich als diagnostische Marker für bestimmte Tumorarten eignen und eine bessere Einschätzung der Verläufe von Krebserkrankungen ermöglichen, eine immer größere Rolle. In diesem Zusammenhang konnte in mehreren Tumorarten, wie Nichtkleinzelligen-Lungentumoren (NSCLC) (Ren et al., 2004; Iwasaki et al., 2005), Melanomen (Bernard et al., 2003) sowie Leber- (Hu et al., 2003), Pankreas- (Uyama et al., 2006), Ösophagus- (Yamamoto et al., 2007) und Darmtumoren (Lepourcelet et al., 2005; Yamamoto et al., 2006) eine signifikant erhöhte Expression von HDGF beobachtet werden. Die Studien zeigten weiter, dass Patienten, deren Primärtumore HDGF in einem hohen Maß überexprimieren, eine signifikant schlechtere Genesungs- und Überlebenswahrscheinlichkeit haben. Diese Korrelation zwischen Überexpression von HDGF und negativer Prognose für den Patienten macht HDGF zu einem vielversprechenden prognostischen Tumormarker. Auf Grundlage dieser Beobachtungen ergibt sich die Frage, ob eine Erhöhung der HDGF-Proteinmenge oder eine HDGF-Defizienz ursächlich mit der Tumorentstehung und -progression verknüpft sind. Im ersten Teil werden die Ergebnisse zur Generierung und Analyse der HDGF^{Tyr}-Mauslinie diskutiert, in der HDGF in Melanozyten überexprimiert wird. In Teil 2 werden die Ergebnisse zur HDGF-Überexpression in humanen PEK und das entwickelte PEK-Mausmodell besprochen.

Teil 1 – Melanom-Mausmodell

Aus unkontrolliert proliferierenden Melanozyten geht die aggressivste und nur schwer therapierbare Hautkrebsart, das kutane maligne Melanom hervor, dessen Inzidenz stark ansteigend ist (Rigel, 1996; Gray-Schopfer et al., 2007 (A)). Die Ergebnisse der Studie von Bernard und Mitarbeitern (Bernard et al., 2003) zeigten, dass HDGF in Melanomen häufig überexprimiert wird. Diese Tatsache und die gute Zugänglichkeit und Analysierbarkeit von Hauttumoren führten zur Wahl des Tyrosinase-Promotors für die Herstellung einer transgenen Mauslinie. Diese Mauslinie mit einer durch den melanozyten-spezifischen Tyrosinase-Promotor auf Melanozyten beschränkten Überexpression von HDGF sollte helfen die Frage zu klären, ob eine Überexpression von HDGF die Entwicklung von Melanomen begünstigt. Die Tyrosinase katalysiert die beiden ersten Schritte der Produktion des Pigments Melanin (Abbildung 5) und wird spezifisch in pigmentbildenden Zellen exprimiert. Das regulatorische Element des Tyr-HDGFGen Konstrukt umfasst 6,1 kb des Tyrosinase 5' untranslatierten Bereiches (zur Verfügung gestellt von Friedrich Beermann, ISREC, Epalinges, Schweiz). Die Anfertigung und Charakterisierung des Tyr-HDGFGen Konstruktes im Rahmen meiner Diplomarbeit bildete die Grundlage für die Herstellung der HDGF^{Tyr}-transgenen Mauslinie. Die erfolgreiche Integration des Konstruktes ins Genom konnte sowohl per PCR (Abbildung 10) mit Hilfe eines konstrukt-spezifischen Primers (Abbildung 9) als auch mittels Southernblotanalyse (Abbildung 11) aufgrund des verkürzten Intron I nachgewiesen werden. Die Integration eines Transgens ins Genom findet zufällig statt. Außerdem integrieren häufig mehrere Kopien aneinander gereiht an einer Stelle ins Genom, so dass sowohl der Integrationsort als auch die Anzahl der Kopien des Transgens in einer Maus unbekannt sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Transgen in mehreren befruchteten Eizellen an der gleichen Stelle ins Genom integriert, ist aufgrund der Größe des Genoms sehr gering. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass der Integrationsort in jeder aus der Injektion hervorgegangenen Maus ein Anderer war. Die parallele Analyse zweier transgener Mauslinien (889 und 7159) sollte ausschließen, dass ein eventuell auftretender Phänotyp durch die

Integration an einer bestimmten Stelle im Genom hervorgerufen wurde. Alle Analysen wurden parallel an Mäusen beider Mauslinien durchgeführt. Bei keinem der durchgeführten Experimente zeigten sich Unterschiede zwischen den Mäusen der Linien 889 und 7159, weshalb die Ergebnisse im Folgenden nicht mehr separat diskutiert werden.

Im Anschluss an die nachgewiesene Integration des Konstruktes ins Genom der Mäuse, sollte die HDGF-Expression in den transgenen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen untersucht werden.

Melanozyten kommen in verschiedenen Organen vor und werden aufgrund ihrer Entwicklung in zwei Zelltypen unterschieden:

1. Melanozyten, die von Zellen der Neuralleiste abstammen und in der Iris, der Chorioidea, der Cochlea (Innenohr), der Hirnhaut, der Haut und in der Harderschen Drüse von Nagetieren zu finden sind
2. Melanozyten, die von Zellen des optischen Vesikels (Ausstülpung des Diencephalons) hervorgehen und im Retinalen Pigmentepithel zu finden sind (Beermann et al., 1992; Steel et al., 1992; Bennett, 1993; Gimenez et al., 2003)

Für die Analysen wurden Organe ausgewählt, die Melanozyten enthalten (Auge und Haut) und als Negativkontrolle Organe, in denen dieser Zelltyp nicht vorkommt (Gehirn, Leber, Milz).

Die RNA-Analyse mit zwei verschiedenen Sense-Primern ermöglicht es zum einen spezifisch die HDGF-mRNA zu amplifizieren, die vom Tyr-HDGFGen Konstrukt exprimiert wird und zum anderen mit einem allgemeinen HDGF-sense Primer die gesamte (Wildtyp und transgene) HDGF-mRNA zu vervielfältigen. Die Analyse ergab, dass in jedem untersuchten Organ der transgenen Maus die HDGF mRNA detektiert werden konnte, die auf das Tyr-HDGFGen Konstrukt zurückgeht (Abbildung 14; Abbildung 39). Die Sequenzierung eines solchen Amplifikats bestätigte die Transkription der für HDGF bekannten kodierenden Sequenz (publiziert von Nakamura et al. 1994, NCBI-ID: bc21654). In Bezug auf die Gesamtmenge der HDGF-mRNA in den transgenen und Wildtyp-Proben konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die unerwartete Detektion der HDGF mRNA in den Gehirn-, Milz- und Leberproben ist auf die Expression des regulatorischen Elements in diesen Geweben zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, besteht das regulatorische

Element des Konstruktes aus 6,1 kb der Tyrosinase 5' untranslatierten Region und enthält sowohl Promotor- als auch Verstärkerelemente (Promotor/Enhancer). Diese Sequenz wurde schon für die Generierung mehrerer verschiedener, transgener Mauslinien wie zum Beispiel Tyr-LacZ (Beermann et al., 1992) verwendet. Mit Hilfe dieses Tyrosinase-Promotor/Enhancers in Kombination mit dem LacZ-Gen wurde die Aktivität des Promotors sowohl über die Embryonalentwicklung, als auch in adulten Mäusen untersucht. Neben einer Aktivität des Promotors in der Haut und im Auge (Beermann et al., 1992), wurde auch eine Expression des LacZ-Gens während der Embryogenese in den Zellen der Neuralleiste (Tief et al., 1996 (A)) und in Teilen des sich entwickelnden und adulten Gehirns detektiert, woraufhin eine Expression der Tyrosinase im Gehirn und eine alternative Funktion außerhalb der Pigmentbiosynthese diskutiert wurde (Tief et al., 1996 (B); Tief et al., 1997). Giménez und Mitarbeiter analysierten daraufhin die Expression des Tyrosinase-Gens im Gehirn mittels *in situ* Hybridisierung und RT-PCR. Die Analysen führten zu dem Ergebnis, dass im Gehirn keine Aktivität des Tyrosinase-Gens detektiert werden konnte (Gimenez et al., 2003). Des Weiteren zeigten Untersuchungen, dass Albinos trotz defekten Tyrosinase-Gens eine pigmentierte Substantia nigra aufweisen können (Zecca et al., 2001). Die Expression des Tyrosinase-Promotor/Enhancers in Gehirn, Milz und Leber ist wahrscheinlich auf die Unvollständigkeit und/oder das Fehlen *cis*- und *trans*-regulatorischer Elemente des Promotor/Enhancer-Elements zurück zuführen (Montoliu et al., 2004).

Die RNA-Analyse der Milzprobe der transgenen Mäuse führte zur Amplifikation von zwei DNA-Fragmenten (Abbildung 14). Während das kürzere Amplifikat der bekannten kodierenden Sequenz von HDGF entspricht, beinhaltet das Längere zusätzlich zur HDGF-kodierenden Sequenz (HDGF cds) 70 bp von Intron III (siehe Anhang; Abbildung 44). Die Translation dieser Sequenz würde jedoch trotz der verlängerten mRNA zu einem stark verkürzten Protein führen, das kaum mehr als die HATH-Region (116 Aminosäuren; ~14 kDa) umfasst (Abbildung 45). Obwohl dieses Fragment nur in der Milzprobe der HDGF^{Tyr} Maus eindeutig amplifiziert werden konnte, ist in der Probe der Wildtyp Milz, wenn auch nur sehr schwach, ein zweites Fragment zu erkennen (Spur 18 in Abbildung 14). Sequenzvergleiche mit bekannten exprimierten Sequenzen

(ESTs; BLAST) ergaben, dass die klonierte Sequenz bekannt ist (Abbildung 46) und dass die zusätzlichen 70 bp zwischen mehreren Spezies (Maus, Ratte, Mensch, Hund, Rind) konserviert sind (Abbildung 47). Es ist möglich, dass es sich hierbei um eine alternative Spleißform des HDGF-Gens handelt. Die Konserviertheit und das Vorhandensein der Sequenz in EST-Datenbanken und eine wahrscheinliche Expression im Wildtyp Gewebe lassen vermuten, dass diese Sequenz nicht nur vom Tyr-HDGF Gen Konstrukt exprimiert wird und kein en z.B. Fasern in pink oder Knorpe

Die Westernblotanalyse wurde mit Lysaten derselben Organe durchgeführt wie die mRNA-Analyse. Das Ergebnis zeigte jedoch in keiner der untersuchten HDGF^{Tyr}-Gewebeproben eine Zunahme der HDGF-Proteinmenge im Vergleich zu den Lysaten der Wildtyp-Maus (Abbildung 12). Auch zwischen den Immunfluoreszenzfärbungen der Rückenhaut und der Augen (Abbildung 15, Abbildung 16) war kein eindeutiger Unterschied zwischen den Präparaten der transgenen und der Wildtyp-Maus erkennbar. Die Bilder der Präparate zeigten zwar in manchen Zellen der Chorioidea und der Haarfollikel eine stärkere Fluoreszenzfärbung als in den entsprechenden Bereichen der Wildtyp-Präparate, allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt aufgrund der intensiveren Färbung nicht eindeutig auf eine Proteinexpression vom Tyr-HDGF Gen Konstrukt geschlossen werden. Um dennoch zeigen zu können, dass das Protein vom Transgen exprimiert wird, wurde durch Kreuzung der HDGF^{Tyr}-transgenen Mäuse in die HDGF^{-/-}-Linie eine weitere Mauslinie erzeugt. Die daraus resultierenden HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Mäuse sollten kein Wildtyp-HDGF, sondern nur transgenes HDGF exprimieren. Die Westernblotanalyse dieser Mäuse (Abbildung 18) zeigte, dass neben der Positivkontrolle (Wildtyp Gehirnllysat) nur im Gehirnllysat der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Maus HDGF detektiert werden konnte. In den Organen Auge, Rückenhaut und Schwanzhaut, die pigmentbildende Zellen enthalten, konnte kein HDGF nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass HDGF in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert wird und die Anzahl der Melanozyten in den jeweiligen Organen im Vergleich zur Gesamtzellzahl sehr gering ist. In der Rückenhaut von Mäusen erfüllt die Behaarung den Schutz vor Sonnenstrahlen, so dass in der Rückenhaut von adulten Mäusen nur Melanozyten in den Haarfollikeln, jedoch nicht im *Stratum basale* der Epidermis zu finden sind.

Zudem ist zu bedenken, dass die Aktivität des Tyrosinase-Promotors vom Stadium des Haarzyklus abhängt. In der anagenen Phase des Haarzyklus ist der Promotor aktiv, während die Aktivität in der katagenen Phase abnimmt und in der telogenen Phase nicht detektierbar ist (Slominski et al., 1994). In der Schwanzhaut befinden sich neben den follikulären Melanozyten auch Melanozyten im *Stratum basale*. Allerdings ist der Anteil der Melanozyten in der Epidermis im Vergleich zu den Keratinozyten mit einem Verhältnis von 1:30 sehr gering. Auch im Auge machen die Melanozyten nur einen kleinen Teil der Zellmasse aus und sind auf das Retinale Pigmentepithel (RPE), die Iris und die Chorioidea beschränkt. Die Aktivität des Tyrosinase-Promotors in den verschiedenen Bereichen im Auge ist umstritten. So wird eine Expression dieses Gens im RPE nur bis zur Geburt bzw. bis einige Tage danach beschrieben. Im adulten Auge scheint der Tyrosinase-Promotor in den differenzierten Zellen des RPE, die über das gesamte Leben erhalten bleiben, inaktiv zu sein (Julien et al., 2007; Lopez et al., 2010). Die Immunfluoreszenzfärbungen der Rückenhaut, des Auges und des Gehirns einer HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Maus zeigten neben einer Färbung des Cortex (Abbildung 21; Abbildung 43) eindeutig eine Expression im Bereich der Haarfollikel (Abbildung 19; Abbildung 41) und der Chorioidea (Abbildung 20; Abbildung 42). In den Haarfollikeln und der Chorioidea sind nur wenige Zellen immunfluoreszent gefärbt. Diese geringe Anzahl an HDGF-exprimierenden Zellen bestätigt die Vermutung, dass die Menge an HDGF in diesen Geweben für einen Nachweis durch eine Westernblotanalyse des Gesamtlysates nicht ausreicht. Im Cortex dagegen sind viele Zellen fluoreszent gefärbt (Abbildung 21; Abbildung 43). Diese hohe Anzahl an HDGF-exprimierenden Zellen im Cortex erklärt die Detektion von HDGF im Gehirnlisat der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Maus. Um nachzuweisen, dass die in den Haarfollikeln gefärbten Zellen, Melanozyten sind, die gleichzeitig mit dem Tyr-HDGFGen Konstrukt das Tyrosinase-Gen exprimieren, wurde an Folgeschnitten eine *in situ* Hybridisierung (ISH) zur Detektion der Tyrosinase mRNA und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen HDGF durchgeführt (Abbildung 22; Abbildung 41). Die Detektion der Tyrosinase-mRNA führte spezifisch im Bereich der Haarfollikel zu einer Lilafärbung. Aufgrund der starken Pigmentierung der Haarfollikel sind zwar keine einzelnen Zellen erkennbar, aber ein Bereich mit Tyrosinase-Expression

ist deutlich in allen Genotypen zu erkennen. Im Folgeschnitt der Rückenhaut der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Maus sind genau im Bereich der Lilafärbung aus der ISH einzelne Zellkerne durch Inkubation mit dem HDGF-Antikörper angefärbt worden. In den Präparaten der HDGF^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse konnte eine solche Färbung nicht beobachtet werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die HDGF-Färbung des HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Präparats im Bereich der Haarfollikel von dem des Wildtyps unterscheidet und ein mit der Tyrosinase mRNA übereinstimmendes Expressionsmuster zeigte. Diese Ergebnisse beweisen, dass das HDGF-Protein in Melanozyten vom Tyr-HDGFGen Konstrukt exprimiert wird und dass diese Expression zu einer Überexpression in Melanozyten führt. Die HDGF^{Tyr}-Mäuse wurden aufgrund dieser Ergebnisse für die weiteren Studien zum Einfluss einer erhöhten HDGF-Expression auf die Entwicklung von Melanomen verwendet.

