

**Aus der Universitätshautklinik Tübingen  
Sektion für Dermatologische Onkologie  
Leiter: Professor Dr. C. Garbe**

**Untersuchungen zur Expression des c-kit-Rezeptors bei  
der Entstehung und Progression des malignen Melanoms**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen

vorgelegt  
von  
Olga Maksimovic  
aus  
Marbach am Neckar

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. C. Garbe
2. Berichterstatter:	Professor Dr. T. Iftner

## Abkürzungen

---

### Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethyl-Pyrocbonat-H <sub>2</sub> O
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer (Maß der Wellenlänge des Lichts)

## Abkürzungen

---

NGS	normal goat serum (Ziegenserum)
NHS	normal horse serum (Pferdeserum)
NRS	normal rabbit serum (Kaninchenserum)
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethyldiamin
Tris-Base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-Base, mit HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit(s) (Enzymneinheit)
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht

## SI-Einheiten

g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
m	Milli-
min	Minute(n)
μ	Mikro-
M	Molar
n	Nano-
sec	Sekunde(n)

## **Abkürzungen**

---

V	Volt
°C	Grad Celcius

## **Verwendete Anglizismen**

Anglizismen sind Begriffe englischsprachigen Ursprungs, die jedoch inzwischen weitgehend Eingang in den deutschen Sprachgebrauch gefunden haben. In der vorliegenden Arbeit werden sie in ihrer ursprünglichen Form verwendet und daher kurz erläutert.

Blot	Transfer einer bestimmten Substanz auf eine Membran
Kit	Kommerziell erhältliches Materialienset zur Durchführung eines Versuchsansatzes
Primer	kurzes synthetisches Oligonukleotid

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Epidemiologie des malignen Melanoms.....	1
1.2 Melanozytenentwicklung .....	2
1.3 Modell der Progression des malignen Melanoms.....	5
1.4 Genetische Grundlagen der Entstehung des malignen Melanoms .....	7
1.4.1 Nukleäre Proteine .....	7
1.4.1.1 Zentrale Signaltransduktionswege und deren Komponenten.....	7
1.4.1.2 Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden .....	9
1.4.1.3 Cadherine .....	9
1.4.1.4 Catenine.....	11
1.4.1.5 Integrine .....	12
1.5 Zelladhäsionsmoleküle mit Immunglobulin-ähnlichen Sequenzen.....	12
1.6 Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren .....	15
1.7 Pro- und anti-apoptotisch wirksame Moleküle beim malignen Melanom..	19
1.8 Onkogene und Tumorsuppressorgene.....	23
1.9 Transkriptionsfaktoren.....	24
1.10 Proto-Onkogen und Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit.....	27
1.10.1 Struktur und Funktion von c-kit .....	27
1.10.2 Stuktur und Funktion von SCF.....	28
1.10.3 Interaktionen zwischen c-kit und anderen Faktoren bei der Melanomprogression .....	29
1.11 Zielsetzungen der Arbeit .....	33
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>34</b>
2.1 Materialien .....	34
2.1.1 Reagenzien, Puffer und Lösungen .....	34
2.1.2 Verwendete molekularbiologische Kits .....	37
2.1.3 Primer .....	38
2.1.4 PCR-Reagenzien.....	39
2.1.5 Antikörper .....	39
2.1.6 Biologische Materialien: Zelllinien .....	40
2.1.7 Geräte .....	40

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.8 Sonstige Materialien .....	41
2.2 Methoden .....	41
2.2.1 Zellbiologische Methoden .....	41
2.2.1.1 Zellkulturbedingungen .....	41
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	43
2.2.1.3 FACS-Analyse .....	43
2.2.2 Proteinchemische Methoden .....	44
2.2.2.1 Proteinextraktion aus Zelllinien .....	44
2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay .....	45
2.2.2.3 Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese .....	45
2.2.2.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese .....	45
2.2.2.5 Western Blotting .....	46
2.2.2.6 Detektion .....	47
2.2.3 Histologische Methode .....	48
2.2.3.1 Immunhistologie .....	48
2.2.3.1.1 Herstellung von Paraffinschnitten .....	48
2.2.3.1.2 Herstellung von Kryostatschnitten .....	49
2.2.3.1.3 Immunhistologische Färbung .....	50
2.2.4 Molekularbiologische Methoden .....	52
2.2.4.1 RNase-freies Arbeiten .....	52
2.2.4.2 RNA-Isolierung aus diversen Zelllinien .....	52
2.2.4.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	53
2.2.4.4 cDNA-Synthese .....	53
2.2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	54
2.2.4.5.1 PCR zur Amplifizierung von GAPDH .....	55
2.2.4.5.2 PCR zur Amplifizierung von <i>c-kit</i> .....	56
2.2.4.5.3 Agarosegel-Elektrophorese .....	57
2.2.4.6 Gelelektion zur Gewinnung definierter DNA-Fragmente aus einem Agarosegel .....	58
2.2.4.7 Herstellung Digoxigenin(DIG)-markierter Sonden .....	59
2.2.4.8 Northern Blotting .....	60
2.2.4.8.1 RNA-Gel .....	61

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.4.8.2 Northern Blotting und Detektion.....	62
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
3.1 Nachweis der c-kit-Proteinexpression .....	64
3.1.1 Detektion der c-kit-Proteinexpression in Melanomzelllinien über FACS-Analyse.....	64
3.1.2 Detektion der c-kit-Proteinexpression in Melanomzelllinien über Western Blot.....	68
3.1.3 Nachweis der c-kit-Proteinexpression in Melanomgewebe über Immunhistologie.....	70
3.2 Nachweis der <i>c-kit</i> -Expression auf RNA-Ebene .....	78
3.2.1 Detektion der <i>c-kit</i> -RNA-Expression über PCR .....	78
3.2.2 Nachweis der <i>c-kit</i> -RNA-Expression über Northern Blotting.....	82
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	83
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>85</b>
4.1 Die Rolle von <i>c-kit</i> bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms .....	85
4.2 <i>c-kit</i> als mögliche molekulare Zielstruktur bei der Melanomtherapie? .....	91
4.3 Ausblick.....	97
4.4 Zusammenfassung .....	100
<b>5 Literatur .....</b>	<b>102</b>



## 1 Einleitung

### 1.1 Die Epidemiologie des malignen Melanoms

Das maligne Melanom, der schwarze Hautkrebs, ist ein von den Pigmentzellen, den Melanozyten, ausgehender Tumor. Er gewinnt aufgrund stets steigender Zahlen der Inzidenz und Mortalität immer mehr an Bedeutung: während die Inzidenz in den siebziger Jahren noch etwa 3 pro 100.000 Einwohner betrug, konnte schon zu Anfang der neunziger Jahre alleine in Deutschland ein Anstieg auf 10-12 pro 100.000 Einwohner verzeichnet werden (Garbe et al., 1991). Die geschätzte Zahl der jährlichen Neuerkrankungen am malignen Melanom in Deutschland beträgt 2900 für die männlichen Bevölkerung und 3400 für die weibliche. Somit zählt das maligne Melanom inzwischen zu den zwölf häufigsten Krebserkrankungen der EU (Esteve, 1993; Jemal et al., 2001; Marrett et al., 2001; Mansson-Brahme et al., 2002).

Die starke Erhöhung der Inzidenz ist insbesondere durch den hellhäutigen Bevölkerungsanteil in Ländern mit hoher Sonneneinstrahlung bedingt (Armstrong and Kricger, 2001; Fears et al., 2002). In Australien beispielsweise ist das maligne Melanom in der Bevölkerungsgruppe der 15- bis 44-Jährigen inzwischen die häufigste Krebsart und auf die Gesamtbevölkerung gesehen die dritthäufigste Karzinomerkrankung bei den Frauen und die vierthäufigste bei den Männern. Statistisch gesehen erkrankt dort somit jede 33-ste Frau und jeder 23-ste Mann am malignen Melanom. Neben der Inzidenz hat sich auch die Mortalität des schwarzen Hautkrebses von etwa 900 pro Jahr in den siebziger Jahren auf nun mehr als 1600 Todesfälle pro Jahr erhöht.

Zu den exogenen prädisponierenden Risikofaktoren, am malignen Melanom zu erkranken, zählen mehrfache schwerwiegende Sonnenbrände in der Kindheit (Bauer and Garbe, 2003; Bauer und Garbe, 2004; Wiecker et al., 2003) sowie die kumulative UV-Exposition. Endogene Risikofaktoren, die zur Genese des malignen Melanoms beitragen, sind neben physikalischen Merkmalen wie helle Haare, Augen und Haut die erbliche Prädisposition (Czajkowski et al., 2004). Diese erbliche Prädisposition, das familiäre Melanom, ist oft vergesellschaftet mit dem sogenannten „dysplastischen Nävussyndrom“, das heißt dem Vorhandensein einer Vielzahl dysplastischer Nävi am ganzen Körper, deren Potenzial zur Entartung relativ hoch ist (CAWLEY et al., 1952; Greene, 1985; Greene et al.,

1985). Die Häufigkeit des familiären Melanoms beläuft sich auf drei bis 14%, wobei es zum Teil regionale Unterschiede gibt (Greene, 1999).

## 1.2 Melanozytenentwicklung

Die Anzahl, Verteilung und der Typ von Pigmentkomplexen bestimmen die interindividuellen Unterschiede in der Pigmentierung von Haut und Haaren. Die Pigmentkomplexe werden Melanosomen genannt und enthalten das biologische Pigment Melanin. Die Melanosomen sind in den Pigmentzellen, den Melanozyten, eingelagert und geben diese während des Pigmentierungsprozesses an die Keratinozyten ab (Nordlund et al., 1989). Die Intensität der Hautpigmentierung hängt insgesamt vom Ausreifungsstadium sowie der Anzahl, Größe und Anordnung der Melanosomen in den Melanozyten und Keratinozyten ab und auch von der Melanindichte in den Melanosomen. Weniger ausschlaggebend ist die Anzahl der epidermalen Melanozyten. Die Ausreifung der Melanosomen verläuft über vier Stadien. Die Hautpigmentierung wird durch die verschiedenen hohen Anteile an Melanosomen unterschiedlicher Stadien bestimmt (Jimbow et al., 1971). Die Melanozyten in sehr heller Haut enthalten größtenteils Stadium I- und – II-Melanosomen, in stärker pigmentierter heller Haut auch noch Stadium III- und – IV-Melanosomen und in schwarzer Haut nahezu ausschließlich Stadium IV-Melanosomen (Szabo et al., 1969; Flaxman et al., 1973). Die Melanosomen dunkelhäutiger Menschen sind größer und liegen in den Keratinozyten einzeln disseminiert vor, während sie bei hellhäutigen Menschen in Komplexen von zwei bis drei Melanosomen aggregiert vorliegen (Szabo et al., 1969; Hori et al., 1968; Wolff und Konrad, 1971).

Melanin kommt in den zwei Hauptformen Eumelanin und Phäomelanin vor. Eumelanin ist ein braunes bis schwarzes, Phäomelanin ein gelb-rotes Pigment. Melanozyten können beide Formen bilden. Im Hinblick auf die Hautpigmentierung ist **MC1R** (*melanocortin-1 receptor*) erwähnenswert. Der Rezeptor ist maßgeblich an der Determinierung des Hauttypes beteiligt (Valverde et al., 1995a). Genetische Variationen des MC1R-Gens sind bei Menschen mit rotem Haar und/oder heller Haut häufig. Bindet der Ligand Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH) an seinen Rezeptor MC1, wird cAMP überexprimiert und induziert dadurch die Melanozytendifferenzierung sowie die Eumelaninbildung (Busca et al., 2000).

Bei geringer Tyrosinase-Enzymaktivität und fehlendem MSH, wie es bei Menschen mit rotem Haar und/oder heller Haut der Fall ist, wird verstärkt Phäomelanin und weniger Eumelanin gebildet (Burchill et al., 1988; Burchill et al., 1986). Das Verhältnis der beiden Melanintypen zueinander legt unsere Haut- und Haarfarbe fest. In stark pigmentierter Haut überwiegt das Eumelanin gegenüber dem Phäomelanin (Jimbow et al., 1993).

Eumelanin bewirkt die stärkste Absorption von sichtbarem sowie von UV-Licht in der Haut und kann somit dem Schutz vor UV-Einflüssen dienen. Das Phäomelanin hingegen ist in der Lage, nach UV-Exposition freie Radikale freizusetzen und kann auf diese Weise sonnenbedingte Hautschäden verursachen (Tobin und Thody, 1994). MC1R-Variationen sind durch die Verminderung der Eumelaninproduktion mit einem erhöhten Risiko, am malignen Melanom zu erkranken, assoziiert (Palmer et al., 2000a; Kennedy et al., 2001a).