In vitro Untersuchungen der Melanozyten sollten zeigen, ob eine erhöhte Menge an HDGF bzw. das Fehlen von HDGF einen Einfluss auf Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und/oder das Überleben der Zellen in Kultur hat. Hierfür wurden Melanozyten aus Mäusen der Genotypen HDGF^{Tyr}, Wildtyp und HDGF^{-/-} isoliert. Bereits ein bis zwei Wochen nach der Isolation der Melanozyten konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den Genotypen beobachtet werden. Während zu diesem Zeitpunkt die Pigmentierung und Proliferation der Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Melanozyten zur Ausbildung einer makroskopisch sichtbaren schwarzen Zellschicht führte, waren nur sehr wenige HDGF^{Tyr}-Melanozyten zu finden (Abbildung 25). Des Weiteren zeigten die wenigen HDGF^{Tyr}-Melanozyten eine andere Zellform im Vergleich zu den großen, flächig ausgebreiteten Melanozyten der anderen Genotypen und erschienen dendritisch und häufig abgerundet. Das Isolationsprotokoll lässt leider keine Möglichkeit zu die genaue Zellzahl der isolierten Melanozyten vor dem Austeilen in das Zellkulturgefäß zu bestimmen, da zunächst alle Zellen der Epidermis isoliert werden. Allerdings ist nicht davon auszugehen, dass in der Haut der HDGF^{Tyr}-Mäuse weniger Melanozyten vorhanden sind, da der zeitliche Ablauf der Haarbildung wie auch die Pigmentierung identisch zu dem der Wildtyp-Mäuse war und kein frühzeitiges Ergrauen beobachtet werden konnte. Des Weiteren zeigten die histologischen Untersuchungen der Haut von HDGF^{Tyr}-, Wildtyp-, und HDGF^{-/-}-Mäusen, dass in allen Genotypen Melanozyten

vorhanden sind und sowohl Anzahl als auch Lokalisation der Melanozyten vergleichbar waren (Abbildung 23 und Abbildung 24). Demnach scheinen die Melanozyten entweder nicht in der Lage zu sein, sich an den Boden des Zellkulturgefäßes anzuheften oder unter den gegebenen Bedingungen zu differenzieren und zu überleben. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Kontakt der Melanozyten zu anderen Zellen und/oder die von anderen Zelltypen freigesetzten Faktoren (Wachstumsfaktoren, Cytokine) den in der Zellkultur festgestellten Defekt der HDGF^{Tyr}-Melanozyten kompensieren. Weitere Untersuchungen dieses Effekts sollten Infektionen von HDGF^{Tyr}-Melanozyten mit HDGF spezifischen siRNAs beinhalten, um zu untersuchen, ob dieser Effekt durch eine Verringerung der HDGF-Menge aufgehoben werden kann. Des Weiteren sollten Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Melanozyten mit HDGF-Expressionsvektoren infiziert werden, so dass festgestellt werden kann, ob dieser Effekt bei diesem Zelltyp in Kultur durch Überexpression ausgelöst werden kann.

Die Kreuzung der HDGF^{Tyr}- und HDGF^{-/-}-Mauslinien in die Ink4a^{-/-}-Mauslinie diente der Einführung einer zweiten genetischen Veränderung, welche die Tiere zur Entwicklung von Tumoren prädispositioniert. Tiere der daraus hervorgegangen HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}- und HDGF^{-/-}/Ink4a^{-/-}-Mauslinien wurden histologisch auf melanozytäre Unterschiede im Vergleich zu Ink4a^{-/-}-Mäusen untersucht. Die Analyse der Augen zeigte den für die Ink4a^{-/-}-Mäuse bekannten Augenphänotyp (Martin et al., 2004; Cheong et al., 2006). Dabei handelt es sich um eine unvollständige Regression des embryonalen Glaskörpers und des embryonalen Blutgefäßsystems, die einhergeht mit einer Retinadysplasie und einem Linsenkatarakt. Dieser Phänotyp ähnelt stark der humanen Erkrankung persistierender hyperplastischer primärer Glaskörper (PHPV). Während der Embryonalentwicklung verläuft die Arteria hyaloidea von der Austrittsstelle des Sehnerves zum hinteren Linsenpol und dient der Nährstoffversorgung der sich entwickelnden Linse und des Glaskörpers. Bildet sich diese bis zur Geburt (Mensch) bzw. bis zum Öffnen der Augen (Maus) nicht komplett zurück, so führt dies zur Bildung einer fibrovaskulären Zellmasse zwischen Linse und Neuroretina, einer Linsentrübung und/oder zur Ablösung der Neuroretina vom RPE (Silbert and Gurwood, 2000). Die Zellmasse besteht hauptsächlich aus fibrovaskulären Zellen, kann aber sowohl beim Menschen (Haddad et al., 1978)

als auch bei der Maus pigmentierte Zellen enthalten (McKeller et al., 2002). Histologische Färbungen identifizierten die pigmentierten Zellen als reaktive Melanozyten des RPE, die vermutlich mit der Zeit entlang der Gefäßüberreste migrieren und um diese herum akkumulieren (Martin et al., 2004). Ein Vergleich der Augen der drei Genotypen zeigte, dass in allen Präparaten pigmentierte Zellen zu finden waren (Abbildung 26). Das Ausmaß der Retinadysplasie und der Zellmasse war von Tier zu Tier auch innerhalb eines genetischen Hintergrundes kaum vergleichbar. Da aber in allen Populationen vergleichbare Stadien zu finden waren, die alle einen ähnlichen Grad der Pigmentierung aufwiesen, kann zusammenfassend gesagt werden, dass weder eine Überexpression, noch das Fehlen von HDGF in Melanozyten des RPE einen Einfluss auf die Anzahl und Pigmentierung der fibrovaskulären Zellmasse haben.

Neben den Augenpräparaten erfolgte auch ein histologischer Vergleich von Präparaten der Rücken- und Schwanzhaut der HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}, Ink4a^{-/-} und HDGF^{-/-}/Ink4a^{-/-}. Es konnten keine Unterschiede in Bezug auf Anzahl und Lokalisation der Melanozyten festgestellt werden. Auch ein Vergleich mit den Präparaten von Wildtyp-Mäuse ergab, dass die genetischen Veränderungen keine erkennbaren Effekte auf die Melanozyten ausübten.

Obwohl der Ink4a-Genlocus in bis zu 40% der familiären Melanome mutiert ist, entwickeln Ink4a^{-/-}-Mäuse nur in sehr seltenen Fällen spontan Melanome, hauptsächlich aber Lymphome und Sarkome (Serrano et al., 1996). Die Einführung eines Onkogens in die Ink4a^{-/-}-Mauslinie unter der Kontrolle eines melanozytenspezifischen Promotors wie z.B. Tyr-HRas^(G12V) (Chin et al., 1997), Tyr-NRas^(Q61K) oder Tyr-Tag (Kelsall and Mintz, 1998) führt zur spontanen Entstehung von Melanomen. Da die Analyse der HDGF^{Tyr}/Ink4a^{-/-}-Mäuse nicht zu einem solchen Ergebnis führte, wurde zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen, dass eine Überexpression von HDGF in Melanozyten wenn überhaupt nur ein sehr geringes onkogenes Potential hat. Zur weiteren Überprüfung einer möglichen onkogenen Wirkung von HDGF wurden neugeborene Mäuse der Genotypen HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-}, Ink4a^{+/-}, HDGF^{-/-}/Ink4a^{+/-}, HDGF^{Tyr}, Wildtyp und HDGF^{-/-} einmalig UVB-Strahlen ausgesetzt. In der Haut von Neugeborenen sind Melanozytenvorläuferzellen häufiger vertreten als in adulter Haut und reagieren verstärkt auf proliferativen Stress. Es wird deshalb

vermutet, dass eine starke UVB-Belastung zu diesem Zeitpunkt zu DNA-Schäden (UV-Signaturen) führt und gleichzeitig die Proliferation der neonatalen Melanozytenvorläuferzellen fördert. Die neonatale Belastung mit UVB-Strahlen steht im Verdacht, auch einen Einfluss auf das sich entwickelnde Immunsystem auszuüben und eine Art Toleranz gegenüber Melanomzellen zu bewirken (Noonan et al., 2001). Die Bestrahlung der Neugeborenen mit UVB-Strahlen führte in allen Genotypen zu einem UV-Erythem (Sonnenbrand) und verursachte nach 5-8 Tagen das Ablösen der geschädigten Haut. Nach 8-10 Monaten konnten Hautveränderungen in Form von stark pigmentierten Verdickungen an Schwanz und Rücken beobachtet werden. Diese Hautveränderungen traten nur bei den Genotypen mit einem heterozygoten *Ink4a*-Hintergrund auf (Abbildung 27). Die Veränderungen ähneln stark humanen Epidermoidzysten, deren Hornperlen partiell pigmentiert sind und die zum Teil von pigmentierten Zellen umgeben sind (Abbildung 29). Epidermoidzysten (3-20 mm bei Menschen) entstehen aus den Keratinozyten von Haarfollikeln (Infundibulum). Es handelt sich um benigne Zysten, die häufig rund oder oval sind, über eine Pore mit der epidermalen Oberfläche in Kontakt stehen und häufig durch ihre dunkle Färbung wie ein großer Komedo (Mitesser) erscheinen. Die Zysten werden von einem Plattenepithel begrenzt, das durch Verhornung das Innere der Zyste mit lamellenartig angeordneten Keratinfasern füllt (Grote and Lund, 1957). Beim Menschen kommen pigmentierte Epidermoidzysten in Personen mit dunklem Hauttyp vor. Dort grenzen ebenfalls pigmentierte Zellen an das Plattenepithel an, und im Inneren der Zyste können pigmentierte Keratinfasern vorliegen. Im umliegenden Infiltrat können zudem Melanozyten und melanin-phagozytierende Makrophagen (Melanophagen) zu finden sein (Sandoval and Urbina, 1994; Shet and Desai, 2001).

Die Beurteilung der Pigmentierung ergab keinen erkennbaren Unterschied zwischen den drei Genotypen. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten jedoch in den pigmentierten Zellen der $\text{HDGF}^{\text{Tyr}}/\text{Ink4a}^{+/-}$ - und $\text{Ink4a}^{+/-}$ -Präparate eine nukleäre Lokalisation von HDGF (Abbildung 30). Die um die Hornperlen lokalisierten Melanozyten stammen wahrscheinlich von Melanozyten der Haarfollikel ab und liegen in einer unnatürlich hohen Zahl vor. Es ist jedoch zu bezweifeln, dass es sich hierbei um eine melanozytäre Hyperplasie aufgrund der genetischen Veränderungen handelt. Vermutlich werden von den

Keratinocyten der Epidermoidzysten Faktoren freigesetzt, die zur Proliferation der follikulären Melanozyten führen oder die eine Migration von umliegenden Melanozyten zu der Epidermoidzyste hin bewirken. Die neonatale Bestrahlung der Mäuse resultierte zwar die Entstehung von pigmentierten Hautveränderungen, diese entsprechen aber nicht dem malignen Melanom oder dessen Vorstufen. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Überexpression von HDGF in Kombination mit einem fehlendem Ink4a-Allel und neonataler UVB-Bestrahlung nicht ausreicht um Melanozyten *in vivo* zu transformieren. Die bisherigen Studien zu HDGF beschäftigten sich nur damit, eine Überexpression des Proteins in Tumoren zu diagnostizieren (Hu et al., 2003; Ren et al., 2004; Uyama et al., 2006; Yamamoto et al., 2006; Yoshida et al., 2006) und Effekte einer veränderten HDGF-Menge auf Tumore *in vivo* zu untersuchen (Zhang et al., 2006; Ren et al., 2009). So ist nicht bekannt zu welchem Zeitpunkt die in diversen Tumorarten beobachtete HDGF-Überexpression genau beginnt. Lediglich für das Melanom wurde gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Überexpression und dem Tumorstadium gibt. So ist die HDGF-Expression in benignen Tumoren gering, verstärkt sich im malignen Melanom graduell von den frühen Stadien bis hin zum metastasierenden Melanom (Tabelle 1.1) (Bernard et al., 2003). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die beobachtete Überexpression nur ein Epiphänomen von Tumoren ist, aber nicht zur Tumorentstehung beiträgt. So wurde in den letzten Jahren immer häufiger die Beobachtung gemacht, dass es Proteine gibt, die in Tumoren überexprimiert werden, die aber nicht die Entartung (Transformation) von Zellen bewirken. Aus diesen Beobachtungen wurde das Konzept der nicht-onkogenen Abhängigkeit (NOA – non-oncogene addiction) entwickelt. Darunter versteht man die Abhängigkeit von Tumoren von bestimmten Proteinen, die keine Onkogene sind. In diesem Zusammenhang werden als Onkogenen Gene bezeichnet, die durch Mutationen aktiviert wurden und zur Transformation von Zellen beitragen. Nicht-Onkogene sind Proteine, die sekundär reguliert werden, nicht transformierend wirken, aber die Tumorprogression fördern können, wie z.B. der Transkriptionsfaktor Stat5 (Hoelbl et al., 2010). Diese Beobachtungen und die exzessive phänotypische Analyse von Krebszellen führten zur Identifizierung weiterer Tumorcharakteristika, die nicht für die Initiation der Tumorentstehung verantwortlich sind. Luo und Mitarbeiter erweiterten daraufhin

die von Hanahan und Weinberg aufgestellten sechs Charakteristika (siehe Einleitung). Demnach zählen zellulärer Stress (DNA-Schäden/Reparatur-Stress, proteotoxischer Stress, mitotischer Stress, metabolischer Stress und oxidativer Stress) zu den Hauptcharakteristika von Tumoren (Luo et al., 2009). In normalen Zellen führt zellulärer Stress zum Wachstumsstopp oder zur Apoptose. Krebszellen aber sind in der Lage diese Signale zu übergehen (Fulda, 2009). Dies bedarf der Anpassung ihrer Stoffwechsel- und Signalwege, die das Ignorieren antiproliferativer Signale ermöglichen, wodurch die Krebszellen jedoch in Abhängigkeit einzelner, nicht-onkogener Proteinen gelangen. Die Identifizierung solcher Proteine, deren Expression für Tumorzellen überlebenswichtig ist, während gesunde Zellen nicht von diesem Protein abhängig sind, ist von immenser Bedeutung für die Entwicklung von Krebsmedikamenten (Luo et al., 2009). Werden solch kritische Proteine (oder die Expression ihrer Gene) in Krebszellen blockiert, kann der Tumor zurückgehen oder sogar kollabieren. Ein Beispiel hierfür ist der Heat-Shock Faktor 1 (HSF1), in dessen Gen bis heute keine aktivierenden Mutationen in Tumoren identifiziert werden konnten (Solimini et al., 2007). HSF1 wird in Tumoren überexprimiert und wirkt fördernd auf Invasion und Metastasierung von Tumoren (Ciocca and Calderwood, 2005). Dennoch bewirkt eine Überexpression von HSF1 nicht die Transformation von Fibroblasten (Solimini et al., 2007). HSF1-Defizienz reduziert die Neigung Tumore zu bilden (sowohl spontane Tumore, als auch chemisch-induzierte Tumore) und siRNA-Experimente führten zu verringerter Lebensfähigkeit humaner Tumorzellen *in vitro*, während die Reduktion von HSF1 auf nicht-transformierte Zellen nur einen minimalen Einfluss hatte (Solimini et al., 2007). Für HDGF konnte gezeigt werden, dass Tumore in einer gewissen Weise von HDGF abhängig sind, weshalb HDGF in neueren Studien als ein Ziel für eine Antitumorthérapie diskutiert wird. Mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung von HDGF oder die Injektion von HDGF-Antikörpern zu einem verlangsamten Tumorwachstum, zu einer reduzierten Anzahl von Blutgefäßen, zu einer Reduzierung des Durchmessers der Blutgefäße und zu verstärkter Apoptose führen (Tsang et al., 2008; Liao et al., 2009; Ren et al., 2009; Tsang et al., 2009). Des Weiteren besitzt HDGF eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES). In den letzten Jahren konnte gezeigt

werden, dass die mRNAs verschiedener Onkogene, Wachstumsfaktoren und von Proteinen, die in die Regulation der Apoptose, des Zellzyklus und die Stressantwort im Allgemeinen involviert sind, IRES-Elemente besitzen. Die interne Translationsinitiation umgeht die 5'-Cap abhängige Translation, erlaubt die Expression bestimmter Proteine in Stresssituationen und dient in gesunden Zellen der Bewältigung dieser Situationen (Spriggs et al., 2008). Die bisherigen Untersuchungen ergaben, dass Tumore eine Abhängigkeit von HDGF zeigen (Zhang et al., 2006; Ren et al., 2009).

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen muss gefolgert werden, dass HDGF in murinen Melanozyten keine onkogene Wirkung hat und die HDGF-Überexpression zu keinem proliferativen Vorteil dieses Zelltyps führt. Deshalb stellt sich, unter Berücksichtigung der gezeigten Ergebnisse, im Nachhinein die Frage, ob ein anderes Mausmodell geeigneter gewesen wäre, um den Einfluss von HDGF auf Melanome zu untersuchen. Hierzu gilt es zu bedenken, dass die Kombination aus dem Tyrosinase-Promotor/Enhancer und *Ink4a*^{-/-}-Mäusen zur Analyse der Signaltransduktion bekannter Onkogene in Tumoren wie SV40 T-Antigen (Bradl et al., 1991; Penna et al., 1998) und HRas^(G12V) Transgen (Kramer et al., 1998) verwendet wurde, um deren Onkogenität für Melanome zu bestätigen. Aus diesem Grund wäre die Wahl eines Mausmodells, das spontan Melanome entwickelt eventuell geeigneter gewesen, um einen möglichen Einfluss von HDGF auf die Entstehung dieser Tumore zu untersuchen. Die Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF) transgene Mauslinie könnte ein solches Mausmodell darstellen. Diese Mäuse exprimieren HGF/SF unter Kontrolle des melanozytenspezifischen Metallothionein-Promotors und entwickeln spontan und nach neonataler UVB-Bestrahlung verstärkt metastasierende Melanome, die histologisch den humanen Tumoren stark ähneln (Wolnicka-Glubisz and Noonan, 2006; Thomas et al., 2007).

Die Analyse des Mausmodells lieferte zwar keine eindeutige Antwort auf die Frage nach einem Einfluss der melanozytenspezifischen HDGF-Überexpression auf die Entstehung von Melanomen, aber es konnte dennoch ein Unterschied zwischen den Genotypen in Bezug auf Häufigkeit und Größe der Epidermoidzysten festgestellt werden. Die statistische Auswertung der gezählten und vermessen Epidermoidzysten der HDGF^{Tyr}/*Ink4a*^{+/-}, *Ink4a*^{+/-} und HDGF^{-/-}/*Ink4a*^{+/-}-Mäuse ergab, dass die HDGF^{-/-}/*Ink4a*^{+/-}-Tiere signifikant mehr

und größer Epidermoidzysten im Vergleich zu den Mäusen der Genotypen HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-} und Ink4a^{+/-} entwickelten (Abbildung 28). Zwischen den Tieren der Genotypen HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-} und Ink4a^{+/-} besteht kein signifikanter Unterschied, es konnte lediglich eine leichte Tendenz der Ink4a^{+/-}-Mäuse gegenüber den HDGF^{Tyr}/Ink4a^{+/-}-Mäusen festgestellt werden, eine höhere Anzahl und größere Epidermoidzysten zu entwickeln. Wie oben bereits erwähnt handelt es sich bei Epidermoidzysten um benigne Zysten, die aus dem Infundibulum von Haarfollikeln entstehen und durch Keratinisierung und Cornifizierung der Keratinozyten Einschlüsse mit lamellenartigen Keratinfasern aufweisen. Die Bildung dieser Hornperlen stellt wahrscheinlich einen Differenzierungsdefekt der Keratinozyten dar, die ursprünglich den Haarschaft gebildet haben. Die Zellen der äußeren Haarwurzelschicht (Outer Root Sheat, ORS) ähneln morphologisch den Basalzellen der Epidermis mit denen zusammen die ORS Zellen eine durchgängige Zellschicht bilden. Die Morphologie der Epidermoidzysten erweckt den Anschein, dass die Haarschaft-Keratinozyten das Differenzierungsprogramm der epidermalen Keratinozyten durchlaufen (Abbildung 4) und so die Keratinfasern der Hornperle bilden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass HDGF diesen Differenzierungsprozess der Keratinozyten unterdrückt, weshalb HDGF-exprimierende Mäuse weniger und kleinere Epidermoidzysten entwickeln als HDGF^{-/-}-Mäuse. Die bisherigen Studien zeigten allerdings, dass HDGF die Differenzierung verschiedener Zelltypen, wie Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, fördert (Everett et al., 2000; Everett et al., 2001; Everett et al., 2004). Diese kontroversen Ergebnisse lassen vermuten, dass HDGF in Keratinozyten eine andere Funktion hat als z.B. in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur. Ein Beispiel für ein Protein, das in Keratinozyten eine andere Funktion erfüllt als in anderen Zelltypen ist der Notch-Rezeptor1 (Notch1). Dieses Protein ist für die Gewebeorganisation während der Embryonalentwicklung von Bedeutung. Des Weiteren konnte eine Rolle für Notch1 bei der Differenzierung von Keratinozyten nachgewiesen werden. Während dieser Rezeptor in den meisten Geweben proliferative Eigenschaften besitzt und eine Hyperaktivierung zu Malignität führen kann, scheint Notch1 in der Epidermis die Differenzierung der Keratinozyten zu fördern. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Notch1 wachstumsinhibierend

sowohl auf murine als auch auf humane Keratinozyten wirkt (Panelos et al., 2008). Wie bereits erwähnt, durchlaufen die Haarschaft-Keratinozyten normalerweise nicht das Differenzierungsprogramm der epidermalen Basalzellen. Es ist möglich, dass HDGF im Fall der UVB-Schädigung, die Differenzierung hemmt und/oder die Apoptose fördert. Die Differenzierung von Keratinozyten führt zwar auch zum Zelltod, dieser unterscheidet sich jedoch sowohl biochemisch als auch morphologisch von den Prozessen der Apoptose. Es wird sogar vermutet, dass Apoptose in den differenzierenden Keratinozyten geblockt wird, um den Prozess der Verhornung nicht durch verfrühten Zelltod zu stören. So konnte gezeigt werden, dass während der Keratinozyten-differenzierung die Apoptose-assoziierten Caspasen-3, -6, -7 und -9 nicht aktiviert werden (Lippens et al., 2009). In den letzten Jahren wurden sowohl pro- (Machuy et al., 2005) als auch anti-apoptotische Einflüsse von HDGF diskutiert (Shen et al., 2005; Clermont et al., 2008). Die Mehrzahl der Artikel beschreibt zwar einen anti-apoptotischen Effekt für HDGF, aber wie am Beispiel von Notch1 gezeigt, ist es möglich, dass auch HDGF in Keratinozyten eine entgegengesetzte Funktion ausübt. Auch in diesem Fall würde eine HDGF-Defizienz die Bildung von Epidermoidzysten begünstigen.

HDGF wurde aufgrund seiner Eigenschaften als Alarmin eingestuft (Harris and Raucci, 2006). Alarmine (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs) sind endogene Moleküle, die aufgrund von Zellschädigungen freigesetzt werden, um die angeborene Immunantwort und die Reparatur des Gewebes zu initiieren (Bianchi, 2007). Es ist unwahrscheinlich, dass die neonatale UVB-Bestrahlung zu nekrotischem Zelltod geführt hat. Da HDGF jedoch aktiv über einen noch unbekanntem Mechanismus nicht-klassisch sezerniert wird, ist es möglich, dass HDGF zur Initiation der Reparatur der durch den Sonnenbrand verursachten Schäden beiträgt. Dies könnte ein weiterer Grund sein, warum in *Ink4a^{+/-}*-Mäusen, die HDGF exprimieren, im Vergleich zu *HDGF^{-/-}*-Mäusen weniger und kleinere Epidermoidzysten beobachtet werden konnten.

Teil 2 – Plattenepithelkarzinom-Modell (PEK-Modell)

Das Plattenepithelkarzinom (PEK) der Haut ist eine Krebsform, die aus Keratinozyten, dem Hauptzelltyp der Epidermis hervorgeht. Bisher konnte für einige Tumorarten (z.B. Melanom, Lungen-, Leber-, Prostata und Darmtumore) eine HDGF-Überexpression nachgewiesen werden (Hu et al., 2003; Ren et al., 2004; Uyama et al., 2006; Yamamoto et al., 2006; Yoshida et al., 2006), es war bisher aber nicht bekannt, ob HDGF auch in PEK überexprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Präparate humaner PEK auf eine Expression von HDGF hin untersucht. In Abbildung 31 ist exemplarisch die Färbung eines solchen Tumors dargestellt. Es zeigte sich, dass HDGF in den PEK sehr viel stärker exprimiert wird als in den angrenzenden epidermalen Bereichen. HDGF wird sowohl in den Zellen der Epidermis als auch in den Zellen der PEK nukleär exprimiert. Im Tumor sind zusätzlich zur nukleären Lokalisation Bereiche zu erkennen, in denen HDGF eine zytoplasmatische Lokalisation aufweist. Die Induktion von PEK in Wildtyp Mäusen sollte zeigen, ob HDGF auch in murinen PEK überexprimiert wird. Die immunhistochemischen (Abbildung 34) und biochemischen (Abbildung 35) Analysen der murinen PEK zeigten, dass HDGF ebenfalls in den chemisch induzierten murinen PEK überexprimiert wird. Die Westernblotanalyse (Abbildung 35) ergab zudem ein unterschiedliches HDGF-Expressionmuster in PEK im Vergleich zu Proben normaler Haut. In den Lysaten der Haut konnte deutlich eine Proteinvariante detektiert werden, die auf einer Höhe von 38 kDa migriert. Die Lysate der PEK enthielten um das 1,37 bis 2,5 fache mehr an der 38 kDa Proteinvariante. Zusätzlich dazu konnte in diesen Lysaten eine 43 kDa Variante detektiert werden. HDGF migriert in SDS PAGE-Gelen nicht bei den von der Aminosäuresequenz kalkulierten 26,3 kDa, sondern bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 38 kDa. Durch massenspektrometrische Analysen konnte bestätigt werden, dass diese Laufanomalie nicht auf posttranslationale Modifikationen (PTM) zurückzuführen ist, sondern vermutlich durch azide Bereiche im C-Terminus des Proteins hervorgerufen wird (Abouzied et al., 2004). Dieses Expressionsmuster konnte auch in Lysaten von Pankreaskarzinomzellen und Leberkarzinomzellen detektiert werden (Uyama et

al., 2006; Yoshida et al., 2006). Expressionanalysen haben gezeigt, dass die bekannte HDGFcds ein Protein kodiert, das auf einer Höhe von 38 kDa migriert. Ob es sich bei der auf 43 kDa migrierenden Proteinvariante um eine alternative Spleißform oder um posttranslational modifiziertes HDGF handelt ist nicht klar. Bei diesem Protein muss es sich allerdings um eine HDGF-Variante handeln, da auch diese in den Lysaten der HDGF^{-/-}-PEK nicht detektiert werden konnte. Die Untersuchung der PEK-mRNA auf alternative Spleißformen des HDGF-Gens sowie die massenspektrometrische Analyse der 43 kDa Proteinvariante sollten helfen den Unterschied zwischen der 38 kDa und der 43 kDa zu identifizieren.

Die PEK von Mensch und Maus wurden auch histologisch verglichen (Abbildung 32 und Abbildung 36). Obwohl es sich bei den humanen PEK um Tumore handelte, die aus solarer Keratose, also aus UV-geschädigter Haut hervorgegangen sind, besteht histologisch eine starke Ähnlichkeit zu den chemisch induzierten murinen PEK. Sowohl in humanen als auch in murinen PEK waren tumoröse Anteile von Talgdrüsen zu finden. Die Detektion der Blut- und Lymphgefäße durch immunhistochemische Färbungen von VEGF und D240/Podoplanin zeigten, dass in humanen und murinen PEK beide Gefäßtypen vorkommen, wobei die Anzahl der Lymphgefäße in den chemisch induzierten murinen PEK höher war (Abbildung 32 und Abbildung 36). Die humanen Biopsien waren alle maligne und zeigten stark invasives Wachstum, während die murinen PEK meistens fraglich invasiv waren. Die geringe Malignität der murinen PEK lässt sich dadurch erklären, dass die Mäuse mehrmals wöchentlich auf PEK hin untersucht und bei einem solchen Befund sofort getötet wurden. Nichtsdestotrotz ist es gelungen aufgrund einer neonatalen Behandlung mit DMBA PEK in Wildtyp-Mäusen zu induzieren, so dass die Überexpression in diesem Tumor gezeigt werden konnte.