Die Melanozyten stammen aus dem Neuroektoderm (Weston, 1970). Ihre unpigmentierten Vorläufer wandern in der frühen Embryonalphase aus der Neuralleiste in die Haut ein und differenzieren sich dort von der achten bis zehnten Schwangerschaftswoche unter dem Einfluß von Melanozytenstimulierendem Hormon (MSH) zu reifen, pigmentierten, dendritischen Melanozyten. Der größte Teil der Melanozyten ist in der Basalzellschicht der Epidermis und in der Matrix der Haarfollikel lokalisiert. Einige Melanozyten befinden sich darüberhinaus in der Dermis und den Schleimhäuten, den Leptomeningen des ZNS, der Uvea und Retina des Auges und auch in der Cochlea und dem vestibulären Labyrinth des Innenohres (NIGOGOSYAN et al., 1964; Zak and Lawson, 1974; Goldgeier et al., 1984; MIYAMOTO und Fitzpatrick, 1957; Savin, 1965). Ausgehend von diesen Lokalisationen ist demnach die Entstehung von malignen Melanomen denkbar.

In der Haut liegen die Melanozyten eingebettet in einer von Keratinozyten gebildeten Basalschicht in der Epidermis und sind in deren Basalmembran verankert. Sie bilden 2% der Zellen der Epidermis, während die Keratinozyten 95% der Zellen ausmachen. Die Dendriten eines jeden Melanozyten reichen bis in die obersten Schichten der Epidermis und dienen der Kontaktaufnahme mit den Keratinozyten. Ein Melanozyt bildet mit 20 bis 35 Keratinozyten eine sogenannte „epidermale Melanineinheit“ mit Zelladhäsionen und interzellulären Kommunikationen zwischen Melanozyten und Keratinozyten (Fitzpatrick et al.,

1967; Jimbow et al., 1976). Die „epidermale Melanineinheit“ und auch die je nach Körperregion unterschiedliche Melanozytendichte ist bei Individuen unterschiedlicher ethnischer Herkunft und Pigmentierung gleichermaßen aufgebaut. Die interindividuellen Unterschiede beruhen vielmehr auf einer unterschiedlichen Morphologie der Melanozyten. So sind in dunkler Haut die Melanozyten größer, haben stärker ausgeprägte Dendriten und enthalten mehr Melanosomen als in heller Haut (STARICCO und PINKUS, 1957; Lucky und Nordlund, 1985).

Während der Wachstumsphase des Körpers proliferieren die Melanozyten, um die Vergrößerung der Hautoberfläche zu kompensieren und ein stabiles Gleichgewicht mit den Keratinozyten aufrecht zu erhalten. Im Erwachsenenalter befinden sich die Melanozyten im Ruhestadium, haben jedoch noch das Potential zur Proliferation. Die Melanozyten schleusen ihre Melanosomen ähnlich einer exokrinen Drüse über ihre Dendriten in das Zytoplasma der sie umgebenden Keratinozyten aus. Die Keratinozyten phagozytieren dann die Dendritenenden mit den Melanin enthaltenden Melanosomen (CRUICKSHANK und HARCOURT, 1964; Klaus, 1969). Erst diese Abgabe von Melanin an die Keratinozyten wird als Pigmentierung der Haut sichtbar.

Die Entwicklung, Funktion und der Erhalt der Melanozyten hängt von der präzisen Interaktion verschiedener Proteine und Enzyme ab, die nicht alle für Melanozyten spezifisch sind. Wird dieses empfindliche Gleichgewicht gestört, kann es daher nicht nur zu Störungen in der Melaninsynthese und zu Pigmentstörungen kommen, sondern auch zu ausgeprägten klinischen Symptomen, die meist mit neurologischen Defekten einhergehen. Pigmentstörungen können durch Genexpressionsstörungen an verschiedenen Punkten des Pigmentierungsprozesses auftreten, wie etwa bei der Melanoblastenentwicklung sowie bei deren Migration. An dieser Stelle führen Genmutationen der Transkriptionsfaktoren PAX3 und MITF zum Waardenburgsyndrom und Mutationen des c-kit-Rezeptors und seines Liganden SCF zu Piebaldismus (Epstein et al., 1991; Goulding et al., 1991; Steel und Smith, 1992; Tassabehji et al., 1993; Tachibana et al., 1994; Hodgkinson et al., 1993; Halaban und Moellmann, 1990; Giebel und Spritz, 1991b; Spritz, 1994). Weiterhin können während der Melaninsynthese oder Melanosomenbildung unter anderem durch die fehlerhafte Synthese von Tyrosinase sowie TRP-1 Pigmentstörungen auftreten,

die sich in Albinismus äußern (Boissy et al., 1996; Chintamaneni et al., 1991; Durham-Pierre et al., 1994; Giebel et al., 1990; Rinchik et al., 1993).

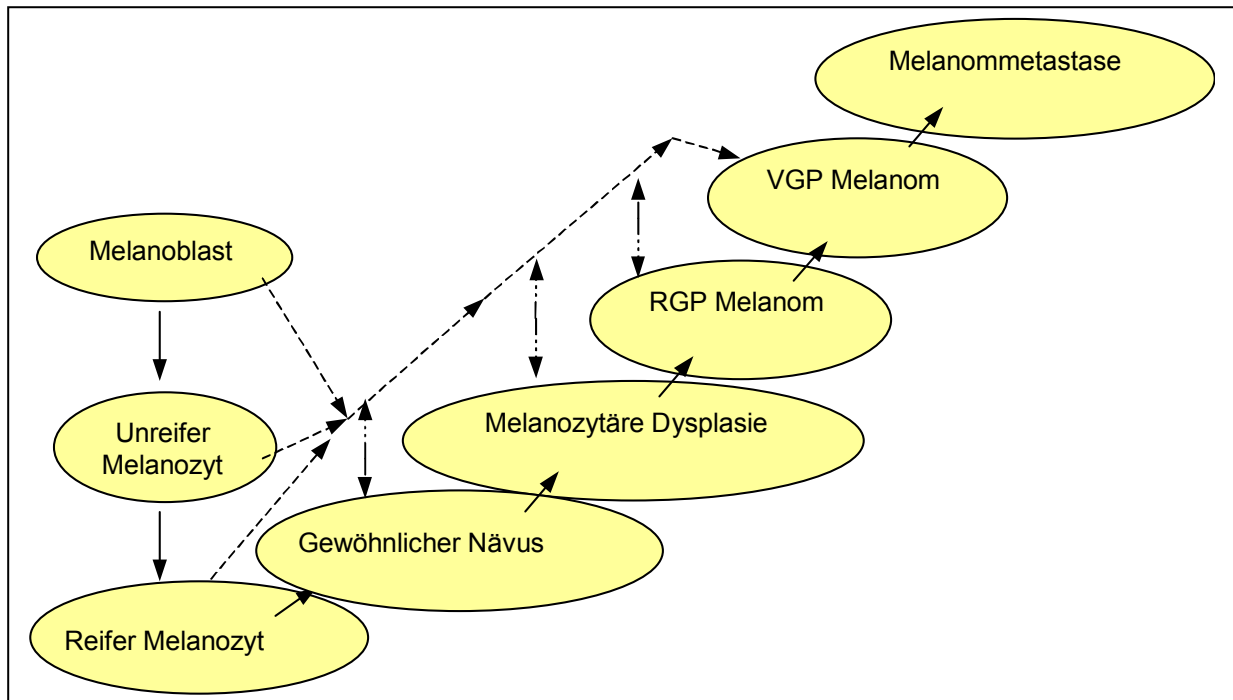
Daneben existieren noch eine Reihe von Genmutationen, die ebenfalls in Pigmentstörungen involviert sind, auf die hier nicht näher eingegangen wird (Urabe et al., 1993; Boissy und Nordlund, 1997).

### 1.3 Modell der Progression des malignen Melanoms

Anhand klinischer und histopathologischer Merkmale erstellten Clark und Elder ein Modell für die stufenweise Progression des malignen Melanoms. Sie sehen die Entstehung eines metastasierenden Melanoms als einen Prozess, der wahrscheinlich über fünf Stadien der Tumorprogression verläuft, die histologisch voneinander unterscheidbar sind (Clark, Jr. et al., 1991; Clark, Jr., 1991; Elder et al., 1993); s.Abb.1). Jedes Stadium zeichnet sich durch Zelltypen mit spezifischen Charakteristika der Morphologie, des Wachstumsverhaltens, der Oberflächenmarker und des Metastasierungsverhaltens aus.

Ausgehend von benignen, reifen Melanozyten findet eine Entwicklung zu erworbenen oder kongenitalen Nävi statt. Clark und Elder sehen somit melanozytäre Nävi als gutartige Neoplasien von Melanozyten. Über die dann folgende melanozytäre Dysplasie ist danach die Entstehung des RGP (*radial growth phase*)-Melanoms möglich. Der kritische Schritt bei der Melanomprogression ist der Übergang vom RGP-Melanom zum VGP (*vertical growth phase*)-Melanom, da hier die Fähigkeit zur Metastasierung erworben wird. RGP-Melanome zeichnen sich dadurch aus, daß sie nicht in die Dermis einwandern (Herlyn et al., 1987a). VGP-Melanome hingegen können aggregieren, weisen ein fokales Wachstum auf und sind befähigt, in die Dermis einzuwandern und zu metastasieren. Als letzte Stufe des Modells ist die Melanommetastase zu sehen.

Die Tumorprogression muß jedoch nicht linear verlaufen. Es können auch Stadien übersprungen werden. So kann ein Melanom auch ohne seine direkte Vorläuferläsion beispielsweise direkt aus Melanozyten oder einem Nävus entstehen (Clark, Jr. et al., 1984; Lopansri und Mihm, Jr., 1979). Umgekehrt ist auch ein Stillstand der Progression möglich, so dass nicht jedes Melanom notwendigerweise die komplette Entwicklung bis hin zur Metastasierung durchlaufen muß.



**Abb.1 Modell der Progression des malignen Melanoms nach Clark und Elder.** RGP = radial growth phase. (radiale Wachstumsphase), VGP = vertical growth phase (vertikale Wachstumsphase).

Melanome werden aufgrund ihrer Morphologie und Lokalisation in vier Subtypen unterteilt: superfiziell spreitendes Melanom (SSM), noduläres Melanom (NM), Lentigo Maligna Melanom (LMM) und schließlich akrolentiginöses Melanom (ALM). Als Parameter für die Prognose und die weitere Therapie ist es üblich, die Eindringtiefe nach Clark bzw. die Tumordicke nach Breslow zu bestimmen. Dabei gilt: bei Clark Level I beschränkt sich das Melanom auf die Epidermis, bei Clark Level II erstreckt es sich bis ins Stratum papillare, bei Clark Level III bis an die Grenze zum Stratum reticulare, bei Clark Level IV ist das Stratum reticulare ebenfalls befallen und bei Clark Level V ist das Melanom bis ins subkutane Fettgewebe vorgedrungen.

Die Metastasierung des malignen Melanoms durchläuft mehrere Stadien. Verschiedene Risikofaktoren wie das Invasionslevel, die Tumordicke und die je nach Geschlecht prozentual unterschiedlich verteilte Tumorlokalisation bestimmen den Ablauf der Metastasierung entscheidend mit, wobei die Lokalisation der wichtigste Faktor ist (Meier et al., 2002). Ab einer bestimmten Dicke des Primärtumors, meist etwa zwei Millimeter, ist seine Nährstoffversorgung durch

Diffusion nicht mehr gewährleistet. Zur Tumorversorgung müssen nun, induziert durch diverse Angiogenesefaktoren, neue Blutgefäße gebildet werden. Weiteres Wachstum ermöglicht die Intravasation der Melanomzellen in die Blut- bzw. Lymphbahnen. Die Verteilung der malignen Zellen in das umliegende Gewebe oder ferner gelegene Organe wird durch die Interaktion der Tumorzellen mit den Blutzellen ermöglicht. Das maligne Melanom metastasiert hauptsächlich in Lunge, Gehirn und Leber (Meier et al., 2002). Dies geschieht durch Extravasation der Tumorzellen aus dem Kapillarbett des Zielorgans, ihre Migration ins Parenchymgewebe und anschließende dortige Proliferation. Zum einen muß nun wieder die Angiogenese eingeleitet werden, um die Versorgung der Tumorzellen zu gewährleisten, zum anderen müssen die Melanomzellen dem Angriff des Immunsystems entkommen. Gelingt ihnen dies, kann der Sekundärtumor an seinem neuen Absiedlungsort weiter wachsen (Fidler et al., 1998).