Zum Vergleich wurden HDGF^{-/-}-Mäuse ebenfalls neonatal mit DMBA behandelt und beobachtet. Es zeigte sich, dass PEK auch in HDGF^{-/-}-Mäusen entstehen können und dass diese sich in Bezug auf Häufigkeit und Größe nicht von Wildtyp-PEK unterscheiden. Wie Epidermoidzysten entstehen PEK aus Keratinozyten. Während die Zysten wie oben bereits erwähnt aufgrund eines Differenzierungsdefekts der Keratinozyten entstehen, führt die unkontrollierte Proliferation dieses Zelltyps zur Entstehung von PEK. Dieser Unterschied

könnte der Grund sein warum die HDGF^{-/-}-Mäuse zwar mehr und größere Epidermoidzysten, aber genauso viele und große PEK wie Wildtyp-Mäuse bilden. Für HDGF konnte zwar gezeigt werden, dass dieses Protein die Proliferation, Migration und Differenzierung von zum Beispiel Zellen der glatten Gefäßmuskulatur fördert (Everett et al., 2000; Everett et al., 2001; Everett et al., 2004), ob HDGF in Keratinozyten einen speziellen, vielleicht auch kontroversen (siehe oben) Einfluss auf die Differenzierung und/oder Proliferation dieses Zelltyps hat, ist allerdings bisher nicht bekannt. Die hier vorgestellten Mausmodelle deuten wie bereits erwähnt auf einen Einfluss von HDGF auf die Differenzierung von Keratinozyten hin. Zur weiteren Untersuchung dieser Beobachtung sollten aus Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen primäre Keratinozyten isoliert werden, so dass der Einfluss einer HDGF-Überexpression bzw. Verringerung der HDGF-Menge durch spezifische siRNAs untersucht werden kann. Da HDGF auf nicht-klassischem Weg sezerniert wird, könnten mit diesen primären Zellen auch Studien zu einem Einfluss von exogen appliziertem HDGF durchgeführt werden.

Da für HDGF ein Einfluss auf die Angiogenese beschrieben wurde (Okuda et al., 2003; Ren et al., 2009) und in der Promotorregulation von VEGF-A eine Sequenz lokalisiert ist, an die HDGF binden kann (Yang and Everett, 2007; Yang and Everett, 2009), wurden die Blut- und Lymphgefäße in den PEK und in angrenzendem Gewebe von Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen gezählt. Die statistische Auswertung ergab, dass das Verhältnis von Lymph- zu Blutgefäßen in HDGF^{-/-} PEK signifikant höher war als in Wildtyp PEK (Abbildung 37, A). Dieser Unterschied ist jedoch nicht auf eine geringere Anzahl von Blutgefäßen in HDGF^{-/-}-PEK, sondern auf die erhöhte Anzahl von Lymphgefäßen zurückzuführen (Abbildung 4.31, B und C). Der Einfluss von Lymphgefäßen auf Tumore wird kontrovers diskutiert (Stacker et al., 2002; Tobler and Detmar, 2006). Unstrittig sind die Ergebnisse zu einem Einfluss der Lymphgefäße auf die Metastasierung primärer Tumore zu den Lymphknoten. Hierfür werden die an den Tumor angrenzenden Lymphgefäße verantwortlich gemacht, die durch die von den Tumorzellen sezernierten Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF-C) verstärkt von den regionalen Lymphknoten in Richtung Tumor wachsen. Die im Tumor lokalisierten Lymphgefäße scheinen keinen Einfluss auf die Tumorprogression zu haben. Vielmehr wird beschrieben, dass diese schon vor

der Tumorentstehung in dem Gewebe vorhanden waren und aufgrund ihrer Gefäßstruktur kollabieren. Lymphgefäße dienen u.a. der Aufrechterhaltung der Gewebhomeostase, indem sie die aus Blutgefäßen austretende Flüssigkeit aufnehmen und über das Lymphgefäßsystem dem Blutkreislauf zurückführen (Hirakawa, 2009). Kollabieren diese in den Tumoren, sollte die Aufrechterhaltung der Homeostase unmöglich sein und in den Tumoren für Probleme sorgen. Ob die erhöhte Anzahl von Lymphgefäßen in PEK einen positiven Einfluss auf HDGF^{-/-}-PEK hatte, konnte allerdings nicht festgestellt werden, da PEK nur in seltenen Fällen und späten Stadien (III und IV) metastasieren, die Mäuse aber schon in frühen Stadien getötet wurden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden konnte, dass Tumore in HDGF^{-/-}-Mäusen gleichermaßen entstehen können wie in Wildtyp-Mäusen und dass das HDGF in den Wildtyp-Mäusen die Entstehung von PEK nicht begünstigte. Ein Grund dafür könnte sein, dass HDGF auf Keratinozyten eine andere Wirkung hat als auf andere Zelltypen. Ein Beispiel für ein Protein, das kontroverse Mechanismen in Keratinozyten im Vergleich zu anderen Zelltypen ausübt, ist wie bereits erwähnt Notch1. Für die meisten Tumoren, wie dem Melanom (Zeng et al., 2005) ist Notch1 als Onkogen publiziert. Für solche Tumore konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor nicht nur oft überexprimiert wird, sondern dass auch Mutationen, die zur Expression von konstitutiv aktiven Formen führen, bekannt sind (Zeng et al., 2005; Panelos et al., 2008). Des Weiteren wird auch eine Überexpression der Notch1 Liganden (Delta und Jagged) in Tumoren beschrieben (Panelos et al., 2008). Diese Ereignisse führen zur gesteigerten Proliferation und Tumorbildung in den meisten Zelltypen, während ein gezielter Knock-Out von Notch1 in Keratinozyten die Entstehung von PEK bewirkt (Zeng et al., 2005). Für eine kontroverse Rolle von HDGF in Tumoren würde sprechen, dass die Behandlung der Wildtyp-Mäuse mit DMBA in 10% der Mäuse zur Entstehung von Lebertumoren (Mischtumore aus Leberkarzinom und Leberadenokarzinom) und in 3% zur Entstehung von Ovarkarzinomen führte. In keinem der HDGF^{-/-}-Mäuse konnte dagegen eine andere Art von Tumor außer PEK festgestellt werden. Die Entstehung der Tumore ist wahrscheinlich auf eine systemische Aufnahme des in Aceton gelösten DMBA zurückzuführen. Die Analyse der Daten mit Hilfe des exakten Fisher-Tests ergab (Abbildung 38 A), dass die

HDGF^{-/-}-Mäuse signifikant weniger Nicht-Hauttumore als die Wildtyp-Tiere ($p < 0,038$) nach Behandlung mit DMBA entwickelten. Die Westernblotanalyse einiger Lebertumore im Vergleich zu gesunder Leber zeigte, dass in allen Tumorlysaten mehr HDGF vorhanden war als in den entsprechenden Leberlysaten (Abbildung 38 B). Interessanterweise kann in Lysaten dieser Tumorart nicht die 43 kDa Proteinvariante detektiert werden, die in Lysaten der PEK enthalten ist. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HDGF in verschiedenen Tumorarten aufgrund der Expression unterschiedlicher Proteinvarianten verschiedene Funktionen ausführen könnte. Diese Beobachtungen sollten in Zukunft an einem Leberkarzinom-Mausmodell weiter untersucht werden. Außerdem ist es unerlässlich um weitere Aussagen darüber treffen zu können warum Tumore von HDGF abhängig sind, intrazelluläre Interaktionspartner von HDGF und Signalwege zu identifizieren, in die dieses Protein involviert ist. Auch wenn HDGF keine onkogene/transformierende Eigenschaft besitzt, so wirkt es exogen appliziert auf verschiedene Zelltypen mitogen. Allerdings konnte bisher kein Rezeptor an den HDGF bindet und über den dieses exogene Signal in die Zelle übermittelt wird, identifiziert werden. Auch die Identifizierung des Rezeptors ist unerlässlich für die weitere Erforschung dieses Wachstumsfaktors.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine onkogene/transformierende Wirkung von HDGF für die hier untersuchten Tumore der Haut nicht vorhanden ist. Vielmehr unterstützen sie für HDGF das Konzept der nicht-onkogenen Abhängigkeit, das bereits erläutert und diskutiert wurde. Nach diesem Konzept sind solche „nicht-Onkogene“ für normale Zellen entbehrlich, während Tumore von ihnen abhängig sind. Eine Reduzierung oder Entfernung von „nicht-Onkogenen“ führt zur Tumorregression und zu einer leichteren Therapierbarkeit von Tumoren. Daher stellen „nicht-Onkogene“ von denen Tumore abhängig sind interessante Ziele für die Entwicklung von Medikamenten dar. Für HDGF konnte gezeigt werden, dass dieses Protein für die Entwicklung und das Leben einer gesunden Maus entbehrlich ist, da die HDGF^{-/-}-Maus keinerlei Defekte zeigt (Gallitzendoerfer et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe verschiedener *in vitro* und *in vivo* Experimente gezeigt werden, dass eine Verringerung der HDGF-Menge das Tumorstadium hemmt (Tsang et al.,

2008; Liao et al., 2009; Ren et al., 2009; Tsang et al., 2009). Diese Versuche zusammen mit der hier gewonnen Erkenntnis, dass HDGF keine onkogenen/transformierenden Eigenschaften besitzt, deuten darauf hin, dass sich HDGF als Ziel für die Entwicklung von Medikamenten eignet. An den in Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen induzierten PEK wurde kein Einfluss auf die Therapierbarkeit von Wildtyp- im Vergleich zu HDGF^{-/-}-PEK untersucht. Trifft auf HDGF das Konzept der nicht-onkogenen Abhängigkeit zu, so ist es fraglich, ob HDGF^{-/-}-PEK leichter zu therapieren wären als Wildtyp-PEK, da Tumore stressbedingt von alternativen Signalwegen abhängig sind. Fehlt HDGF von vornherein in einem solchen Tumor, so ist es möglich, dass der Tumor wiederum alternative Signalwege zur Stressbewältigung entwickelt und so von anderen Proteinen abhängig wird. Zur Untersuchung der Therapierbarkeit würde sich deshalb ein induzierbares HDGF-Knockout Mausmodell eignen, in dem das HDGF-Gen nach der Tumorinduktion eliminiert wird.

6. Zusammenfassung

Die Erforschung von Tumoren erlangt aufgrund der hohen Inzidenz dieser Erkrankungen und steigender Todeszahlen eine immer größere Bedeutung innerhalb der medizinischen Forschung. Die Identifizierung von Proteinen, die als diagnostische Marker zur besseren Einschätzung von Tumoren eingesetzt werden können, sowie von Proteinen, die als Ziele für die Entwicklung von Medikamenten verwendet werden können, sind von immenser Bedeutung. Einen großen Einfluss auf die Entstehung und Progression von Tumoren haben in diesem Zusammenhang Wachstumsfaktoren, die die Proliferation und Ausbreitung von Krebszellen steuern und deren Expression im Tumorgewebe häufig fehlreguliert ist.

Der Hepatoma-derived growth factor (HDGF) wurde aufgrund seiner Proliferationssteigernden Aktivität auf kultivierte Fibroblasten aus dem Kulturmedium der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7 isoliert. Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen zeigten, dass HDGF in mehreren Tumorarten, wie z.B. Melanomen, überexprimiert wird und dass diese Überexpression mit einer schlechten Prognose für die Patienten einhergeht. Aufgrund funktioneller Experimente kann vermutet werden, dass HDGF einen Einfluss auf die Tumorentstehung und -progression hat.

Um die Auswirkung einer veränderten HDGF-Expression auf Zellen innerhalb eines Gewebeverbandes untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Mausmodelle etabliert und analysiert. Es ist gelungen ein Mausmodell zu erschaffen, in dem HDGF in Melanozyten überexprimiert wird, so dass der Einfluss dieser Überexpression auf die Entstehung von Melanomen untersucht werden konnte. Anhand der Ergebnisse kann die Aussage getroffen werden, dass eine HDGF-Überexpression keine onkogene/transformierende Wirkung auf diesen Zelltyp ausübt.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Behandlung von Ink4a^{+/-}-Mäusen mit UVB-Strahlen zur Entstehung von Hautveränderungen führt, die humanen Epidermoidzysten, einer

Keratinozytendifferenzierungsstörung entsprechen. Die Analyse dieser Hautveränderungen deutet auf einen Einfluss von HDGF auf die Differenzierung dieses Zelltyps hin.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eine HDGF-Überexpression sowohl in humanen als auch in induzierten murinen Plattenepithelkarzinomen (PEK) der Haut nachgewiesen. Die Analysen der induzierten PEK ließen keine Unterschiede zwischen den Tumoren in Wildtyp- und HDGF^{-/-}-Mäusen erkennen. Im Gegensatz zur Keratinozytendifferenzierung scheint HDGF also keinen Effekt auf die proliferativen Eigenschaften dieses Zelltyps *in situ* zu haben. Interessanterweise konnte jedoch in Wildtyp-Mäusen die Entstehung von Leber- und Ovarkarzinomen beobachtet werden, die in den HDGF^{-/-}-Mäusen fehlten. HDGF scheint daher unterschiedliche Wirkungen auf unterschiedliche Zelltypen auszuüben.

Zusammenfassend muss aus den Ergebnissen dieser Arbeit geschlossen werden, dass HDGF keine onkogene/transformierende Wirkung auf Melanozyten und Keratinozyten besitzt. Zusammen mit der beobachteten Korrelation zwischen HDGF-Überexpression in Tumoren und einer schlechten Patientenprognose deuten die hier vorgestellten Ergebnisse vielmehr auf eine sogenannte nicht-onkogene Abhängigkeit von Tumoren auf HDGF hin. Demnach stellt die Überexpression dieses Wachstumsfaktors für Tumore eine Möglichkeit dar Stresssignale, die zum Wachstumsstopp und/oder Apoptose führen würden, zu übergehen. Auch wenn HDGF-Signalwege bis heute unbekannt sind, lassen erste Studien vermuten, dass sich dieses Protein nicht nur als prognostischer Marker, sondern auch als ein Ziel für die Entwicklung von Medikamenten zur Krebsbehandlung eignet.

Die vorgestellten Arbeiten liefern wichtige Ergebnisse zur Frage des Einflusses von HDGF auf die Tumorentstehung und bilden daher die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Rolle von HDGF innerhalb von Tumoren.

7. Literaturverzeichnis

- Aaronson SA. 1991 (A). Influences of growth factors and their signaling pathways in malignancy. *Harvey Lect* 87:17-34.
- Aaronson SA. 1991 (B). Growth factors and cancer. *Science* 254:1146-1153.
- Abouziied MM, Baader SL, Dietz F, Kappler J, Gieselmann V, Franken S. 2004. Expression patterns and different subcellular localization of the growth factors HDGF (hepatoma-derived growth factor) and HRP-3 (HDGF-related protein-3) suggest functions in addition to their mitogenic activity. *Biochem J* 378:169-176.
- Abouziied MM, El-Tahir HM, Gieselmann V, Franken S. 2010. Hepatoma-derived growth factor-related protein-3: A new neurotrophic and neurite outgrowth-promoting factor for cortical neurons. *J Neurosci Res*.
- Abouziied MM, El-tahir HM, Prenner L, Haberlein H, Gieselmann V, Franken S. 2005. Hepatoma-derived Growth Factor: Significance of Amino Acid Residues 81-100 in Cell Surface Interaction and Proliferative Activity. *Journal of Biological Chemistry* 280:10945-10954.
- Alison MR. 2007. *The Cancer Handbook*. John Wiley & Sons, Ltd. 1616 p.
- Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. 2005. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 54:53-61.
- Bancroft JDaC, H.C. 1994. *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. Churchill Livingstone. 457 p.
- Beermann F, Schmid E, Schutz G. 1992. Expression of the mouse tyrosinase gene during embryonic development: recapitulation of the temporal regulation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2809-2813.
- Bennett DC. 1993. Genetics, development, and malignancy of melanocytes. *Int Rev Cytol* 146:191-260.
- Bernard K, Litman E, Fitzpatrick JL, Shellman YG, Argast G, Polvinen K, Everett AD, Fukasawa K, Norris DA, Ahn NG, Resing KA. 2003. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res* 63:6716-6725.
- Bianchi ME. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81:1-5.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bogenrieder T, Herlyn M. 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22:6524-6536.
- Bosenberg MW, Massague J. 1993. Juxtacrine cell signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* 5:832-838.
- Bradl M, Klein-Szanto A, Porter S, Mintz B. 1991. Malignant melanoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:164-168.
- Bradley CM, Craigie R. 2005. Seeing is believing: structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase in complex with human LEDGF/p75. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17543-17544.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Horvat R, Amann G, Kowalski H, Kerjaschki D. 1999. [Podoplanin--a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 83:270-275.

- Chen T, Tsujimoto N, Li E. 2004. The PWWP domain of Dnmt3a and Dnmt3b is required for directing DNA methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Mol Cell Biol* 24:9048-9058.
- Chen Y, Hu J, Boorman D, Klein-Szanto A, O'Brien TG. 2004. Therapy of murine squamous cell carcinomas with 2-difluoromethylornithine. *J Carcinog* 3:10.
- Cheong C, Sung YH, Lee J, Choi YS, Song J, Kee C, Lee HW. 2006. Role of INK4a locus in normal eye development and cataract genesis. *Mech Ageing Dev* 127:633-638.
- Chin L, Pomerantz J, DePinho RA. 1998. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem Sci* 23:291-296.
- Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, Horner JW, 2nd, DePinho RA. 1997. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev* 11:2822-2834.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. 2005. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* 115:813-824.
- Ciocca DR, Calderwood SK. 2005. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10:86-103.
- Clermont F, Gonzalez NS, Communi D, Franken S, Dumont JE, Robaye B. 2008. HDGF is dephosphorylated during the early steps of endothelial cell apoptosis in a caspase-dependent way. *J Cell Biochem* 104:1161-1171.
- Darling DC, Brickell, P.M. 1996. Nukleinsäure-Blotting. Spektrum Akademischer Verlag. 192 p.
- DePinho RA. 2000. The age of cancer. *Nature* 408:248-254.
- Dietz F, Franken S, Yoshida K, Nakamura H, Kappler J, Gieselmann V. 2002. The family of hepatoma-derived growth factor proteins: characterization of a new member HRP-4 and classification of its subfamilies. *Biochem J* 366:491-500.
- El-Tahir HM, Abouzied MM, Gallitzendoerfer R, Gieselmann V, Franken S. 2009. Hepatoma-derived growth factor-related protein-3 interacts with microtubules and promotes neurite outgrowth in mouse cortical neurons. *J Biol Chem* 284:11637-11651.
- Everett AD, Lobe DR, Matsumura ME, Nakamura H, McNamara CA. 2000. Hepatoma-derived growth factor stimulates smooth muscle cell growth and is expressed in vascular development. *J Clin Invest* 105:567-575.
- Everett AD, Narron JV, Stoops T, Nakamura H, Tucker A. 2004. Hepatoma-derived growth factor is a pulmonary endothelial cell-expressed angiogenic factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L1194-1201.
- Everett AD, Stoops T, McNamara CA. 2001. Nuclear targeting is required for hepatoma-derived growth factor-stimulated mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276:37564-37568.
- Freinkel RK, Woodley D.T. 2001. *The Biology of the Skin*. The Parthenon Publishing Group Inc. 432 p.
- Fulda S. 2009. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer* 124:511-515.

- Gallitzendoerfer R, Abouzied MM, Hartmann D, Dobrowolski R, Gieselmann V, Franken S. 2008. Hepatoma-derived growth factor (HDGF) is dispensable for normal mouse development. *Dev Dyn* 237:1875-1885.
- Ge H, Si Y, Roeder RG. 1998 (A). Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *Embo J* 17:6723-6729.
- Ge H, Si Y, Wolffe AP. 1998 (B). A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Mol Cell* 2:751-759.
- Ge YZ, Pu MT, Gowher H, Wu HP, Ding JP, Jeltsch A, Xu GL. 2004. Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J Biol Chem* 279:25447-25454.
- Gimenez E, Lavado A, Giraldo P, Montoliu L. 2003. Tyrosinase gene expression is not detected in mouse brain outside the retinal pigment epithelium cells. *Eur J Neurosci* 18:2673-2676.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. 2007 (A). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445:851-857.
- Gray-Schopfer VC, Karasarides M, Hayward R, Marais R. 2007 (B). Tumor necrosis factor-alpha blocks apoptosis in melanoma cells when BRAF signaling is inhibited. *Cancer Res* 67:122-129.
- Green DR, Kroemer G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458:1127-1130.
- Grote W, Lund OE. 1957. [Observations on pathogenesis of an unusual intraspinal epidermoid.]. *Dtsch Z Nervenheilkd* 176:48-54.
- Haddad R, Font RL, Reeser F. 1978. Persistent hyperplastic primary vitreous. A clinicopathologic study of 62 cases and review of the literature. *Surv Ophthalmol* 23:123-134.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Harris HE, Raucci A. 2006. Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep* 7:774-778.
- Hearing VJ, Jimenez M. 1989. Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level. *Pigment Cell Res* 2:75-85.
- Hearing VJ, Leong, S. 2006. *From Melanocytes To Melanoma*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Hearing VJ, Tsukamoto K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *Faseb J* 5:2902-2909.
- Hirakawa S. 2009. From tumor lymphangiogenesis to lymphvascular niche. *Cancer Sci* 100:983-989.
- Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, Zhu B, Wickre M, Hoelzl MA, Fajmann S, Grebien F, Warsch W, Stengl G, Hennighausen L, Poli V, Beug H, Moriggl R, Sexl V. 2010. Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med* 2:98-110.
- Hu TH, Huang CC, Liu LF, Lin PR, Liu SY, Chang HW, Changchien CS, Lee CM, Chuang JH, Tai MH. 2003. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 98:1444-1456.
- Hu TH, Lin JW, Chen HH, Liu LF, Chuah SK, Tai MH. 2009. The expression and prognostic role of hepatoma-derived growth factor in colorectal stromal tumors. *Dis Colon Rectum* 52:319-326.
- Igney FH, Krammer PH. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277-288.

- Ikegame K, Yamamoto M, Kishima Y, Enomoto H, Yoshida K, Suemura M, Kishimoto T, Nakamura H. 1999. A new member of a hepatoma-derived growth factor gene family can translocate to the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 266:81-87.
- Iwasaki T, Nakagawa K, Nakamura H, Takada Y, Matsui K, Kawahara K. 2005. Hepatoma-derived growth factor as a prognostic marker in completely resected non-small-cell lung cancer. *Oncol Rep* 13:1075-1080.
- Izumoto Y, Kuroda T, Harada H, Kishimoto T, Nakamura H. 1997. Hepatoma-derived growth factor belongs to a gene family in mice showing significant homology in the amino terminus. *Biochem Biophys Res Commun* 238:26-32.
- Julien S, Kociok N, Kreppel F, Kopitz J, Kochanek S, Biesemeier A, Blitgen-Heinecke P, Heiduschka P, Schraermeyer U. 2007. Tyrosinase biosynthesis and trafficking in adult human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245:1495-1505.
- Kelsall SR, Mintz B. 1998. Metastatic cutaneous melanoma promoted by ultraviolet radiation in mice with transgene-initiated low melanoma susceptibility. *Cancer Res* 58:4061-4065.
- Kishima Y, Yamamoto H, Izumoto Y, Yoshida K, Enomoto H, Yamamoto M, Kuroda T, Ito H, Yoshizaki K, Nakamura H. 2002. Hepatoma-derived growth factor stimulates cell growth after translocation to the nucleus by nuclear localization signals. *J Biol Chem* 277:10315-10322.
- Klagsbrun M, Baird A. 1991. A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 67:229-231.
- Kramer TR, Powell MB, Wilson MM, Salvatore J, Grossniklaus HE. 1998. Pigmented uveal tumours in a transgenic mouse model. *Br J Ophthalmol* 82:953-960.
- Kuroda T, Tanaka H, Nakamura H, Nishimune Y, Kishimoto T. 1999. Hepatoma-derived growth factor-related protein (HRP)-1 gene in spermatogenesis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 262:433-437.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lepourcelet M, Tou L, Cai L, Sawada J-i, Lazar AJF, Glickman JN, Williamson JA, Everett AD, Redston M, Fox EA, Nakatani Y, Shivdasani RA. 2005. Insights into developmental mechanisms and cancers in the mammalian intestine derived from serial analysis of gene expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF). *Development* 132:415-427.
- Li J, Yuan J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27:6194-6206.
- Liao F, Dong W, Fan L. 2009. Apoptosis of human colorectal carcinoma cells is induced by blocking hepatoma-derived growth factor. *Med Oncol*.
- Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W. 2009. Cell death in the skin. *Apoptosis* 14:549-569.
- Logan A. 1990. Intracrine regulation at the nucleus--a further mechanism of growth factor activity? *J Endocrinol* 125:339-343.
- Lopez MS, Charmantray F, Helaine V, Hecquet L, Mousty C. 2010. Electrochemical detection of transketolase activity using a tyrosinase biosensor. *Biosens Bioelectron* 26:139-143.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136:823-837.
- Machuy N, Thiede B, Rajalingam K, Dimmler C, Thieck O, Meyer TF, Rudel T. 2005. A Global Approach Combining Proteome Analysis and Phenotypic Screening with RNA Interference Yields Novel Apoptosis Regulators. *Molecular Cellular Proteomics* 4:44-55.
- Mack JA, Anand S, Maytin EV. 2005. Proliferation and cornification during development of the mammalian epidermis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:314-329.
- Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. 2006. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol* 168:639-648.
- Martin AC, Thornton JD, Liu J, Wang X, Zuo J, Jablonski MM, Chaum E, Zindy F, Skapek SX. 2004. Pathogenesis of persistent hyperplastic primary vitreous in mice lacking the arf tumor suppressor gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:3387-3396.
- McKeller RN, Fowler JL, Cunningham JJ, Warner N, Smeyne RJ, Zindy F, Skapek SX. 2002. The Arf tumor suppressor gene promotes hyaloid vascular regression during mouse eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3848-3853.
- Micke P, Basrai M, Faldum A, Bittinger F, Ronnstrand L, Blaukat A, Beeh KM, Oesch F, Fischer B, Buhl R, Hengstler JG. 2003. Characterization of c-kit expression in small cell lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 9:188-194.
- Montoliu L, Larue L, Beermann F. 2004. On the use of regulatory regions from pigmentary genes to drive the expression of transgenes in mice. *Pigment Cell Res* 17:188-190.
- Nadeau JH. 2001. Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2:165-174.
- Nakamura H, Izumoto Y, Kambe H, Kuroda T, Mori T, Kawamura K, Yamamoto H, Kishimoto T. 1994. Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. *J Biol Chem* 269:25143-25149.
- Nickel W. 2005. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6:607-614.
- Noonan FP, Dudek J, Merlino G, De Fabo EC. 2003. Animal models of melanoma: an HGF/SF transgenic mouse model may facilitate experimental access to UV initiating events. *Pigment Cell Res* 16:16-25.
- Noonan FP, Recio JA, Takayama H, Duray P, Anver MR, Rush WL, De Fabo EC, Merlino G. 2001. Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 413:271-272.
- Okuda Y, Nakamura H, Yoshida K, Enomoto H, Uyama H, Hirotani T, Funamoto M, Ito H, Everett AD, Hada T, Kawase I. 2003. Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis in vivo through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor. *Cancer Sci* 94:1034-1041.
- Oliver JA, Al-Awqati Q. 1998. An endothelial growth factor involved in rat renal development. *J Clin Invest* 102:1208-1219.

- Ooi BN, Mukhopadhyay A, Masilamani J, Do DV, Lim CP, Cao XM, Lim IJ, Mao L, Ren HN, Nakamura H, Phan TT. 2010. Hepatoma-derived growth factor and its role in keloid pathogenesis. *J Cell Mol Med* 14:1328-1337.
- Panelos J, Tarantini F, Paglierani M, Di Serio C, Maio V, Pellerito S, Pimpinelli N, Santucci M, Massi D. 2008. Photoexposure discriminates Notch 1 expression in human cutaneous squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 21:316-325.
- Papaioannou VE, Behringer, R.R. 2004. *Mouse Phenotypes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Pellegrini L. 2001. Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Curr Opin Struct Biol* 11:629-634.
- Penna D, Schmidt A, Beermann F. 1998. Tumors of the retinal pigment epithelium metastasize to inguinal lymph nodes and spleen in tyrosinase-related protein 1/SV40 T antigen transgenic mice. *Oncogene* 17:2601-2607.
- Powell MB, Hyman P, Bell OD, Balmain A, Brown K, Alberts D, Bowden GT. 1995. Hyperpigmentation and melanocytic hyperplasia in transgenic mice expressing the human T24 Ha-ras gene regulated by a mouse tyrosinase promoter. *Mol Carcinog* 12:82-90.
- Qiu C, Sawada K, Zhang X, Cheng X. 2002. The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. *Nat Struct Biol* 9:217-224.
- Reichrath J. 2006. *Molecular Mechanisms of Basal Cell and Squamous Cell Carcinoma*. Springer Science & Business Media, Inc. 137 p.
- Ren H, Chu Z, Mao L. 2009. Antibodies targeting hepatoma-derived growth factor as a novel strategy in treating lung cancer. *Mol Cancer Ther*.
- Ren H, Tang X, Lee JJ, Feng L, Everett AD, Hong WK, Khuri FR, Mao L. 2004. Expression of Hepatoma-Derived Growth Factor Is a Strong Prognostic Predictor for Patients With Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. *J Clin Oncol* 22:3230-3237.
- Rigel DS. 1996. Malignant melanoma: perspectives on incidence and its effects on awareness, diagnosis, and treatment. *CA Cancer J Clin* 46:195-198.
- Rodrigo JP, Garcia-Carracedo D, Gonzalez MV, Mancebo G, Fresno MF, Garcia-Pedrero J. 2010. Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. *Mol Cancer* 9:48.
- Sambrook J, Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandoval R, Urbina F. 1994. Pigmented follicular cyst. *Br J Dermatol* 131:130-131.
- Sanger F, Donelson JE, Coulson AR, Kossel H, Fischer D. 1974. Determination of a nucleotide sequence in bacteriophage f1 DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 90:315-333.
- Schmitt CA, McCurrach ME, de Stanchina E, Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. 1999. INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev* 13:2670-2677.
- Serrano M. 2000. The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis* 21:865-869.
- Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. 1996. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85:27-37.