Die Entwicklung von Metastasen senkt die Überlebenschancen der Patienten in drastischer Weise. Nach Ausbildung von Lymphknotenmetastasen sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate auf 18%, bei Fernmetastasen liegt sie sogar nur noch bei 2% (Schaart et al., 1993). Eine frühzeitige Exzision des Primärtumors steigert die Überlebensrate entscheidend, solange seine Tumordicke unter einem Millimeter liegt. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt bei diesen Patienten immerhin 90% (Orfanos et al., 1994). Das Metastasierungsmuster ist jedoch nicht einheitlich. Bei 50,2 % der Patienten kommt es zunächst zur Metastasierung in die regionären Lymphknoten, 21,7% bilden primär Satellitenmetastasen aus und 28,1% der Patienten bilden ohne vorangehende lymphatische Metastasierung direkt hämatogene Fernmetastasen (Meier et al., 2002).

## 1.4 Genetische Grundlagen der Entstehung des malignen Melanoms

### 1.4.1 Nukleäre Proteine

#### 1.4.1.1 Zentrale Signaltransduktionswege und deren Komponenten

Die drei bedeutendsten Signaltransduktionswege bei der Melanomentstehung sind der **Src**-Kinase-Weg, der **PI-3**-Kinase-Weg und der **RAS-RAF-MEK-ERK**-Signalweg.

Die Familie der **Src**-Kinasen (*cytoplasmic tyrosine kinases*) besteht aus mindestens acht Mitgliedern, untersucht sind bislang **Src**, **Fyn** und **Yes**, die in Melanozyten exprimiert werden (Wellbrock et al., 2002b). Punktmutationen

können die Src-Kinasen aktivieren und konstitutiv aktiviertes Src ist in der Lage, Zellen zu transformieren. Darüberhinaus fördert Src die Zellproliferation, -adhäsion und -migration und hemmt die Zelldifferenzierung (Niu et al., 2002; Huang et al., 2003).

Der **PI-3-Kinase-Signaltransduktionsweg** (*phosphatidylinositol-3-kinase, lipid kinase*) reguliert in Zellen die Beweglichkeit (Motilität), die Proliferation, das Überleben sowie den intrazellulären Transport. Die PI-3-Kinase liegt in vielen transformierten Zellen konstitutiv aktiviert vor (Bedogni et al., 2004). Essentiell beim PI-3-Kinase-Signalweg ist die Aktivierung von Akt, einer Serin/Threonin-Proteinkinase (Diehl et al., 1998; Shiojima und Walsh, 2002; Vivanco und Sawyers, 2002).

Der **RAS-RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionsweg** spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Überlebens und des Wachstums von Zellen, darüberhinaus im Zellzyklus und der Zelldifferenzierung (Lewis et al., 1998; Pearson et al., 2001). Versuche an transgenen Mäusen zeigten, daß **RAS** für die Melanomentstehung essentiell ist (Broome et al., 1999; Chin et al., 1997; Chin et al., 1999), wobei der genaue Mechanismus von RAS bei der Zellproliferation noch nicht untersucht ist. In Melanomzellen wurde die Expression der Onkogene **N** (*neuroblastoma*)-ras, **K** (*Kirsten*)-ras und **H** (*Harvey*)-ras nachgewiesen (Bos, 1989). Mutationen von N-ras wurden in 56% der untersuchten kongenitalen Spitz-Nävi, in 33% der Primärmelanome und 26% der Metastasen gefunden (Papp et al., 1999; Bastian et al., 2000; Demunter et al., 2001).

Ras ist ein kleines G-Protein, welches in der Zellmembran verankert ist und an Signalübertragungen von Tyrosinkinase mitwirkt (Polisky und Cordon-Cardo, 2003). Aktiviertes Ras ist wiederum in der Lage, den PI-3-Kinase-Signalweg (s. oben) oder die Proteinkinase **RAF** zu aktivieren. RAF gehört zur Serin/Threonin-Kinase-Familie und tritt in den drei Isoformen A-RAF, B-RAF und C-RAF auf. In aktiviertem Zustand stimulieren diese die **MEK-Kinasen** MEK 1 und MEK 2 (*mitogen activated ERK-activating kinases*), welche nachfolgend **ERK 1** und **ERK 2** (*extracellular signal-regulated kinases*) aktivieren und damit eine Reihe von Signalen auslösen können, wie etwa die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Smalley, 2003).

Die RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade kann auch durch  $\alpha$ -MSH, ET-1 (*endothelin-1*) und SCF (*stem cell factor*) aktiviert werden, wobei die einzelnen



Aktivierungen sehr schwach sind und erst synergistisch signifikante Proliferationssignale entstehen. Die konstitutive Aktivierung wird als ein sehr frühes Ereignis bei der Melanomentstehung gesehen und weniger mit der Progression des malignen Melanoms in Zusammenhang gebracht (Cohen et al., 2002). Darüberhinaus ist die Induktion des ERK-Signalwegs auch für die Melanozytenproliferation *in vitro* essentiell (Bohm et al., 1995; Imokawa et al., 2000; Wellbrock et al., 2002a; Satyamoorthy et al., 2003)).

Die RAF-Isoform B-RAF liegt in 60 bis 70 % der malignen Melanome sowie in 80 % der Nävi mutiert vor (Davies et al., 2002; Wellbrock et al., 2004). Meist handelt es sich dabei um eine einzelne Punktmutation, die zu einem Austausch von Valin gegen Glutaminsäure an Position 599 (V599E) innerhalb der Kinasedomäne von Exon 15 führt (Pollock et al., 2003). Inzwischen liegen jedoch auch Studien vor, deren Ergebnisse einen weitaus geringeren Zusammenhang zwischen der BRAF-Mutation und dem malignen Melanom vermuten lassen (Yazdi et al., 2003).

Festzuhalten bleibt, daß die B-RAF-Aktivierung zwar nicht die alleinige Komponente bei der Melanozytentransformation sein kann, da der Mutationsanteil in Nävi hoch ist, jedoch könnte sie ein Initiationsschritt in der Transformationskaskade sein.

#### **1.4.1.2 Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden**

Eine veränderte Expression von Zell-Adhäsionsmolekülen spielt in der Karzinogenese des malignen Melanoms eine wichtige Rolle (Christofori und Semb, 1999). Nachfolgend wird ein Überblick über die wichtigsten Adhäsionsmoleküle beim Melanom gegeben.

#### **1.4.1.3 Cadherine**

Cadherine gehören der Familie der Transmembrannglykoproteine an, die an der Kalzium-abhängigen Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind und die Zellerkennung, Motilität, Gewebsintegrität und Homöostase der gesunden Haut steuern. Am besten untersucht sind bislang E-Cadherin und N-Cadherin.

E-Cadherin wird in der gesunden Haut auf der Oberfläche aller epidermalen Zellen, einschließlich Melanozyten, Langerhanszellen sowie Keratinozyten, den wichtigsten Interaktionspartnern der Melanozyten, exprimiert (Hsu et al., 2000). E-Cadherin ermöglicht es den Keratinozyten, die Melanozytenproliferation und die

Expression von Zelloberflächenmolekülen auf Melanozyten zu kontrollieren sowie das Gleichgewicht zwischen Keratinozyten und Melanozyten zu regulieren (Hsu et al., 2000; Valyi-Nagy et al., 1993; Shih et al., 1994). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, daß sich isoliert in Kultur wachsende Melanozyten phänotypisch von *in situ* wachsenden Melanozyten unterscheiden (Valyi-Nagy et al., 1993; Herlyn et al., 1987b).

N-Cadherin wird von den mesenchymalen Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert. Während der Melanomprogression kommt es einerseits zu einem allmählichen Verlust der E-Cadherin-Expression, andererseits zu einer allmählichen Zunahme der N-Cadherin-Expression (Li und Herlyn, 2000; McGary et al., 2002). Durch die Herunterregulierung von E-Cadherin geht die Kontrolle der Keratinozyten über die Melanozyten verloren und die Tumordinvasion wird erleichtert. Dieser Verlust der Kommunikation zwischen Keratinozyten und Melanozyten ist für die Melanomentstehung von zentraler Bedeutung (Hsu et al., 2000; Tamura, 1997). Als Ursache des Expressionsverlustes von E-Cadherin bei der malignen Transformation von Melanozyten konnten weder Mutationen im E-Cadherin-Gen noch Methylierungen im Promoter gefunden werden. Beobachtet wurde hingegen, daß der Transkriptionsfaktor SNAIL und die E-Cadherin-Expression koreguliert sind, wobei eine Überexpression von SNAIL die E-Cadherin-Expression unterdrückt und so das Metastasierungspotential von Melanomzellen erhöht. Desweiteren ist bekannt, daß der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  (*tumor growth factor*) eine autokrine Herunterregulierung von E-Cadherin vermitteln kann (Janji et al., 1999).

Die Zunahme der N-Cadherin-Expression hingegen erleichtert den Melanomzellen die Verknüpfung zu benachbarten Melanomzellen, Fibroblasten und Gefäßendothelzellen und fördert somit die Bildung von Tumorzellnestern, die Invasion in die Dermis sowie die Intra- und Extravasation. N-Cadherin verleiht den Melanomzellen dadurch neue Adhäsionseigenschaften (Li et al., 2001).

Die N-Cadherin-vermittelte Zell-Adhäsion verhindert darüberhinaus die Apoptose von Melanomzellen durch Aktivierung des anti-apoptotischen Moleküls *Akt/PKB* mit anschließender intrazellulärer  $\beta$ -Catenin-Erhöhung und dadurch folgender Inaktivierung des Apoptosemoleküls *Bad* (Li et al., 2001).

Zusammenfassend resultiert also die veränderte Expression der Cadherine in einer gestörten Zellinteraktion und schafft so geeignete Bedingungen für Tumorwachstum und –invasion.

#### 1.4.1.4 Catenine

$\beta$ -Catenin spielt eine wichtige Rolle bei der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion. Es verknüpft die Signalübertragung zwischen E-Cadherin und dem Aktinzytoskelett sowie den Tyrosinkinase der Wachstumsfaktoren einerseits und der Wnt-Signalkaskade andererseits (Worm et al., 2004; Weeraratna et al., 2002; Kemler, 1993; Gumbiner und Yamada, 1995; Mareel et al., 1997; Yap et al., 1997; Brown und Moon, 1998).

Die Interaktionen von  $\beta$ -Catenin, den Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef sowie dem APC-Gen können die Melanomentstehung und –progression fördern (Worm et al., 2004).  $\beta$ -Catenin aktiviert durch Bindung die Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef (Korinek et al., 1997).

Die Bindung des APC-Proteins an  $\beta$ -Catenin kann zu einer intrazellulären Abnahme der  $\beta$ -Catenin-Konzentration führen. Dadurch werden die Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef wieder freigesetzt und liegen somit inaktiv vor (Korinek et al., 1997). Desweiteren können Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen die Funktion so stark verändern, daß es nicht mehr zu inhibieren ist (Morin et al., 1997).

In sieben von 26 humanen Melanomzelllinien wurden stark erhöhte Mengen an  $\beta$ -Catenin detektiert, was auf genetische Defekte in diesem Gen zurückgeführt werden konnte (Rubinfeld et al., 1997). Diese genetischen Veränderungen bewirkten eine Stabilisierung des  $\beta$ -Catenin-Proteins, was wiederum zu einem konstitutiv aktiven  $\beta$ -Catenin/Lef-Komplex führte und somit zum Tumorwachstum beitrug (Nelson und Nusse, 2004).

Im Zusammenhang mit E-Cadherin ist bekannt, daß die Wachstumsfaktorrezeptoren EGFr (*epidermal growth factor receptor*) und c-Met (*hepatocyte growth factor receptor*) durch Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin E-Cadherin inaktivieren und somit auch zur Tumorprogression beitragen können (Jawhari et al., 1999).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß sowohl Veränderungen im APC-Gen als auch im  $\beta$ -Catenin-Gen die Initiation und Progression des malignen Melanoms unterstützen können (Worm et al., 2004).