- Sharma-Walia N, Paul AG, Bottero V, Sadagopan S, Veettil MV, Kerur N, Chandran B. 2010. Kaposi's sarcoma associated herpes virus (KSHV) induced COX-2: a key factor in latency, inflammation, angiogenesis, cell survival and invasion. *PLoS Pathog* 6:e1000777.
- Shen XY, Zacal N, Singh G, Rainbow AJ. 2005. Alterations in mitochondrial and apoptosis-regulating gene expression in photodynamic therapy-resistant variants of HT29 colon carcinoma cells. *Photochem Photobiol* 81:306-313.
- Sheng Z, Lewis JA, Chirico WJ. 2004. Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. *J Biol Chem* 279:40153-40160.
- Shet T, Desai S. 2001. Pigmented epidermal cysts. *Am J Dermatopathol* 23:477-481.
- Silbert M, Gurwood AS. 2000. Persistent hyperplastic primary vitreous. *Clin Eye Vis Care* 12:131-137.
- Singh DP, Ohguro N, Kikuchi T, Sueno T, Reddy VN, Yuge K, Chylack LT, Jr., Shinohara T. 2000. Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 267:373-381.
- Slominski A, Paus R, Plonka P, Chakraborty A, Maurer M, Pruski D, Lukiewicz S. 1994. Melanogenesis during the anagen-catagen-telogen transformation of the murine hair cycle. *J Invest Dermatol* 102:862-869.
- So P-I. 2007. *Skin Cancer (The Biology of Cancer)*. Chelsea House Publications. 168 p.
- Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. 2007. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell* 130:986-988.
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517.
- Sporn MB, Todaro GJ. 1980. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 303:878-880.
- Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M, Willis AE. 2008. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* 100:27-38.
- Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. 2002. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2:573-583.
- Stec I, Nagl SB, van Ommen GJ, den Dunnen JT. 2000. The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? *FEBS Lett* 473:1-5.
- Steel KP, Davidson DR, Jackson IJ. 1992. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Development* 115:1111-1119.
- Sue SC, Chen JY, Lee SC, Wu WG, Huang TH. 2004. Solution Structure and Heparin Interaction of Human Hepatoma-derived Growth Factor. *J Mol Biol* 343:1365-1377.
- Takahashi H, Shibuya M. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 109:227-241.
- Thomas J, Liu T, Cotter MA, Florell SR, Robinette K, Hanks AN, Grossman D. 2007. Melanocyte expression of survivin promotes development and

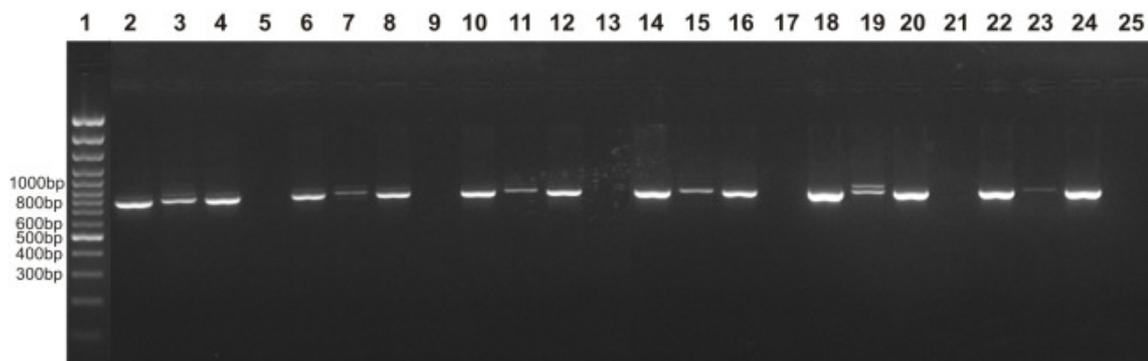
- metastasis of UV-induced melanoma in HGF-transgenic mice. *Cancer Res* 67:5172-5178.
- Tief K, Hahne M, Schmidt A, Beermann F. 1996 (A). Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain. *Eur J Biochem* 241:12-16.
- Tief K, Schmidt A, Aguzzi A, Beermann F. 1996 (B). Tyrosinase is a new marker for cell populations in the mouse neural tube. *Dev Dyn* 205:445-456.
- Tief K, Schmidt A, Beermann F. 1997. Regulation of the tyrosinase promoter in transgenic mice: expression of a tyrosinase-lacZ fusion gene in embryonic and adult brain. *Pigment Cell Res* 10:153-157.
- Tobler NE, Detmar M. 2006. Tumor and lymph node lymphangiogenesis--impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 80:691-696.
- Tsang TY, Tang WY, Tsang WP, Co NN, Kong SK, Kwok TT. 2008. Downregulation of hepatoma-derived growth factor activates the Bad-mediated apoptotic pathway in human cancer cells. *Apoptosis* 13:1135-1147.
- Tsang TY, Tang WY, Tsang WP, Co NN, Kong SK, Kwok TT. 2009. Mechanistic study on growth suppression and apoptosis induction by targeting hepatoma-derived growth factor in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem* 24:253-262.
- Uyama H, Tomita Y, Nakamura H, Nakamori S, Zhang B, Hoshida Y, Enomoto H, Okuda Y, Sakon M, Aozasa K, Kawase I, Hayashi N, Monden M. 2006. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 12:6043-6048.
- Vanegas M, Llano M, Delgado S, Thompson D, Peretz M, Poeschla E. 2005. Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering. *J Cell Sci* 118:1733-1743.
- Weinberg RA. 2007. *The Biology of Cancer*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 796 p.
- Wesche J, Malecki J, Wiedlocha A, Ehsani M, Marcinkowska E, Nilsen T, Olsnes S. 2005. Two nuclear localization signals required for transport from the cytosol to the nucleus of externally added FGF-1 translocated into cells. *Biochemistry* 44:6071-6080.
- Wolnicka-Glubisz A, Noonan FP. 2006. Neonatal susceptibility to UV induced cutaneous malignant melanoma in a mouse model. *Photochem Photobiol Sci* 5:254-260.
- Yamamoto S, Makuuchi H, Shimada H, Chino O, Nishi T, Kise Y, Kenmochi T, Hara T. 2007. Clinical analysis of reflux esophagitis following esophagectomy with gastric tube reconstruction. *J Gastroenterol* 42:342-345.
- Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Doki Y, Yoshida K, Aozasa K, Nakamura H, Monden M. 2006. Expression of Hepatoma-Derived Growth Factor Is Correlated with Lymph Node Metastasis and Prognosis of Gastric Carcinoma. *Clin Cancer Res* 12:117-122.
- Yang J, Everett AD. 2007. Hepatoma-derived growth factor binds DNA through the N-terminal PWWP domain. *BMC Mol Biol* 8:101.

- Yang J, Everett AD. 2009. Hepatoma-derived growth factor represses SET and MYND domain containing 1 gene expression through interaction with C-terminal binding protein. *J Mol Biol* 386:938-950.
- Yoshida K, Tomita Y, Okuda Y, Yamamoto S, Enomoto H, Uyama H, Ito H, Hoshida Y, Aozasa K, Nagano H, Sakon M, Kawase I, Monden M, Nakamura H. 2006. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 13:159-167.
- Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D. 2001. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol* 54:414-418.
- Zeng Q, Li S, Chepeha DB, Giordano TJ, Li J, Zhang H, Polverini PJ, Nor J, Kitajewski J, Wang CY. 2005. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell* 8:13-23.
- Zhang J, Ren H, Yuan P, Lang W, Zhang L, Mao L. 2006. Down-regulation of Hepatoma-Derived Growth Factor Inhibits Anchorage-Independent Growth and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Res* 66:18-23.
- Zhou Z, Yamamoto Y, Sugai F, Yoshida K, Kishima Y, Sumi H, Nakamura H, Sakoda S. 2004. Hepatoma-derived Growth Factor Is a Neurotrophic Factor Harbored in the Nucleus. *Journal of Biological Chemistry. J. Biol. Chem.* 279:27320-27326.

8. Anhang

8.1 Nachweis der HDGF-Expression in der 889-transgenen Mauslinie

8.1.1 mRNA-Expressionsanalyse



Nr.	Tier/Organ	Primer	Nr.	Tier/Organ	Primer
2	TG Gehirn	1559/1850	14	TG S-Haut	1559/1850
3	TG Gehirn	1879/1850	15	TG S-Haut	1879/1850
4	WT Gehirn	1559/1850	16	WT S-Haut	1559/1850
5	WT Gehirn	1879/1850	17	WT S-Haut	1879/1850
6	TG Auge	1559/1850	18	TG Milz	1559/1850
7	TG Auge	1879/1850	19	TG Milz	1879/1850
8	WT Auge	1559/1850	20	WT Milz	1559/1850
9	WTAuge	1879/1850	21	WT Milz	1879/1850
10	TG R-Haut	1559/1850	22	TG Leber	1559/1850
11	TG R-Haut	1879/1850	23	TG Leber	1879/1850
12	WT R-Haut	1559/1850	24	WT Leber	1559/1850
13	WT R-Haut	1879/1850	25	WT Leber	1879/1850

Abbildung 39: mRNA-Analyse von Gehirn-, Auge-, Rückenhaut- (R-Haut), Schwanzhaut- (S-Haut), Milz- und Leberproben einer HDGF^{Tyr}- (TG) und Wildtyp- (WT) Maus.

In Spur 1 wurde der Größenstandard 100 bp DNA Ladder plus aufgetragen. Die Primerkombination 1559/1850 führte zur Amplifizierung der gesamten HDGFcds mit einer Fragmentgröße von 841 bp, während mit Hilfe der Primer 1879/1850 ein Fragment von 861 bp vervielfältigt wurde, das nur die cDNA nachweist, die auf das Tyr-HDGFGen Konstrukt zurückgeht.

8.1.2 Westernblotanalyse der HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}-Mäuse

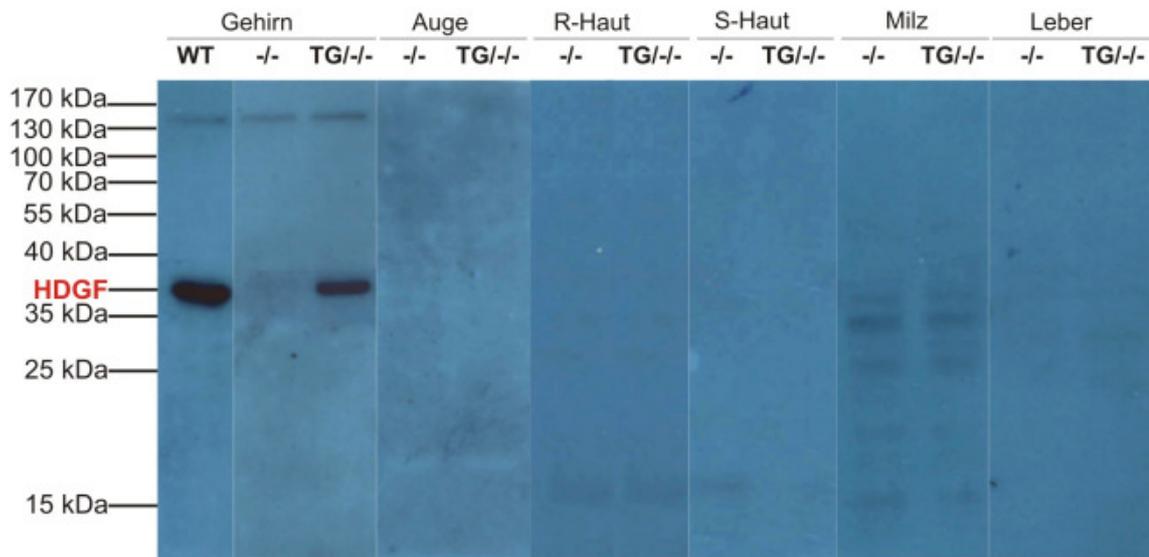


Abbildung 40: Westernblotanalyse von Organlysaten von HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-} (TG^{-/-}) und HDGF^{-/-} (-/-) Mäusen.

Je 40 µg Gesamtprotein der Organlysate von Gehirn, Auge, Rückenhaut (R-Haut), Schwanzhaut (S-Haut), Milz und Leber wurden je Probe aufgetragen. In Spur 1 wurde als Positivkontrolle 40 µg Gehirnlisat einer Wildtyp Maus aufgetragen, in der HDGF auf einer Laufhöhe von 38 kDa detektiert wurde. Die Detektion des HDGF erfolgte durch Inkubation mit dem Kaninchen-anti-HDGF Antikörper in Kombination mit einem Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Zweitantikörper. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL.

8.1.3 *In Situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung der Rückenhaut von $HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}$, $HDGF^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen

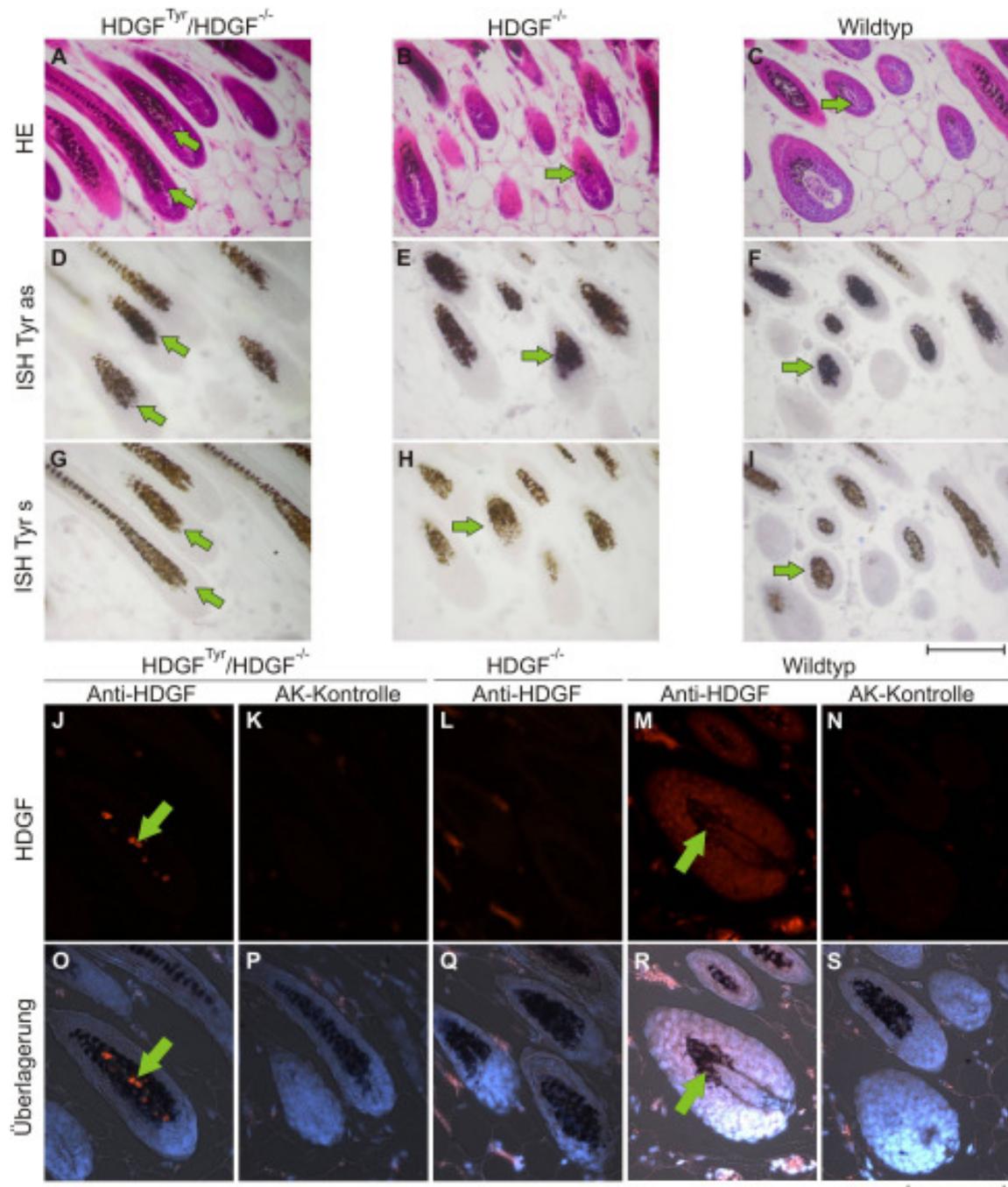


Abbildung 41: *In Situ* Hybridisierung (ISH) und Immunfluoreszenzfärbung der Folgeschnitte.

Im oberen Teil der Abbildung (A-I) sind Bilder der HE-Färbungen und der ISH dargestellt. Der untere Teil gibt einen Überblick über die HDGF-Immunfluoreszenzfärbungen, welche auf den jeweiligen Folgeschnitten angefertigt wurden. Für alle Färbungen wurden 4 μ m dicke Paraffinschnitte der Haut der Genotypen $HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}$, $HDGF^{-/-}$ und Wildtyp (von links nach rechts) verwendet. Von oben nach unten sind folgende Färbungen dargestellt: HE, Detektion der Tyr-as-Sonde, Detektion der Tyr-s-Sonde, HDGF-Färbung (rot) und die Überlagerung (HDGF-

Färbung, DAPI-Färbung und Durchlicht). Die Schnitte wurden mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 inkubiert (AK-Kontrolle nur mit dem 2. AK inkubiert). Die Kerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. HE – Hämatoxylin/Eosin Färbung; ISH – *In Situ* Hybridisierung; Tyr as – Tyrosinase antisense Sonde; Tyr s – Tyrosinase sense Sonde. Die Bilder wurden mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Messbalken entsprechen 100 μm .

8.1.4 Immunfluoreszenzfärbung der Augenpräparate von $HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}$, $HDGF^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen

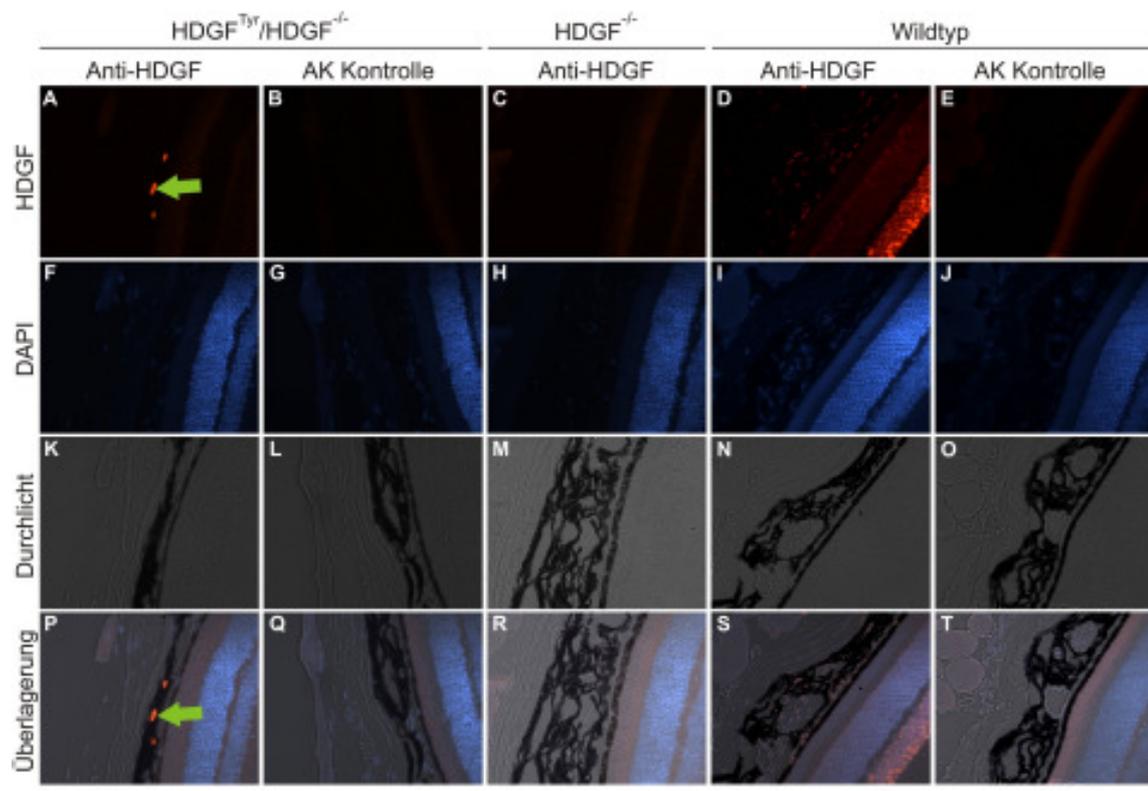


Abbildung 42: Immunfluoreszenzfärbungen von Augenpräparaten.

Färbungen von drei Genotypen sind von links nach rechts abgebildet: $HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}$, $HDGF^{-/-}$ und Wildtyp. Die Schnitte wurden mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 inkubiert (AK-Kontrolle nur mit dem 2. AK inkubiert). Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Von oben nach unten sind Bilder folgender Färbungen zu sehen: HDGF (rot), DAPI (blau), Durchlicht und die Überlagerung der jeweils darüber abgebildeten Bilder. Die Bilder wurden mit einer 400 fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Messbalken entspricht 100 μm .

8.1.5 Immunfluoreszenzfärbung der Gehirnpräparate von $HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}$, $HDGF^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen

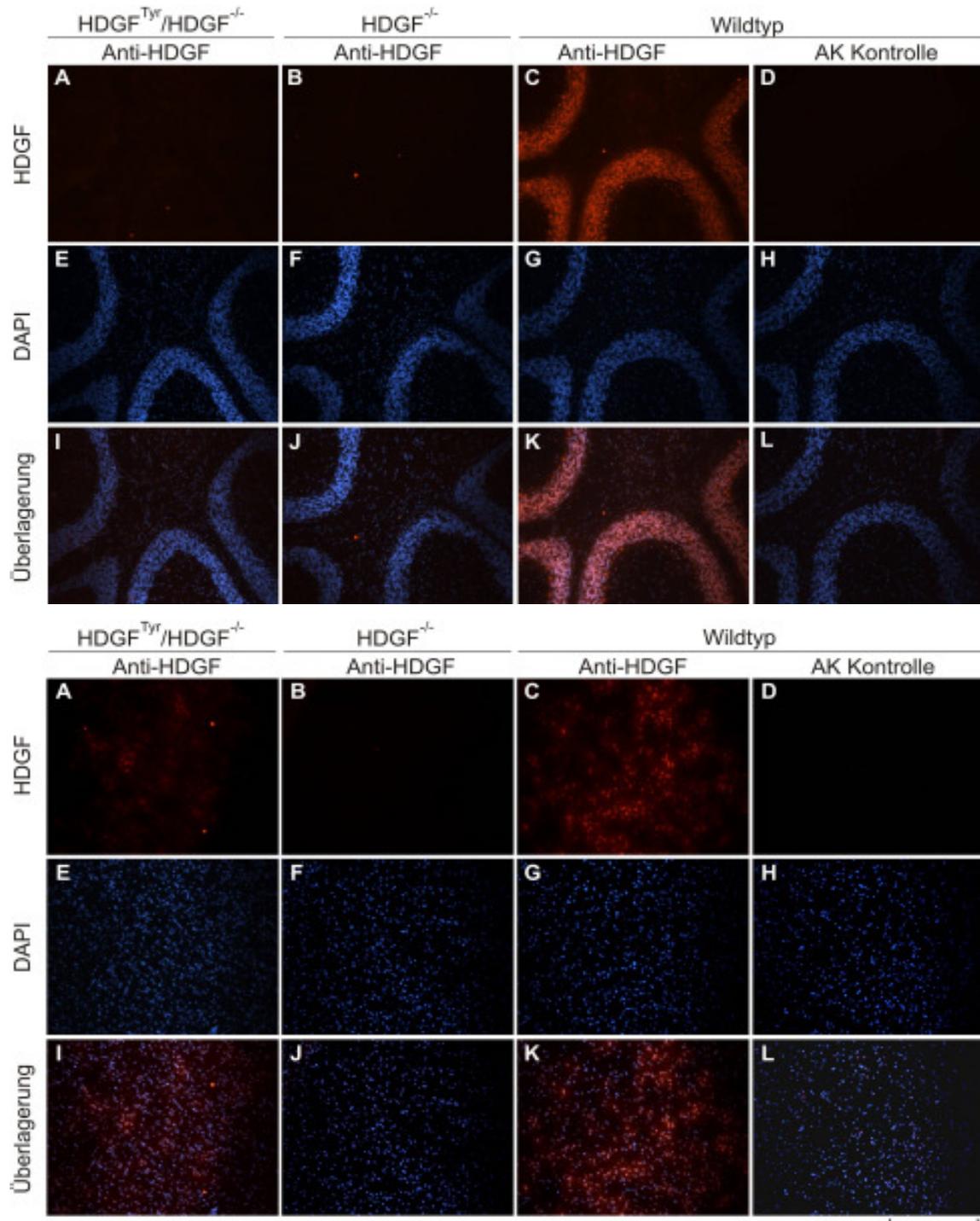


Abbildung 43: Immunfluoreszenzfärbung von Cerebellum (oben) und Cortex (unten).

Für die Färbungen wurden sagittale 10 μ m dicke Kryoschnitte verwendet. Färbungen von drei Genotypen sind von links nach rechts abgebildet: $HDGF^{Tyr}/HDGF^{-/-}$, $HDGF^{-/-}$ und Wildtyp. Die Schnitte wurden mit den Antikörpern Kaninchen-anti-HDGF und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 inkubiert (AK-Kontrolle nur mit dem 2.AK inkubiert). Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Von oben nach unten sind Bilder folgender Färbungen zu sehen: HDGF (rot), DAPI (blau), Durchlicht und die Überlagerung der jeweils darüber abgebildeten Bilder. Die Bilder wurden mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Der Messbalken entspricht 100 μ m.

8.2 Sequenzanalysen

8.2.1 Vergleich der sequenzierten DNA-Fragmente aus Abbildung 4.6

```

HDGF          CGGGGCGCCCCGGGCCCGCCATGTCGCGATCCAACCGGCAGAAAGAGTACAAGTGCGGA 300
Spur_17       TTCGATATCAAGCTTGGTACCATGTCGCGATCCAACCGGCAGAAAGAGTACAAGTGCGGA 90
Kl_Fragment   TTCGATATCAAGCTTGGTACCATGTCGCGATCCAACCGGCAGAAAGAGTACAAGTGCGGA 100
Gr_Fragment   TTCGATATCAAGCTTGGTACCATGTCGCGATCCAACCGGCAGAAAGAGTACAAGTGCGGA 97
              *      *      *****

HDGF          GACCTGGTGTTTGCGAAGATGAAAGGATACCCACACTGGCCGGCCCGGATTGATGAGATG 360
Spur_17       GACCTGGTGTTTGCGAAGATGAAAGGATACCCACACTGGCCGGCCCGGATTGATGAGATG 150
Kl_Fragment   GACCTGGTGTTTGCGAAGATGAAAGGATACCCACACTGGCCGGCCCGGATTGATGAGATG 160
Gr_Fragment   GACCTGGTGTTTGCGAAGATGAAAGGATACCCACACTGGCCGGCCCGGATTGATGAGATG 157
              *****

HDGF          CCTGAGGCTGCAGTGAAGTCAACAGCCAACAAATACCAAGTCTTTTTTTTTGGGACCCAT 420
Spur_17       CCTGAGGCTGCAGTGAAGTCAACAGCCAACAAATACCAAGTCTTTTTTTTTGGGACCCAT 210
Kl_Fragment   CCTGAGGCTGCAGTGAAGTCAACAGCCAACAAATACCAAGTCTTTTTTTTTGGGACCCAT 220
Gr_Fragment   CCTGAGGCTGCAGTGAAGTCAACAGCCAACAAATACCAAGTCTTTTTTTTTGGGACCCAT 217
              *****

HDGF          GAGACGGCATTCCTGGGCCCAAAGACCTCTTCCCTTATGAGGAATCCAAGGAGAAGTTT 480
Spur_17       GAGACGGCATTCCTGGGCCCAAAGACCTCTTCCCTTATGAGGAATCCAAGGAGAAGTTT 270
Kl_Fragment   GAGACGGCATTCCTGGGCCCAAAGACCTCTTCCCTTATGAGGAATCCAAGGAGAAGTTT 280
Gr_Fragment   GAGACGGCATTCCTGGGCCCAAAGACCTCTTCCCTTATGAGGAATCCAAGGAGAAGTTT 277
              *****

HDGF          GGCAAGCCCAACAAGAGGAAAGGGTTTCAGCGAGGGGCTGTGGGAGATCGAGAACAACCT 540
Spur_17       GGCAAGCCCAACAAGAGGAAAGGGTTTCAGCGAGGGGCTGTGGGAGATCGAGAACAACCT 330
Kl_Fragment   GGCAAGCCCAACAAGAGGAAAGGGTTTCAGCGAGGGGCTGTGGGAGATCGAGAACAACCT 340
Gr_Fragment   GGCAAGCCCAACAAGAGGAAAGGGTTTCAGCGAGGGGCTGTGGGAGATCGAGAACAACCT 337
              *****

HDGF          ACAGTCAAGGCCTCTGGCTACCAG----- 564
Spur_17       ACAGTCAAGGCCTCTGGCTACCAG----- 354
Kl_Fragment   ACAGTCAAGGCCTCTGGCTACCAG----- 364
Gr_Fragment   ACAGTCAAGGCCTCTGGCTACCAGCCCTCCCCCTCCTGCACAGGCCCTGCCTGCCCG 397
              *****

HDGF          -----TCCTCCCAGAAAAAGAGTTGTGCGGC 590
Spur_17       -----TCCTCCCAGAAAAAGAGTTGTGCGGC 380
Kl_Fragment   -----TCCTCCCAGAAAAAGAGTTGTGCGGC 390
Gr_Fragment   CCTGTGGGTTAACCCAGGGCTAATCCAACAGAGTCTCCTCCCAGAAAAAGAGTTGTGCGGC 457
              *****

HDGF          AGAGCCCAGGTGGAGCCCAGCCCATGAGGGTGACGGTGATAAGAAGGGCAGTGCAGA 650
Spur_17       AGAGCCCAGGTGGAGCCCAGCCCATGAGGGTGACGGTGATAAGAAGGGCAGTGCAGA 440
Kl_Fragment   AGAGCCCAGGTGGAGCCCAGCCCATGAGGGTGACGGTGATAAGAAGGGCAGTGCAGA 450
Gr_Fragment   AGAGCCCAGGTGGAGCCCAGCCCATGAGGGTGACGGTGATAAGAAGGGCAGTGCAGA 517
              *****

HDGF          GGGCAGCAGCGACGAAGAAGGAAACTGGTGATCGATGAACCAGCCAAGGAGAAGAACGA 710
Spur_17       GGGCAGCAGCGACGAAGAAGGAAACTGGTGATCGATGAACCAGCCAAGGAGAAGAACGA 500
Kl_Fragment   GGGCAGCAGCGACGAAGAAGGAAACTGGTGATCGATGAACCAGCCAAGGAGAAGAACGA 510
Gr_Fragment   GGGCAGCAGCGACGAAGAAGGAAACTGGTGATCGATGAACCAGCCAAGGAGAAGAACGA 577
              *****

HDGF          AAAGGGCACGCTGAAGAGGAGAGCAGGGGATGTGTTGGAGGACTCCCCTAAACGTCCCAA 770
Spur_17       AAAGGGCACGCTGAAGAGGAGAGCAGGGGATGTGTTGGAGGACTCCCCTAAACGTCCCAA 560
Kl_Fragment   AAAGGGCACGCTGAAGAGGAGAGCAGGGGATGTGTTGGAGGACTCCCCTAAACGTCCCAA 570
Gr_Fragment   AAAGGGCACGCTGAAGAGGAGAGCAGGGGATGTGTTGGAGGACTCCCCTAAACGTCCCAA 637
              *****