#### 1.4.1.5 Integrine

Integrine sind heterodimere, aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Einheit bestehende Transmembran-Adhäsionsmoleküle (Hemler et al., 1990; Springer, 1990b; Springer, 1990a; Larson und Springer, 1990; Hynes, 1992). Die verschiedenen Integrin-Untereinheiten binden spezifisch an Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM) (Arnaout et al., 2002). Ihre Aufgabe besteht somit darin, Adhäsionen von Zellen mit der ECM oder anderen Zellen zu vermitteln.

Die Expression der  $\beta_3$ -Integrine korreliert *in vivo* mit der Progression des Melanoms, der Tumordicke, dem Invasionspotential und der Metastasierung (Burrige et al., 1988; Burrige et al., 1990; Felding-Habermann et al., 2002; Li et al., 2002; Meier et al., 2003). Insbesondere der kritische Punkt der Transformation des RGP-Melanoms zum VGP-Melanom ist durch eine steigende  $\beta_3$ -Integrin-Expression gekennzeichnet. Diese Transformation könnte einer durch  $\beta_3$ -Integrin-induzierten Osteonectin/SPARC-Aktivierung zugrunde liegen (Sturm et al., 2002). Desweiteren könnte das Invasionspotential über die Aktivierung von MT1-MMP (*membrane type 1-MMP*) und MMP2 (*matrix metalloproteinase 2*) durch  $\beta_3$ -Integrin erhöht werden (Hofmann et al., 2000).

Insgesamt wurde bestätigt, daß sich das Expressionsmuster der Integrine mit der Tumorprogression verändert und so zum invasiven Potential des Tumors beitragen könnte.

#### 1.5 Zelladhäsionsmoleküle mit Immunglobulin-ähnlichen Sequenzen

Während der Melanomentwicklung kommt es zu Veränderungen der Expression diverser Zell-Adhäsionsmoleküle (*Cell adhesion molecules*, **CAMs**). Von Bedeutung sind **MelCAM**, **L1-CAM** und **ALCAM**.

**MelCAM/MUC18** (CD 146) ist ein heterophiles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül der Immunglobulin-Familie (Shih et al., 1994). Es wird davon ausgegangen, daß MelCAM ein wichtiges Element bei der Melanomprogression und -metastasierung ist. Physiologisch findet sich MelCAM in Endothelzellen, in glatten Muskelzellen

(Sers et al., 1994) und in Immunzellen, beispielsweise in aktivierten T-Lymphozyten (Li und Herlyn, 2000; Pickl et al., 1997). In Melanozyten wird die Expression von MelCAM durch Keratinozyten unterdrückt (Shih et al., 1994). Während der Progression des Melanoms wird MelCAM dann über alle Stadien der Tumorprogression hinweg bis zur Metastasierung proportional zur vertikalen Tumordicke hochreguliert und ist inzwischen ein etablierter Indikator für das metastatische Potential eines Melanoms (Johnson et al., 1989; Johnson, 1992; Collins und White, 1995; Johnson et al., 1993). Der Metastasierungsprozeß wird scheinbar durch MelCAM gemeinsam mit  $\beta_3$ -Integrin gefördert. MelCAM vermittelt darüberhinaus durch Adhäsion an einen bislang unbekanntem Liganden die Interaktion von Melanomzellen untereinander (Shih et al., 1994; Johnson, 1992; Shih et al., 1997). Desweiteren zeigten mit MelCAM transfizierte Zellen eine erhöhte Aktivität an MMP-2, welches die Tumormigration sowie –invasion erleichtert (Hsu et al., 1998).

Zusätzlich wird MelCAM durch Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und CREB durch diese reguliert (Jean und Bar-Eli, 2000; Xie et al., 1997a). Dies deutet darauf hin, daß die MelCAM-Expression auch durch externe Faktoren, wie beispielsweise cAMP, moduliert werden kann, da diese Transkriptionsfaktoren durch erhöhte Mengen an cAMP aktiviert werden (Johnson, 1992; Buettner et al., 1993a; Luscher et al., 1989b; Rummel et al., 1996). Die MelCAM-Expression wird auch durch aktiviertes AKT verstärkt und weist auf eine Regulation von MelCAM durch den AKT-Signalweg hin (Li et al., 2002; Woods et al., 2001). In Versuchen an Nacktmäusen ist es gelungen, MelCAM durch spezifische Antikörper zu blockieren und so das Tumorwachstum und die Metastasierung zu inhibieren (Mills et al., 2002).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß MelCAM durch seine Zellinteraktionen melanozytären Zellen die Fähigkeit zur Tumorinitiation verleiht.

Das Adhäsionsmolekül **L1-CAM** ist ein Transmembranglykoprotein und wird in einigen Tumoren überexprimiert, wie etwa in Lungenkarzinomen, Rhabdomyosarkomen, Melanomen und Neuroblastomen (Katayama et al., 1997; Pancook et al., 1997; Nolte et al., 1999; Kobayashi et al., 1991; Fogel et al., 2003). L1-CAM dient als Rezeptor für Signaltransduktionen und wird physiologisch in hämatopoetischen Zellen, in epithelialen Zellen des Gastrointestinal- und

Urogenitaltraktes sowie in der Epidermis und in neuronalen Zellen exprimiert und vermittelt in letzteren neuronale Adhäsionen und Zellmigrationen (Schuch et al., 1989; Kowitz et al., 1992; Kujat et al., 1995; Thor et al., 1987; Hortsch, 1996).

L1-CAM beeinflusst das zelluläre Wachstum und die Migration durch die Bindung an extrazelluläre Liganden. Als Ligand von L1-CAM wurde das Integrin  $\alpha 9\beta 1$  identifiziert, welches auch auf Melanomzellen zu finden ist (Silletti et al., 2000; Smith und Giachelli, 1998).

Beim malignen Melanom wird eine erhöhte L1-Expression in Primärmelanomen sowie in Hautmetastasen beobachtet, in Lymphknotenmetastasen hingegen ist die L1-Expression herunterreguliert (Fogel et al., 2003). Die Interaktion von L1-CAM mit seinem Liganden moduliert möglicherweise die transendotheliale Zellmigration beim malignen Melanom (Thies et al., 2002). Über die genaue Funktion von L1-CAM im Zusammenhang mit der Invasion, der Metastasierung sowie der melanozytären Transformation liegen jedoch noch keine Kenntnisse vor.

**ALCAM** (*activated leukocyte cell adhesion molecule*) ist ein Transmembranprotein, welches homotypische und heterotypische Zell-Zell-Interaktionen vermittelt (van Kempen et al., 2004; Degen et al., 1998; Bowen et al., 1995).

Beim malignen Melanom korreliert die Expression von ALCAM *in vitro* mit dem Aggregations- sowie mit dem metastatischen Potential von Melanomzelllinien (Degen et al., 1998). Im Hautrekonstruktmodell wird durch die von ALCAM geförderte Zellneubildung nachfolgend die Zellbewegung gefördert und die Progression vom RGP-Melanom in ein VGP-Melanom unterstützt (van Kempen et al., 2004).

Auch *in vivo* korreliert die ALCAM-Expression mit der Tumorprogression. Hier zeigte sich, daß die meisten Nävi und RGP-Melanome kein ALCAM exprimieren, wohingegen in der Hälfte der VGP-Melanome eine starke ALCAM-Expression nachweisbar war (van Kempen et al., 2000).

Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, daß ALCAM bei der Progression des malignen Melanoms eine wichtige Rolle spielt und als neuer molekularer Marker von prognostischem Wert sein könnte (van Kempen et al., 2000).

Die drei **ET**(*Endothelin*)-Peptide ET-1, ET-2 und ET-3 binden an ihre zugehörigen, an G-Proteine gekoppelten, Rezeptoren **ETRA** und **ETRB** und spielen beim

malignen Melanom unterschiedliche Rollen (Inoue et al., 1989; Sakurai et al., 1990).

Dabei zeigt ETRA eine gleichermaßen hohe Affinität zu ET-1 und ET-2, während ETRB eine gleich hohe Affinität zu allen drei Endothelinen aufweist (Herlyn et al., 2000). Die beiden Rezeptoren haben offensichtlich gegensätzliche Funktionen. Während ETRA das Zellwachstum hochreguliert, nimmt man im Allgemeinen an, daß ETRB dieses eher unterdrückt (Sugawara et al., 1996; Okazawa et al., 1998). ETRB wird aber zunächst für die Regulierung der Anzahl an Melanoblasten-Vorläufern benötigt und ist für das Wachstum und die Differenzierung von Melanozytenvorläufern wichtig (Ono et al., 1998; Lahav et al., 1998; Sviderskaya et al., 1998; Hosoda et al., 1994).

Melanomzellen exprimieren sowohl ETRA als auch ETRB, ETRA jedoch stärker als ETRB (Tada et al., 1998; Kikuchi et al., 1996; Eberle et al., 1999). In einer Studie wurden Melanomzellen mit hochreguliertem ETRB mit ET-1 behandelt. Dies führte zu erhöhtem p53 und nachfolgender Apoptose (Okazawa et al., 1998). Desweiteren kann durch UV-Strahlung die ET-1-Expression in Keratinozyten hochreguliert werden, welches nachfolgend E-Cadherin herunterreguliert und somit zur Entkoppelung der Melanozyten von den Keratinozyten und letztlich zur Tumorprogression beiträgt (Herlyn et al., 2000).

Die Rolle von ET-2 ist bislang unklar. ET-3 ist an der Regulation von Pigmentvorläuferzellen in der Dermis beteiligt. Seine Rolle in späteren Stadien ist ebenfalls noch unklar.

Aus diesen Daten wird deutlich, daß die Rolle der Endotheline und ihrer Rezeptoren noch genauer definiert werden muß.

### 1.6 Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

Eine Reihe von Peptidwachstumsfaktoren wirken an verschiedenen Punkten der Tumorprogression wachstumsfördernd. Sie können einerseits durch Angiogeneseinduktion die Nährstoffversorgung des Tumors gewährleisten und so zum weiteren Wachstum, zur Invasion und Metastasierung beitragen. Andererseits könne sie auch direkt auf das Tumorzellwachstum fördernd wirken.

Zu den wichtigsten Peptidwachstumsfaktoren beim malignen Melanom gehören **bFGF** (*basic fibroblast growth factor*), **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*),

**IGF-1** (*interleukin growth factor-1*), **PDGF** (*platelet derived growth factor*), **EGF** (*endothelial growth factor*), **TGF** (*tumor growth factor*), sowie mehrere **Zytokine**.

**bFGF** ist ein Heparin-bindendes Polypeptid mit mitogener Wirkung, welches am Erhalt von Zellen und deren Transformation beteiligt ist. Desweiteren kann bFGF als potentieller Angiogenesefaktor wirken (Streit und Detmar, 2003).

Die bFGF-Expression korreliert mit der Melanomprogression. Der Wachstumsfaktor wird von Fibroblasten sowie von Keratinozyten, darüberhinaus von nahezu allen Melanomzellen, allerdings nicht von Melanozyten, exprimiert (Reed et al., 1994; Wang und Becker, 1997; Meier et al., 2000). Eine autokrine Stimulation von Melanomzellen durch bFGF wurde klar nachgewiesen. Dies bedeutet, daß Melanomzellen – unter anderem aufgrund der eigenen Produktion von bFGF- in der Lage sind, auch ohne exogen zugeführte Wachstumsfaktoren zu proliferieren. Zusätzlich wirkt bFGF parakrin auf die Angiogenese und Stromabildung und kann darüberhinaus extrazelluläre, proteolytische Enzyme aktivieren. Desweiteren werden durch Chemotaxis Mastzellen aktiviert, welche ebenfalls bFGF produzieren (Nesbit et al., 1999; Shih und Herlyn, 1994). Im Einklang mit diesen Daten wurde gezeigt, daß die Inhibition von bFGF *in vivo* wiederum das Tumorstadium hemmt (Wang und Becker, 1997).

Untersuchungen über die Wirkung von UVB-Strahlen, welche in der Haut DNA-Schäden verursachen, und die Überexpression von bFGF in Melanozyten legten dar, daß bFGF ohne UV-Strahlung zur Hyperpigmentierung der Haut sowie zur Induktion der Melanozytenproliferation führte, während es bei zusätzlicher UVB-Bestrahlung zu einer Transformation der Melanozyten kam (Berking et al., 2001a). Sind neben bFGF noch die Wachstumsfaktoren SCF (*stem cell factor*) sowie ET-3 (*endothelin-3*) exprimiert, kann sich ein Melanozyt unter UVB-Belastung innerhalb von nur vier Wochen zu einer Melanomzelle transformieren (Berking et al., 2004).