```


8.2.3 Blast-Analyse des „Großen Fragmentes“

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/25581896?rid=ejw9g3rj01n&blast_rank=1&dopt=genbank&log\\$=nuclalign](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/25581896?rid=ejw9g3rj01n&blast_rank=1&dopt=genbank&log$=nuclalign)

UI-M-FD0-cdl-j-05-0-UI.r1 NIH_BMAP_FD0 Mus musculus cDNA clone IMAGE:6832326 5-, mRNA sequence

```

Gr_Fragment  -----ATGTCGC-GATCCAACCGGCAGAAAGAGTACAAGTGC GGA 39
Est          GTTGCCCTCAGTTCAGGTTTCTCTGGCTGGACGAACGGGTGCGAGGGGCTCAGTTCACA 60
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  GA---CCTGGTGTGGCGAAGATGAAAGGATACCCACACT---GGCCGGCCCGATTGAT 93
Est          GAGGGTTAGGTGGATGTAGAGTTGGCGACTCACAACTTTCTGGAGCATTGATTGAT 120
              **      ****  **  ** **      **  ** *  **      * * * * *
Gr_Fragment  GAGATGCCTGAGGCTGCAGTGAAGTCAACAGCCAACAAATACCAAGTCTTTTTTTTTGGG 153
Est          GAGATGCCTGAGGCTGCAGTGAAGTCAACAGCCAACAAATACCAAGTCTTTTTTTTTGGG 180
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  ACCCATGAGACGGCATTTCCTGGGCCCAAAGACCTCTTCCCTTATGAGGAATCCAAGGAG 213
Est          ACCCATGAGACGGCATTTCCTGGGCCCAAAGACCTCTTCCCTTATGAGGAATCCAAGGAG 240
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  AAGTTTGGCAAGCCCAACAAGAGGAAAGGGTTCAGCGAGGGGCTGTGGGAGATCGAGAAC 273
Est          AAGTTTGGCAAGCCCAACAAGAGGAAAGGGTTCAGCGAGGGGCTGTGGGAGATCGAGAAC 300
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  AACCTACAGTCAAGGCCTCTGGCTACCAGCCCTCCCCCTCTGCACAGAGCCCTGCCT 333
Est          AACCTACAGTCAAGGCCTCTGGCTACCAGCCCTCCCCCTCTGCACAGAGCCCTGCCT 360
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  GCCCGCCTGTGGGTTAACCCAGGGCTAATCCAACAGAGTCTCCAGAAAAAGAGTTG 393
Est          GCCCGCCTGTGGGTTAACCCAGGGCTAATCCAACAGAGTCTCCAGAAAAAGAGTTG 420
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  TGCGGCAGAGCCCGAGGTGGAGCCCGAAGACCATGAGGGTGACGGTGATAAGAAGGGCAG 453
Est          TGCGGCAGAGCCCGAGGTGGAGCCCGAAGCCCATGAGGGTGACGGTGATAAGAAGGGCAG 480
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  TGCAGAGGGCAGCAGCGACGAAGAAGGGAACTGGTGATCGATGAACCAGCCAAGGAGAA 513
Est          TGCAGAGGGCAGCAGCGACGAAGAAGGGAACTGGTGATCGATGAACCAGCCAAGGAGAA 540
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  GAACGAAAAGGGCAGCTGAAGAGGAGAGCAGGGGATGTGTGGAGGACTCCCCTAAACG 573
Est          GAACGAAAAGGGCAGCTGAAGAGGAGAGCAGGGGATGTGTGGAGGACTCCCCTAAACG 600
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  TCCAAGGAGTCAGGAGACCATGAGGAGGAGGACAAGGAGATAGCTGCCTTGGAGGGTGA 633
Est          TCCAAGGAGTCAGGAGACCATGAGGAGGAGGACAAGGAGATAGCTGCCTTGGAGGGTGA 660
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  GAGGCCCTGCCTGTAGAGGTGGAGAAGAAGAGCAGCCCTCTGAGCCAGACTCTGGCCA 693
Est          GAGGCCCTGCCTGTAGAGGTGGAGAAGAAGAGCAGCCCTCTGAGCCAGACTCTGGCCA 719
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  GGGACCTCCTGCAGAGGAAGAAGAGGGAGAGGAAGAGGCTGCCAAGGAAGAGGCTGAAGC 753
Est          GGGACCTCCTGCAGAGGAAGAAGAGGGAGAGGAAGAGGCTGCCAAGGAAGAGGCTGAAGC 762
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Gr_Fragment  CCAGGGCGTCAGAGATCATGAGAGCCTGTAG 784
Est          -----

```

Abbildung 46: Darstellung des Ergebnisses der Blast-Suche.

Die Suche mit der Sequenz des großen Fragmentes (Gr_Fragment) (Abbildung 14) ergab, dass die Sequenz schon mal als EST (Expressed Sequence Tag) sequenziert wurde. Hierfür wurde die gesamte mRNA aus einem Gewebe isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurden zur Erstellung einer Expressions-Bibliothek kloniert und sequenziert (GenBank). Das Vorhandensein der Sequenz in einer solchen Datenbank deutet darauf hin, dass diese Sequenz als mRNA exprimiert wird. Start- und Stoppcodon sind in rot dargestellt.* signalisiert die Übereinstimmung.

8.2.4 DNA-Vergleich

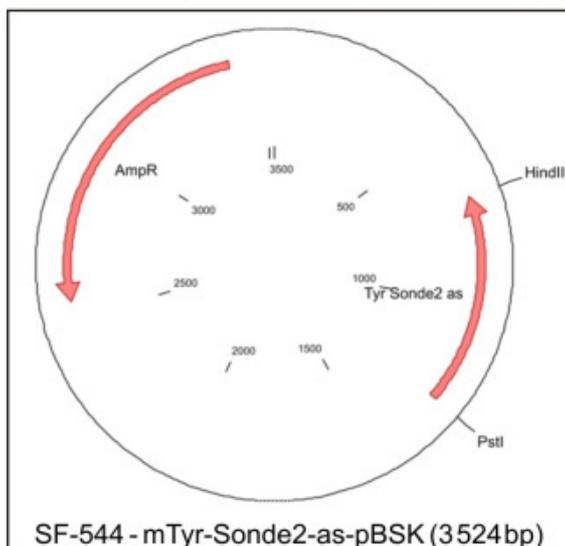
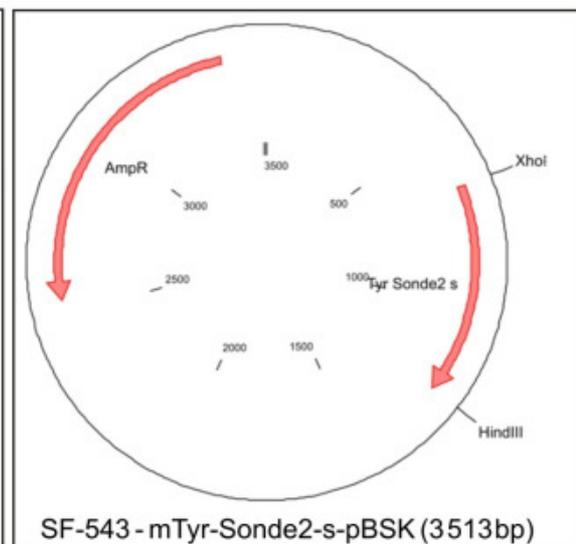
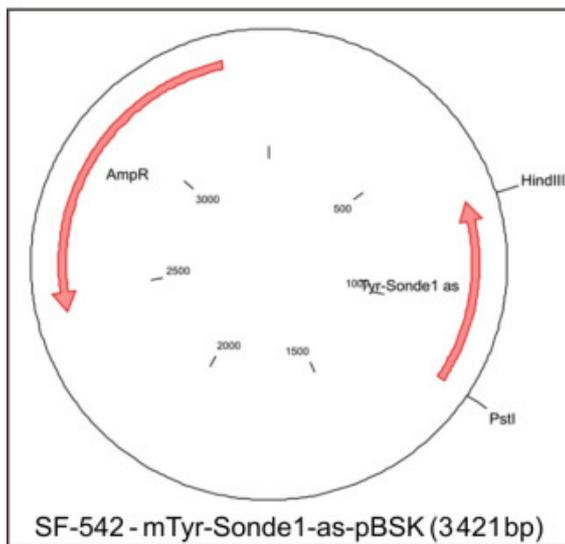
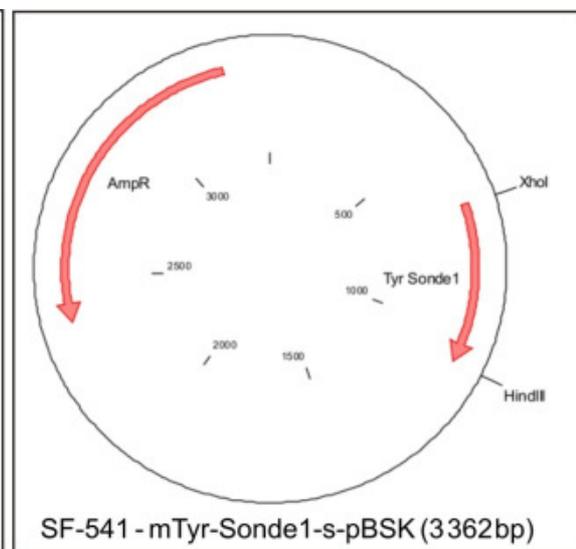
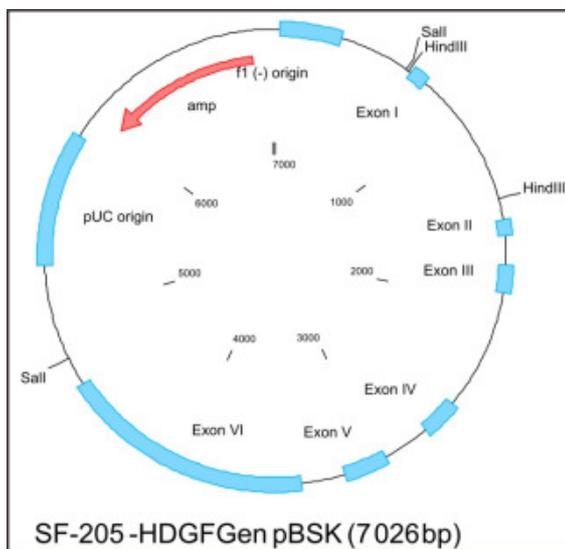
```

Mensch      CCTCCCCCTCCTGCACAGAGCCCTGCCTGCCCGGCCAGTGGGTTTACCCCGGGGCTAA 60
Maus       CCTCCCCCTCCTGCACAGAGCCCTGCCTGCCCGGCCAGTGGGTTAACCCCGGGGCTAA 60
Ratte      CCTCCCCCTCCTGCACAGAGCCCTGCCTGCCCGGCCAGTGGGTTAACCCCGGGGCTAA 60
Rind       CCTCCCCCTCCTGCACAGAGCCCTGCCTGCCCGGCCAGTGGGTTTACCCCGGGGCTAA 60
Hund       CCTCCCCCTCCTGCACAGAGCCCTGCCTGCCCGGCCAGTGGGTTTAGCCCGGGGCTAA 60
          *****
Mensch      TCCGACAGAGGT 72
Maus       TCCAACAGAG-70
Ratte      TCCAACAGAG-70
Rind       TCCGACAGAG-70
Hund       TCCGACAGAG-70
          *** *****

```

Abbildung 47: Nukleotidvergleich der genomischen HDGF-IntronIII Sequenz von Mensch, Maus, Ratte, Rind und Hund, die im großen Fragment aus Abbildung 14 enthalten war. Der Vergleich zeigt, dass diese 70 bp zwischen mehreren Spezies stark konserviert sind. In rot ist das Stoppcodon in Intron III eingezeichnet. * signalisiert Übereinstimmung.

8.3 Vektorkarten



8.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cds	kodierende Sequenz
Cpm	Counts pro Minute
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
dd	Doppelt Destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMBA	Di-Methylbenzanthrazene
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Dinatriumsalz
FCS	Fötales Kälberserum
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HATH	Homology to Amino Terminus of HDGF
HB	HEPES-Puffer
HDGF	Hepatoma-derived growth factor
HDGF ^{-/-}	HDGF-Knockout

HDGF ^{Tyr}	Tyr-HDGF Transgene
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl-)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HMG	High-Mobility Group
HRP	HDGF verwandte Proteine
hu	Human
HSF-1	Heat-Shock Factor 1
ICC	Immuncytochemie
IHC	Immunhistochemie
Ink4a ^{-/-}	Ink4a-Knockout
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ISH	<i>In Situ</i> Hybridisierung
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
Notch1	Notch-Rezeptor 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
POX	Peroxidase gekoppelt
PTM	Posttranslationale Modifikation
(m)RNA	(Boten-)Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Zitrat gepufferte Saline
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TBS	Tris gepufferte Saline
TBS/T	TBS + 0,5 % Tween
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)
Tyr	Tyrosinase
üN	Über Nacht
VEGF	Vasculärer Endothelialer Wachstumsfaktor

Erklärung

Hiermit versichere ich, Angela Sedlmaier, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Bonn, Oktober 2010

Angela Sedlmaier