**VEGF** ist wie bFGF ein Heparin-bindendes Polypeptid und als Angiogenesefaktor wirksam (Neufeld et al., 1999; Velasco und Lange-Asschenfeldt, 2002; Yu et al., 2002). VEGF ist jedoch spezifisch für Endothelzellen und wird bei entzündlichen Prozessen sowie in einigen Tumoren exprimiert (Ferrara, 2000). Es wird eine Korrelation zwischen der VEGF-induzierten Angiogenese und dem Invasionspotential von Melanomen postuliert (Simonetti et al., 2002), denn es



konnte zum einen gezeigt werden, daß die Progression eines RGP-Melanoms in ein VGP-Melanom mit einer erhöhten VEGF-Expression einhergeht, zum anderen ist die VEGF-Expression im Melanoma *in situ* schwächer als in invasiven malignen Melanomen (Gitay-Goren et al., 1993). Desweiteren zeigten Studien, daß eine Inhibition von VEGF sowohl die Angiogenese als auch das Tumorwachstum *in vivo* unterdrückt (Detmar, 2000).

Die Regulation von VEGF findet über eine Reihe von Onkogenen statt, vor allem ras als Induktor und p53 als Suppressor (Grugel et al., 1995; Kieser et al., 1994), und über weitere Faktoren wie Zyklooxygenase-2, Heregulin  $\beta$ -1, den Hormonen Insulin und Östrogen, den Wachstumsfaktoren EGF und bFGF sowie über N-Acetylcysteine (Gately, 2000; Xiong et al., 2001; Bermont et al., 2001b; Bermont et al., 2001a; Mueller et al., 2000; Hyder et al., 2000; Maity et al., 2000; Danielsen und Rofstad, 1998; Claffey et al., 2001; Redondo et al., 2000). Darüberhinaus konnte durch *in vitro*- und *in vivo*-Studien an Melanomen gezeigt werden, daß durch ein hypoxisches Milieu VEGF hochreguliert werden kann (Claffey und Robinson, 1996; Rofstad und Danielsen, 1998).

Weitere Mitglieder der FGF-Familie mit mitogener Wirkung auf Melanozyten sind **K-FGF**, **FGF-6**, auf die hier nicht weiter eingegangen wird, sowie weitere Faktoren wie der **SCF** (*Stem Cell Factor*) und **HGF** (*Hepatocyte Growth Factor*). Letzterer stimuliert das Zellwachstum, die –bewegung und Invasion einer Vielzahl an Zellen, darunter auch von Melanozyten (Noonan et al., 2003).

**IGF-1** und Insulin binden an denselben Rezeptor wie die Faktoren der FGF-Familie und fördern die Proliferation von Melanozyten und Melanomzellen.

**PDGF** (*platelet-derived growth factor*) wird in diversen Tumoren gefunden, darunter auch in Melanomzellen. Der Wachstumsfaktor ist am Tumorwachstum, an der Angiogenese sowie der Metastasierung beteiligt (Rofstad und Halsor, 2000). In Primärmelanomen und in metastatischen Melanomen wurden zwei Formen von PDGF gefunden, PDGF-A und PDGF-B. PDGF wird von Melanomzellen und auch anderen Tumorzellen produziert und fördert die Bildung von Tumorstroma und Blutgefäßen. Auf normale Melanozyten wirkt PDGF toxisch. Es gibt zwei PDGF-Rezeptoren, von denen nur der  $\alpha$ -Typ, nicht aber der  $\beta$ -Typ in

primären sowie metastatischen Melanomen exprimiert wird und somit eine autokrine Stimulation von Melanomzellen ermöglicht (Barnhill et al., 1996).

Der **EGF**-Rezeptor ist an eine Tyrosinkinase gekoppelt und wird vom **erbB-Gen** kodiert. Der EGF-Rezeptor fördert die Zellproliferation, die Mitose und die Wundheilung. Er wird von fast allen Melanomzelllinien exprimiert. Eine erhöhte EGF-Expression scheint beim Melanom mit der Tumorprogression zu korrelieren (Shahbazi et al., 2002).

Die Gruppe der **TGF**-Proteine besteht aus TGF- $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$  und - $\beta_3$ . TGF- $\alpha$  wird von den meisten Melanomzellen und von Keratinozyten produziert, ist aber in normalen Melanozyten nicht nachzuweisen. TGF- $\alpha$  weist große Homologien zu EGF auf, beide Faktoren binden an denselben Rezeptor und fördern die Zellproliferation (Shih and Herlyn, 1994). Die TGF-Proteine zeigen zum Teil eine Korrelation ihrer Expression mit der Progression des Melanoms.

**TGF- $\beta$**  hat auf Melanozyten eine inhibitorische Funktion. Melanomzellen werden durch **TGF- $\beta$**  nicht inhibiert, vielmehr produzieren ihn viele Tumorzellen selbst. Wahrscheinlich korreliert die Expression von **TGF- $\beta$**  mit der Invasion und Metastasierung des Melanoms (Berking et al., 2001b). Bei den Isoformen ist dieses Bild allerdings uneinheitlich, denn sowohl Melanozyten als auch Nävi und Melanomzellen weisen *in situ* eine Expression von TGF- $\beta_1$  auf.

Die beiden Isoformen TGF- $\beta_2$  und - $\beta_3$  zeigen im Verlauf der Tumorprogression einerseits eine zunehmende Expression, wobei über TGF- $\beta_2$  andererseits auch Daten vorliegen, daß in primären und metastatischen Melanomen TGF- $\beta_2$  heterogen exprimiert wird (Schmid et al., 1995; Van Belle et al., 1996).

Das **Zytokin** Interleukin-6 (**IL-6**) wird unter anderem von dermalen Fibroblasten und einigen Melanomzellen produziert. IL-6 besitzt die Fähigkeit, auf Melanomzellen in frühen Wachstumsstadien inhibitorisch zu wirken. Metastasierende Melanomzellen sind meist resistent gegenüber der Wirkung von IL-6.

Unter den Zytokinen sind im Zusammenhang mit dem malignen Melanom außerdem die Interleukine **IL-1**, **IL-8** sowie **IL-10** zu erwähnen.

IL-1 wird von einigen Melanomzellen, tendenziell vermehrt von metastatischen, produziert. Die IL-1-Sekretion könnte daher das metastatische Potential von Melanomzellen erhöhen.

IL-8 wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und wirkt auf Melanomzellen als autokriner Wachstumsfaktor (Scheibenbogen et al., 1995; Gutman et al., 2002). IL-8 scheint am Tumorwachstum, an der Angiogenese sowie an der Metastasierung beteiligt zu sein (Rofstad und Halsor, 2000). So findet man bei Patienten mit Metastasen im Serum erhöhte IL-8-Werte. Diese korrelieren mit der Tumormasse.

Durch IL-8 wird die Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) aktiviert. Dies erhöht das Invasionspotential der Tumorzellen und fördert die Angiogenese sowie die Metastasierung (Bar-Eli, 1999b). Reguliert wird die IL-8-Expression von IL-1, TNF- $\alpha$ , AP-1 sowie NF- $\kappa$ B (Singh et al., 1995; Mohler et al., 1996).

Die Menge an IL-10 im Serum steigt ebenfalls im Verlauf der Tumorprogression (Dummer et al., 1995). IL-10 wird von T-Helferzellen, aber auch von vielen Melanomzelllinien, produziert (Dummer et al., 1996). IL-10 wirkt immunsuppressiv und könnte daher der Tumorsuppression entgegenwirken.

Der Thrombinrezeptor **PAR-1** ist ein Thrombinrezeptor aus der Familie der Protease-aktivierten Rezeptoren und wird durch Thrombin aktiviert. Thrombin hat mitogene Wirkung und ist bei Melanomzellen ein Wachstumsfaktor (Maragoudakis et al., 2000). Die Expression von PAR-1 und dem Transkriptionsfaktor AP-2 ist koreguliert. Nach einem Expressionsverlust von AP-2 wird PAR-1 hochreguliert (Tellez et al., 2003). Die Aktivierung von PAR-1 führt dazu, daß nachfolgend eine Reihe von Genprodukten hochreguliert werden, die an der Zelladhäsion, -invasion und Angiogenese beteiligt sind, wie etwa Alpha-IIb-beta-3-Integrin, Urokinase-Plasminogen-Aktivator, MMP-2, IL-8, VEGF, PDGF. PAR-1 könnte so zur Melanomprogression beitragen (Nyormoi und Bar-Eli, 2003b).

### **1.7 Pro- und anti-apoptotisch wirksame Moleküle beim malignen Melanom**

Die molekularen Komponenten der Apoptose beinhalten pro- und anti-apoptotische Regulatoren, deren empfindliches Gleichgewicht letztlich das Schicksal der Melanomzellen bestimmt.

Die Apoptose wurde 1972 erstmals von Kerr, Wyllie und Currie beschrieben. Sie wirkt an der Homöostase sowie an der Tumorentstehung mit und ist

morphologisch durch die Fragmentierung der DNA gekennzeichnet (Wyllie, 1997). Die Apoptose kann über verschiedene Signalwege, zum einen über „Todesrezeptoren“, zum anderen mitochondrial vermittelt ablaufen (Lee et al., 2000; Weber und Vincenz, 2001; Martins et al., 2002; Wu und Deng, 2002; Beere, 2001).

Zu den pro-apoptotischen Regulatoren, die die Apoptose fördern, gehören **p53**, **Apaf-1**, **Bid**, **Noxa**, **PUMA**, **Bax**, **TNF**, **TRAIL**, **Fas/FasL**, **PITSLRE**, **Interferone** sowie **c-kit/SCF**. Zu den anti-apoptotischen Molekülen, welche die Apoptose verhindern, gehören **Bcl-2**, **Bcl-X<sub>L</sub>**, **Mcl-1**, **NFκB**, **Survivin**, **Livin** und **ML-IAP**. Auf die wesentlichsten Faktoren wird im Folgenden näher eingegangen.

Die Rolle von **p53** ist es, die genomische Stabilität der Zelle zu wahren. p53 ist in der Lage, den Zellzyklus am Übergang der G1- in die S-Phase zu stoppen und so die Replikation beschädigter DNA zu verhindern. Weiterhin induziert p53 Apoptose in Zellen mit defekter DNA durch Induktion verschiedener mitochondrialer Proteine wie Bax, Noxa und PUMA (Henry et al., 2002). p53 steht darüberhinaus noch mit anderen Molekülen der Apoptose in Interaktion (Kim et al., 2002).

**Apaf-1** (*alterations of apoptosis protease-activating factor 1*) vermittelt mit Cytochrom c und Caspase 9 die p53-abhängige Apoptose. Der Expressionsverlust von Apaf-1 ist bei metastatischen Melanomzellen mit einer Chemotherapeutika-Resistenz assoziiert (Soengas et al., 2001).

Zur **Bcl-2**-Familie gehören neben Bcl-2 noch **Bid**, **Noxa**, **PUMA**, **Bax** und **Mcl-1** und **Bcl-X<sub>L</sub>**.

**Bcl-2** (*B cell CLL/lymphoma 2*) ist ein Membran-assoziiertes anti-apoptotisches Protein (Jacobson et al., 1993). Bcl-2 reguliert die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien sowie die Interaktion von Apaf-1 mit Caspase 9, die Bindung an Bax und vermag die c-myc-induzierte Apoptose zu blockieren (Li et al., 1997; Yin et al., 1994a; Bissonnette et al., 1992).

**Bid** (*Bcl-2 interacting domain*) ist ein pro-apoptotisches Protein, welches Signaltransduktionswege mit der mitochondrialen Apoptose verknüpft. Die Bid-Aktivierung führt zur Cytochrom c-Freisetzung aus der Mitochondrienmembran und zur Caspase-vermittelten Apoptose (Thomas et al., 2000; Yamada et al., 1999).

**Noxa** ist ein direktes Zielprotein in der p53-vermittelten Apoptose (Wu und Deng, 2002).

**PUMA** (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) ist ebenfalls ein direktes Zielprotein der p53-vermittelten Apoptose in normalen sowie in Tumorzellen. Nach Induktion von PUMA kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c und zur Aktivierung von Procaspase 9 (Wu und Deng, 2002).

**Bax** (*Bcl-2-associated X protein*) ist das pro-apoptotische Homolog zu Bcl-2 und kann dessen Funktion antagonisieren (Yin et al., 1994b; Yin et al., 1994c). Die Überexpression von Bax in Melanomzellen könnte mit der p53-Überexpression assoziiert sein (Tang et al., 1998). Dennoch herrscht beim malignen Melanom vorwiegend eine Apoptoseresistenz vor. Dies läßt vermuten, daß Bax durch seine anti-apoptotischen Familienmitglieder Bcl-2, Mcl-1 und Bcl-X<sub>L</sub> außer Kraft gesetzt wird (Tang et al., 1998).

**Mcl-1** (*induced myeloid leukaemia cell differentiation protein*) und **Bcl-X<sub>L</sub>** (*long isoform*) sind anti-apoptotische Proteine und wirken durch Bildung von Heterodimeren mit Bax oder durch die Verminderung der c-Myc-vermittelten Apoptose (Reynolds et al., 1994). Bcl-X<sub>L</sub> hat noch stärkere anti-apoptotische Effekte als Bcl-2, da es zusätzlich Zellen vor der p53-vermittelten Apoptose schützen kann (Gottschalk et al., 1994; Ogretmen und Safa, 1996). Beide anti-apoptotischen Proteine sind beim malignen Melanom überexprimiert (Tang et al., 1998). Möglicherweise können sie sich durch die hochregulierte Bax- und herunterregulierte Bcl-2-Expression den apoptotischen Signalen widersetzen (Hussein et al., 2003).

Von **TNF** (*tumour necrosis factor*) existieren die zwei Isoformen **TNF- $\alpha$**  und **TNF- $\beta$** . Beide haben ähnliche Funktionen, TNF- $\alpha$  wird von Makrophagen, TNF- $\beta$  von T-Zellen sezerniert (Loetscher et al., 1991). Melanomzellen sind im Allgemeinen gegen TNF-vermittelte Apoptose resistent. Diese Resistenz kommt wahrscheinlich durch den anti-apoptotischen Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B zustande (Carrel et al., 1995; Griffith et al., 1998).

**TRAIL** (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ist ein neues und sehr effektives Mitglied der TNF-Familie. TRAIL kann in etwa zwei Dritteln der Melanomzellen Apoptose induzieren, selbst bei denen mit Resistenzen gegen andere TNF-Familienmitglieder wie etwa TNF- $\alpha$  (Griffith et al., 1998; Zhang et al., 1999). Darüberhinaus induziert TRAIL selektiv Apoptose in Tumorzellen und ist daher

möglicherweise ein vielversprechender Angriffspunkt in der Melanomtherapie (Thomas und Hersey, 1998).

**NF $\kappa$ B** (*nuclear factor  $\kappa$ B*) ist ein essentieller anti-apoptotischer Transkriptionsfaktor (Franco et al., 2001). In Melanomzellen führt die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch TRAIL zu einer anti-apoptotischen Antwort und korreliert so mit der Apoptoseresistenz von Melanomzellen. Andererseits führt die Inhibition von NF $\kappa$ B in resistenten Melanomzellen zu einer erhöhten Zytotoxizität durch TRAIL und TNF. Dies könnte ebenfalls bei der Melanomtherapie genutzt werden (Franco et al., 2001; Bakker et al., 1999).

**FasL** (*Fas ligand*) ist ein Membranprotein der TNF-Familie und an der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität beteiligt (Suda et al., 1993). Die Bindung von FasL an **Fas** (*fibroblast-associated*) induziert Apoptose über zwei Signalwege. Zum einen wird die Fas-vermittelte Apoptose durch Aktivierung der Caspase-Kaskade ausgelöst, zum anderen kommt es über Bid und Bax zur Freisetzung des pro-apoptotischen Cytochrom c (Raisova et al., 2000; Gross et al., 1999a). Sowohl Melanozyten als auch Melanomzellen sind resistent gegenüber der Fas-getriggerten Apoptose. Dies scheint ein Charakteristikum von Zellen melanozytären Ursprungs zu sein (Rivoltini et al., 1998).

Die Interferone **INF- $\alpha$** , **INF- $\beta$**  und **INF- $\gamma$**  sind Zytokine mit antiviraler und antiproliferativer Wirkung, die Tumorzellen für apoptotische Faktoren sensibilisieren (Mecchia et al., 2000; Chawla-Sarkar et al., 2001). Bei Melanomzellen führt INF- $\alpha$  dazu, daß p53 hoch- und Bcl-2 herunterreguliert und so die Apoptose gefördert wird (Mecchia et al., 2000). INF- $\beta$  hat eine noch stärkere apoptotische Wirkung als INF- $\alpha$ , möglicherweise durch eine höhere Induktion von TRAIL (Chawla-Sarkar et al., 2001). Durch INF- $\beta$  scheint Cytochrom c freigesetzt zu werden, welches mit Apaf-1 und Procaspase 9 Komplexe bildet und so die Caspase-Kaskade aktiviert, was letztlich zur Apoptose führt (Li et al., 1997; Chawla-Sarkar et al., 2001). INF- $\gamma$  aktiviert in Melanomzellen die Apoptose durch die Induktion der Stickstoffmonoxid-Produktion, durch Herunterregulieren von Bcl-2 und Förderung der Fas-vermittelten Apoptose (Xie et al., 1996; Rivoltini et al., 1998; Ugurel et al., 1999). So sind die Interferone trotz ihrer Toxizität ein Angriffspunkt für die Melanomtherapie.

Es läßt sich abschließend festhalten, daß die Apoptosefaktoren insbesondere durch ihren Beitrag zur Chemoresistenzentwicklung von Melanomzellen von zentraler Bedeutung sind. Neue Erkenntnisse über die Kontrollmöglichkeiten über diese Apoptosefaktoren werden dazu beitragen, diese Resistenzbarriere zu durchbrechen. Dies wird in Zukunft neue Therapiemöglichkeiten für das maligne Melanom eröffnen.

### 1.8 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Die Tumorsuppressorgene p15, p14 und p16 spielen vor allem beim familiären Melanom eine Rolle. Es wurden beim familiären Melanom Deletionen bestimmter Chromosomenbereiche gefunden, wie etwa auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p21-22) und Chromosom 1 (1p36; (Bale et al., 1989; Bale und Dracopoli, 1989). Desweiteren liegen auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 die Gene **p15** und **p16**. Diese sind bei am familiären Melanom erkrankten Patienten häufig inaktiv. Man findet bei 20 bis 40 % der Familien mit mindestens drei am malignen Melanom erkrankten Familienmitgliedern eine Keimbahnmutation im p16-Gen (CDKN2). Da jedoch 60 % der am familiären Melanom leidenden Familien keine p16-Mutation aufweisen, ist es wahrscheinlich, daß auf 9p21 noch weitere Tumorsuppressorgene vorhanden sind (Greene, 1999).

Das Tumorsuppressorgen p15, auch als CDKN2B bekannt, weist eine 93%-ige Sequenzhomologie zu p16 auf und ist als Inhibitor von CDK4 tätig. Eine gemeinsame Deletion von p15 und p16 in Tumorzelllinien ist häufig zu beobachten, die Deletion von p15 ohne p16 jedoch nie (Walker et al., 1998).

**P14ARF** (*alternative reading frame*) wird durch den p16-Lokus kodiert, das Protein hat jedoch durch differentielles Spleißen eine völlig andere Struktur und Funktion als das p16-Protein (Mao et al., 1995). Durch p14 kommt es zur Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 mit nachfolgender Erhöhung von MDM2 sowie p21. Dies resultiert wiederum in einem Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>- sowie in der G<sub>2</sub>-M-Phase (Stott et al., 1998).

**CDK4** (Zyclin-abhängige Kinase) ist auf Chromosom 12q14 lokalisiert und wird durch p16 inhibiert (Demetrick et al., 1994; Wang und Becker, 1996). Für das Melanom hat CDK4 eine eher geringfügige Bedeutung, da Mutationen nur bei 5 % der Melanompatienten gefunden werden. Die CDK4-Mutationen Arg24Cys sowie

Arg24His sind vorwiegend in Melanomzelllinien anzutreffen, zu einem kleinen Teil in Primärtumoren sowie in Metastasen (Wolfel et al., 1995; Tsao et al., 1998).

**MC1R** (*melanocortin-1 receptor*) ist an der Determinierung des Hauttypes beteiligt und Variationen von MC1R erhöhen das Risiko, am malignen Melanom zu erkranken (Valverde et al., 1995b; Palmer et al., 2000b; Kennedy et al., 2001b); s. Kap.1.2).

### 1.9 Transkriptionsfaktoren

Der Transkriptionsfaktor **MITF** (*basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein*) ist das Homolog des Microphthalmia-Gens der Maus. MITF ist pigmentspezifisch, wird sowohl in normalen Melanozyten als auch in allen Melanomstadien exprimiert und wirkt letztlich am Zellüberleben und der -pigmentierung mit (Goding, 2000; Nyormoi und Bar-Eli, 2003a).

Die Regulierung von MITF findet über zwei Signalkaskaden statt. Zum einen kommt es durch das Hormon  $\alpha$ -MSH zu erhöhten cAMP-Spiegeln, was zur Aktivierung des in Melanomzellen anti-apoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktors CREB führt (Jean et al., 1998c). Dies resultiert in der MITF-Transkriptionsaktivierung, die auch noch nach 24 Stunden nachweisbar ist (Bertolotto et al., 1998; Busca und Ballotti, 2000).

Zweitens kann eine Aktivierung von MITF über SCF/c-kit stattfinden. Dabei triggert die c-kit-Stimulation die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-vermittelte Phosphorylierung von MITF. Diese ist mit dem Andocken des Transkriptionsaktivators p300/CBP assoziiert und führt zur kurzzeitigen, etwa zwei Stunden anhaltenden MITF-Transkriptionsaktivierung (Hemesath et al., 1998; Sato et al., 1997; Wu und Hammer, III, 2000; Xu et al., 2000).

Durch die MITF-Aktivierung werden nachfolgend zum einen die für die Pigmentierung verantwortlichen Gene Tyr (*Tyrosinase*), TRP-1 und DCT, zum anderen das anti-apoptotische BCL-2-Gen hochreguliert (Nyormoi und Bar-Eli, 2003a).

Kritisch für das Überleben von gesunden Melanozyten als auch von Melanomzellen ist die *in vivo*-Interaktion von MITF mit BCL-2, deren Expression in diesen Zellen stark korreliert (McGill et al., 2002). Für die Melanozyten ist dieser Überlebensfaktor wichtig, um ihre Resistenz gegen die DNA-schädigende UV-Strahlung, der sie in der Epidermis ausgesetzt sind, zu steigern. Da die MITF- und



BCI-2-Expression auch bei Melanomzellen erhalten bleibt, könnte das die extreme Chemotherapieresistenz des malignen Melanoms mit erklären (Cerroni et al., 1995; Ramsay et al., 1995; Selzer et al., 1998). Die MITF-Blockade wäre somit ein denkbarer Therapieansatz beim malignen Melanom.

Der Transkriptionsfaktor **AP-2** ist ein DNA-bindendes Protein und reguliert als Tumorsuppressoren die Expression verschiedener Gene, die am Wachstum und der Proliferation des malignen Melanoms beteiligt sind, wie etwa c-kit, E-Cadherin, p21/WAF-1, MMP-2, IGFR-1, VEGF sowie PAR-1 (Bar-Eli, 2001). Die AP-2-Aktivität wiederum wird durch cAMP induziert (Buettner et al., 1993b; Luscher et al., 1989a).

AP-2 reguliert die Genexpression von Zellen, die von der Neuralleiste abstammen, zu denen auch Melanozyten gehören, sowie von Zellen der Epidermis (Mitchell et al., 1991; Imagawa et al., 1987; Williams et al., 1988). AP-2 fungiert wahrscheinlich je nach molekularem und zellulärem Kontext als Tumorpromoter oder Tumorsuppressor. So ist AP-2 bei einigen Mammakarzinomen und beim Medulloblastom wachstumsfördernd, während es beim Glioblastom, bei kolorektalen Karzinomen sowie bei einigen invasiven Mammakarzinomen tumorsuppressiv wirkt (Bosher et al., 1995; Gilbertson et al., 1997; Ropponen et al., 1999; Gee et al., 1999).

Beim malignen Melanom wirkt AP-2 vermutlich als Tumorsuppressor, denn der Verlust der AP-2-Expression steht mit der Progression des malignen Melanoms in Zusammenhang (Bar-Eli, 1997). Die Mehrzahl der metastatischen Melanome exprimiert AP-2 nicht mehr und Studien an Nacktmäusen ergaben, daß eine Überexpression von AP-2 in metastatischen Melanomzelllinien das Tumorwachstum und Metastasierungspotential zu hemmen vermag. Dies geschieht möglicherweise durch die Regulation von c-kit und MelCAM, denn die Transfektion des AP-2-Gens in metastatische, c-kit- sowie AP-2-negative und MelCAM-positive Zellen führte zu einer Herunterregulierung von MelCAM und zu einer Reexpression von c-kit (Bar-Eli, 2001). Desweiteren ist bekannt, daß eine verminderte AP-2-Expression in früheren Melanomstadien ebenfalls das Risiko der Metastasierung erhöht (Karjalainen et al., 1998).

Der Verlust von AP-2 führt weiterhin zu einer erhöhten **MMP-2**-Expression und – Aktivität (Gershenwald et al., 2001).

**MMPs** sind Metalloproteinasen, sie gehören zu den zinkabhängigen Endopeptidasen und sind zur Proteolyse der extrazellulären Matrix fähig (Curran und Murray, 1999). MMPs werden durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen sowie durch Hormone und Onkogene aktiviert, konstitutiv werden sie üblicherweise nicht in der Haut exprimiert (Birkedal-Hansen et al., 1993; Westermarck und Kahari, 1999).

Sie werden spezifisch von TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) inhibiert, mit denen sie im Gleichgewicht stehen (Kahari und Saarialho-Kere, 1997; Raza und Cornelius, 2000). Überwiegen die MMPs, kommt es zur Proteolyse der Basalmembran (Henriet et al., 1999). Die Expression von **MMP-2** korreliert mit dem Metastasierungspotential des Melanoms (Hofmann et al., 1999; Vaisanen et al., 1999; Vaisanen et al., 1998). MMP-2 erleichtert durch die proteolytischen Fähigkeiten die Migration von Tumor- und Endothelzellen in angrenzendes Gewebe (Karelina et al., 2000; Murphy et al., 1999). Durch die Proteolyse werden desweiteren VEGF und bFGF freigesetzt, was zu einer gesteigerten Angiogenese führt (Blood und Zetter, 1990).

Da MMP-2 mindestens eine Bindungsstelle für AP-2 aufweist, ist eine Regulierung des MMP-2-Gens durch AP-2 möglich. Dies würde erklären, daß ein AP-2-Expressionsverlust die Melanomprogression fördern könnte (Bar-Eli, 2001; Frisch und Morisaki, 1990; Qin et al., 1999; Somasundaram et al., 1996).

Darüberhinaus reguliert AP-2 durch nachgewiesene Bindungsstellen wahrscheinlich noch Gene des Zellzyklus, wie etwa HER-2 und p21/WAF-1 (Natali et al., 1994; Jiang et al., 1995; Vidal et al., 1995), der Apoptose, zu denen c-kit, Bcl-2 (van den Oord et al., 1994) und FAS/APO-1 gehören, der Zelladhäsion, wie MelCAM und E-Cadherin (Cowley and Smith, 1996) und der Tumorzellinvasion und Angiogenese, wie etwa MMP-2, PAI-1 (Descheemaeker et al., 1992), VEGF (Gille et al., 1997; Silins et al., 1997) und PAR-1 (Tellez and Bar-Eli, 2003). Dies würde nahelegen, daß AP-2 zu den Hauptregulatoren bei der Entstehung des malignen Melanoms gehört und, daß der Expressionsverlust des Transkriptionsfaktors zur malignen Transformation beiträgt (Bar-Eli, 2001).

## **1.10 Proto-Onkogen und Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit**

### **1.10.1 Struktur und Funktion von c-kit**

**c-kit** ist eine transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase aus der Familie der PDGF (*platelet-derived growth factor*)- und CSF-1 (*colony stimulating factor-1*)-Rezeptoren und ist beim malignen Melanom als Proto-Onkogen wirksam (Qiu et al., 1988; Yarden et al., 1987).

Die extrazelluläre Domäne von c-kit besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Regionen. Die ersten drei Regionen binden seinen Liganden SCF. Dies induziert eine Homodimerisierung des Rezeptors (Blechman et al., 1993b; Lev et al., 1993; Blechman et al., 1993a) und führt rasch zu einer erhöhten Autophosphorylierung des Rezeptors (Philo et al., 1996; Lev et al., 1992c; Lev et al., 1992b; Lev et al., 1992a; Lemmon et al., 1997; Blume-Jensen et al., 1991). Der c-kit-Rezeptor weist eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität auf (Majumder et al., 1988; Yarden et al., 1987).

Das c-kit-Protein wurde in diversen Zellen gefunden, wie etwa in Mastzellen und in Epithelzellen der Brustdrüse, der Speicheldrüse, der Schweißdrüsen sowie des Drüsengewebes der Speiseröhre. Disseminiert wurde das c-kit-Protein desweiteren im Interstitium von Testis und Ovarien gefunden, gruppiert in Teilen des zentralen Nervensystems wie Cerebellum, Hippocampus und Hinterhorn des Rückenmarks. Weiterhin wird der c-kit-Rezeptor in hämatopoetischen Stammzellen, in Mastzellen sowie in Keimzellen konstitutiv exprimiert (Galli et al., 1993a; Hamann et al., 1994; Strohmeyer et al., 1995).

In der Haut wurde c-kit in Melanozyten, vermehrt in denen der basalen Epidermis und der Haarfollikel, identifiziert (Lammie et al., 1994). Der c-kit-Rezeptor ist an der Proliferation, Adhäsion, Differenzierung, funktionellen Reifung sowie am Erhalt einer Vielzahl an differenzierten Zellen beteiligt (Alexander und Nicola, 1998; Kitamura et al., 1998; Ashman, 1999).

Im Hinblick auf Melanozyten spielt der c-kit-Rezeptor bei der Differenzierung und zu einem geringeren Teil bei der Proliferation embryonaler Melanoblasten eine zentrale Rolle (Mayer und Green, 1968; MINTZ und RUSSELL, 1957). Das murine *c-kit* wurde auf dem White spotting (*W*)-Locus lokalisiert (Nocka et al., 1989; Chabot et al., 1988a; Geissler et al., 1988a). Vergleichbar dazu wurden beim Menschen Mutationen des c-kit-Rezeptors bei Patienten mit Piebaldismus identifiziert, einer Erkrankung, die mit der lokalen Reduktion der Melanozytenzahl einhergeht (Fleishman, 1996; Giebel und Spritz, 1991a). Dies läßt ebenfalls vermuten, daß *c-kit* für die Melanozytenentwicklung essentiell ist.

Weiterhin führen Defekte von *c-kit* zu Fehlfunktionen wie etwa Mastozytose und assoziierten hämatologischen Fehlfunktionen, die von myelodysplastischen bis hin zu myeloproliferativen Erkrankungen reichen. Zusätzlich entwickeln diese Patienten verstärkt myeloische Leukämien. Eine *c-kit*-Expression wurde desweiteren bei soliden Tumoren wie beispielsweise bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen, gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), Keimzelltumoren, Mammakarzinomen, Neuroblastomen, Ewing-Sarkomen, einigen Weichteilsarkomen sowie in papillären/follikulären Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen (Tsuura et al., 1994b; Hines et al., 1995a; Kindblom et al., 1998; Huizinga et al., 1995; Miettinen et al., 2000; Ricotti et al., 1998; Landuzzi et al., 2000).

Im Zusammenhang mit dem malignen Melanom haben mehrere Studien gezeigt, daß die Progression des malignen Melanoms mit dem Verlust der *c-kit*-Proto-Onkogen-Expression einher geht. So ist bei der Mehrzahl an metastatischen Läsionen und Melanomzelllinien die Expression des *c-kit*-Rezeptors nicht nachweisbar (Lassam und Bickford, 1992; Natali et al., 1992; Zakut et al., 1993a). Der Expressionsverlust scheint aufzutreten, wenn die Zellen in die Dermis einwandern (Ohashi et al., 1996a). Umgekehrt führt bei Nacktmäusen die Transfektion des *c-kit*-Gens in metastatische Melanomzellen zur Inhibition des Tumorwachstums und des Metastasierungspotentials (Huang et al., 1996a).

### 1.10.2 Struktur und Funktion von SCF

Der Ligand für *c-kit* ist **SCF** (*stem cell factor*), auch **KL** (*kit ligand*) genannt (Zsebo et al., 1990). SCF wird von Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen produziert und reguliert die Entwicklung sowie funktionelle Prozesse bei hämatopoetischen Stammzellen und Mastzellen (Grabbe et al., 1994). Bei Melanoblasten reguliert SCF die Induktion der Proliferation, Differenzierung und den Erhalt der Zellen sowie die Integrin-Expression, die Migration und Melanin-Pigmentierung (Miura und Suda, 1992; Lahav et al., 1994; Scott et al., 1994; Luo et al., 1995; Sviderskaya et al., 1995; Costa et al., 1996). Nach subkutaner Injektion von SCF kommt es zu einer Zunahme der Anzahl an Melanozyten (Costa et al., 1996; Grichnik et al., 1995). SCF-Mutationen führen ebenso wie Mutationen im *W*-Locus zu Piebaldismus.

Von SCF existieren zwei Spleiß-Varianten: sSCF als lösliche Form und mSCF als Membran-gebundene Form (Grabbe et al., 1994; Longley et al., 1997; Majumdar et al., 1994). Beide Spleiß-Varianten wurden im Knochenmark, in neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut und in Mastzellen detektiert (Ramenghi et al., 1994; Welker et al., 1999). sSCF ist weiterhin an der Migration der Zellen von der Neuralleiste beteiligt, während mSCF in die Differenzierung von Melanozyten und deren Erhalt in der Haut involviert ist (Wehrle-Haller und Weston, 1995). Zwar ist die lösliche die biologisch aktive Form, doch hat sich bei Versuchen an Mäusen gezeigt, daß die Expression der löslichen Form alleine zu Fehlern in der Hämatopoese, Pigmentierung und Reproduktion führt.

### 1.10.3 Interaktionen zwischen c-kit und anderen Faktoren bei der Melanomprogression

In Zusammenhang mit der Melanomprogression ist zunächst die Interaktion von AP-2, c-kit, E-Cadherin und p21 erwähnenswert.

Ap-2 reguliert die Transkription von E-Cadherin (Cowley und Smith, 1996) und kontrolliert möglicherweise durch die Aktivierung von p21 den Zellzyklus und unterdrückt das Tumorstadium (Bar-Eli, 1999a). Es konnte gezeigt werden, daß die Tumordicke positiv mit der p21-Expression und negativ mit der Expression von AP-2, E-Cadherin und c-kit korreliert. Diese negative Korrelation zwischen AP-2 und p21 läßt vermuten, daß hohe p21-Spiegel dem malignen Melanom seine charakteristische Therapieresistenz verleihen könnten (Trotter et al., 1997; Sparrow et al., 1998; Bales et al., 1999). Im Einklang mit diesen Daten wurde gezeigt, daß der Verlust der E-Cadherin-Expression direkt mit der Tumorstadium korreliert.

Alle vier Proteine zeigen noch keine Expressionsunterschiede zwischen nicht-dysplastischen und dysplastischen Nävi. Dies läßt vermuten, daß sie erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Melanomprogression bedeutsam werden, möglicherweise am Übergang vom lokal invasiven Wachstum zur Metastasierung. Als weiterer Interaktionspartner von c-kit im Verlauf der Tumorstadium ist **MelCAM** von Bedeutung. Die Entwicklung des RGP-Melanoms zum VGP-Melanom wird mit dem Verlust des c-kit-Rezeptors einerseits und einer Überexpression des Adhäsionsmoleküls MelCAM andererseits in Zusammenhang gebracht. Über die Mechanismen hierfür ist bislang noch nichts bekannt. Es

scheint jedoch, daß der Überexpression von MelCAM in metastatischen Melanomzellen keine Amplifikation und kein Gen-Rearrangement zugrunde liegt (Luca et al., 1993).

Vielmehr entstand die Hypothese, daß die Genexpression von *c-kit* und MelCAM möglicherweise von AP-2 gesteuert wird, denn es besteht eine direkte Korrelation zwischen der AP-2- und der *c-kit*- und MelCAM-Expression in humanen Melanomzellen (Bar-Eli, 1997; Bar-Eli, 1999a; Bar-Eli, 2001). Desweiteren befinden sich funktionelle AP-2-Bindungsstellen innerhalb der MelCAM-Promotorregion, welche als weiterer Hinweis für die Regulation der MelCAM-Expression durch AP-2 gedeutet werden können (Jean et al., 1998b). Diese Ergebnisse legen nahe, daß die AP-2-Expression in metastatischen Melanomzellen zu einer Herunterregulierung des MelCAM-Genes führt (Bar-Eli, 2001). Ebenso kann der Verlust von *c-kit* die Expression von MelCAM in Melanomzellen beeinflussen (Karlen und Braathen, 1999). Zusätzlich wurde gezeigt, daß die MelCAM-Expression in Melanomzellen auch von der CREB-Transkriptionsfamilie reguliert wird (Karlen und Braathen, 1999; Xie et al., 1997b). Der Expressionsverlust von *c-kit* basiert nicht auf Deletionen, Re-Arrangements oder Mutationen des *c-kit*-Gens und -Promoter (Bar-Eli, 1999a; Huang et al., 1996a), sondern wird vermutlich auf Transkriptionsebene reguliert, denn es wurden AP-2-Bindungsstellen in der *c-kit*-Promotorregion gefunden (Yamamoto et al., 1993). Dies läßt vermuten, daß auch die *c-kit*-Expression von AP-2 reguliert wird. In der Tat findet in mehreren Geweben eine Ko-Expression von *c-kit* und AP-2 statt, wie in Zellen, die von der Neuralleiste abstammen, zu denen auch Melanozyten gehören, aber auch in Teilen des ZNS, der Niere und des Herzens. Von zentraler Bedeutung ist die Interaktion zwischen dem *c-kit*-Rezeptor und seinem Liganden SCF. Melanozyten exprimieren neben den beiden Spleiß-Varianten von SCF auch *c-kit*, so daß eine autokrine Regulierung möglich ist (Guo et al., 1997). In Melanomzellen verzögert die SCF-Expression das Tumorstadium und es entstehen weniger Lungenmetastasen (Huang et al., 1996a). Der Einfluß von SCF auf *c-kit*-positive Melanomzellen hingegen führt zur Triggerung der Apoptose. Dies ist bei Melanozyten nicht der Fall (Scott et al., 1994). Melanomzellen mit Metastasierungspotential verlieren ihre mSCF-Expression und sie exprimieren auch kein oder nur sehr geringe Mengen an *c-kit*. Bei Nacktmäusen konnte in Zellen, die weder *c-kit* noch mSCF exprimieren, die

Bildung von Metastasen induziert werden (Welker et al., 2000). Eine Erklärung hierfür wäre, daß der Verlust der c-kit-Rezeptor-Expression Melanomzellen ermöglichen könnte, der SCF/c-kit-vermittelten Apoptose zu entgehen und so letztendlich zum Tumorwachstum und zur Metastasierung beizutragen (Huang et al., 1996a). Über den Mechanismus des c-kit-Verlustes ist jedoch noch nichts bekannt.

Es gehen jedoch nicht alle Zellen, die SCF und c-kit exprimieren, in Apoptose. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, daß das Gleichgewicht zwischen Tumorwachstum und SCF-Produktion zugunsten des Tumorwachstums liegt und so die Menge an SCF nicht ausreicht, um eine vollständige Apoptose zu erreichen. Es wäre jedoch auch denkbar, daß trotz der c-kit-Expression ein intrinsischer Apoptose-Resistenz-Mechanismus existiert.

Durch die SCF-getriggerte Stimulation des c-kit-Rezeptors werden desweiteren diverse Signalwege aktiviert. Ein Zielgen eines SCF/c-kit-induzierten Signalweges ist der anti-apoptotische Faktor Bcl-2 (Gross et al., 1999b; Reed, 1998; Vander Heiden und Thompson, 1999). Bcl-2 wird über die MAPK-abhängige Phosphorylierung des pigmentspezifischen Transkriptionsfaktors MITF hochreguliert. Zwar findet die Interaktion zwischen MITF und Bcl-2 sowohl in gesunden Melanozyten als auch in Melanomzellen statt und trägt zum Überleben dieser Zellen bei (Cerroni et al., 1995; Hemesath et al., 1998; McGill et al., 2002), jedoch gibt es Hinweise, daß der Signaltransduktionsweg von SCF/c-kit über die MAP-Kinase-Kaskade nur bei Melanozyten stattfindet und bei Melanomzellen herunterreguliert ist (Funasaka et al., 1992). Eine Aktivierungsmöglichkeit von Bcl-2 über SCF/c-kit ist wahrscheinlich auch die CREB-vermittelte MITF-Expression (Pugazhenthii et al., 2000; Pugazhenthii et al., 1999). Durch die kurzzeitige Hochregulierung von MITF werden auch die Pigmentgene, wie etwa Tyrosinase, aktiviert (Wu und Hammer, III, 2000; Xu et al., 2000).

Ein weiterer Signaltransduktionsweg bindet und aktiviert die PI-3-Kinase, welche wiederum über die Kinasen PDK-1 und PDK-2 Akt aktiviert. Aktiviertes Akt phosphoryliert nachfolgend Bad und unterdrückt so dessen pro-apoptotische Funktion. Desweiteren wird das anti-apoptotisch wirkende Bcl-X<sub>L</sub> freigesetzt. Bcl-X<sub>L</sub> bildet nun Heterodimere mit dem pro-apoptotisch wirkenden Bax und setzt die apoptotische Funktion von Bax auf diese Weise außer Kraft. So resultiert die Aktivierung der PI-3-Kinase-Kaskade letztlich im Überleben von Zellen (Blume-

Jensen et al., 1998). Es scheint allerdings, daß dieser Signaltransduktionsweg hauptsächlich in der Keimzellentwicklung eine Rolle spielt und die Melanozytenentwicklung von diesem Signalweg unabhängig ist (Blume-Jensen et al., 2000).

Im Zusammenhang mit der möglichen anti-apoptotischen Funktion von c-kit ist noch erwähnenswert, daß c-kit die p53-induzierte Apoptose verhindern kann (Lee, 1998).

Die paradoxe Tatsache, daß SCF und c-kit einerseits am Erhalt, andererseits an der Apoptose von Zellen mitwirken, könnte sich dadurch erklären, daß unterschiedliche, bislang noch unentdeckte Signalwege, die wiederum von verschiedenen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen sowie von anderen Onkogenen abhängen, aktiviert werden und die SCF/c-kit-Signalwege auf noch ungeklärte Weise beeinflussen und modulieren.



### 1.11 Zielsetzungen der Arbeit

Der c-kit-Rezeptor spielt einerseits eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung einer ganzen Reihe von gesunden Zellen und ist an Signalkaskaden beteiligt, die zum Zellüberleben beitragen, andererseits ist er aber auch bei diversen Tumoren als Protoonkogen bekannt und reguliert Signaltransduktionswege, die in der Apoptose von gesunden als auch möglicherweise von malignen Zellen münden.

Auch über seine Rolle bei der Entstehung sowie bei der Progression des malignen Melanoms liegen bislang noch ungenügende Daten vor und so zeigt sich letztlich ein recht uneinheitliches Bild über seine Funktion.

Es wurde gezeigt, daß es während der Melanomprogression zu einem c-kit-Expressionsverlust kommt. Die bisherigen Daten lassen vermuten, daß dieser Expressionsverlust zwischen dem radialen und vertikalen Wachstumsstadium stattfindet. Jedoch zeigen die Daten auch, daß c-kit zum Teil noch in Melanomzellen exprimiert wird und in Anwesenheit seines Liganden SCF zur Apoptose in den Tumorzellen führen kann. Andererseits wirkt SCF mit seinem Rezeptor über den PI-3-Kinase-Weg und über die MITF-Aktivierung auch am Zellüberleben mit, wobei noch nicht eindeutig geklärt ist, ob die anti-apoptotische Funktion nur für gesunde Melanozyten oder auch für Melanomzellen zutrifft.

Bisherige Arbeiten haben sich ihren Schwerpunkt größtenteils auf spezifische Funktionen von c-kit gelegt oder nur eine kleinere Anzahl an Tumorzellen untersucht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein umfangreiches Expressionsprofil von c-kit zu erstellen. Dies sollte zum einen durch die Untersuchung einer Vielfalt an Zelllinien, von Melanozyten über Nävi, RGP- und VGP-Melanomen bis hin zu Metastasen sowie einer Reihe von anderen Tumorzelllinien, stattfinden, zum anderen durch die Expressionsuntersuchung der verschiedenen Zelllinien auf jeweils verschiedenen Stufen der Rezeptorexpression, das heißt auf RNA-, DNA- sowie auf Proteinebene und letztlich auch in Nativgeweben sowie in intakten Zellen aus der Zellkultur. Vor dem Hintergrund der bislang verfügbaren Daten sollte im Rahmen dieser Zellinienvielfalt dargestellt werden, ob und an welcher Stelle der Melanomprogression die Expression von c-kit verloren geht und ob dies mit der Melanomprogression assoziiert werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), und Roth (Karlsruhe) bezogen. Enzyme und Feinchemikalien wurden von Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biolabs (Schwalbach), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Promega (Heidelberg), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen.

#### 2.1.1 Reagenzien, Puffer und Lösungen

##### Agarosegel-Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau  
0,25% Xylencyanol  
30% Glycerin

##### Äquilibrierungspuffer (pH 9,5)

0,75 M Tris-HCl  
0,1 M NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

##### Blockierungspuffer

Blocking reagent ROCHE  
in Maleinsäurepuffer, Endkonzentration 10%(w/v)

##### Präinkubationspuffer für Immunhistologie

für 20 ml: 20 ml 1xPBS  
1 ml Horse Normal Serum (Yellow aus vectastain-kit)  
100 µl Triton X  
0,2 g BSA

**DEPC-H<sub>2</sub>O** 0,1 % Diethylpyrocarbonat (Sigma, München) in  
1000 ml dest. H<sub>2</sub>O mit anschließendem Autoklavieren

**Ethidiumbromid**

500 ml 1 x TBE  
50 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

**10 x Ladepuffer**

50 % (v/v) Glycerol  
0,1 M EDTA  
0,25% (v/v) Xylencyanol  
0,25% (v/v) Bromphenolblau

**2 x Laemmli-Puffer**

10 ml 1M Tris pH 6,8  
4 g SDS  
0,05 g Bromphenolblau  
10 ml β-Mercaptoethanol  
10 ml Glycerin  
auf 100 ml bidest. Wasser

**1 x Laufpuffer**

24,8 mM Tris Base  
191,8 mM Glycin  
3,5 mM SDS

**Lysepuffer für Proteinextraktion**

0.5% (v/v) Triton X-100  
5 mM EDTA  
0.1 µM PMSF  
Proteaseinhibitoren (10 µM Pepstatin A, 10 µM Leupeptin,  
10 µM Aprotinin)

**Maleinsäurepuffer**

100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl pH 7,5

**10 X PBS**      1,3 M NaCl  
                   70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                   30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                   pH 7,4

**20 x SSC**      3 M NaCl  
                   0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 7,0  
                   H<sub>2</sub>O ad 1000ml

**10x Taq-Puffer (pH 9) enthält:**

500 mM      KCl  
 15 mM        MgCl<sub>2</sub>  
 100 mM      TRIS-HCl

**10 x TBE**      0,9 M      Tris  
                   0,9 M      Borsäure  
                   25 mM     EDTA

**TE-Puffer**     10 mM TRIS-HCl pH 8,0  
                   1 mM EDTA

**1.5 M Tris-Base (pH 8,8)**

**Lösungen und Medien für Zellkultur:**

**RPMI** Biochrom

**RPMI (komplett) enthält pro 500 ml:**

	RPMI	
10%(v/v)	FCS	Biochrom
100 U	Penicillin	Invitrogen
0,1%(w/v)	Streptomycin	Invitrogen
2 mM	L-Glutamin	Invitrogen

<b>T 2%</b>	250 ml enthalten:		
	50 ml	L 15	Biochrom
	5 ml	FCS	Invitrogen
	250 µl	Insulin	Sigma
	250 µl	Gentamicin	
<b>Stopp-Lösung:</b>	200 ml	L 15	Biochrom
	20 ml	FCS	Invitrogen
<b>Melanozytenfertigmedium</b>			Promocell
<b>L 15</b>			Biochrom
<b>McCoy</b>			Biochrom
<b>McCoy (komplett)</b>	enthält pro 500 ml:		
		McCoy	Biochrom
	10%(v/v)	FCS	Biochrom
	100 U	Penicillin	Invitrogen
	0,1%(w/v)	Streptomycin	Invitrogen
	2 mM	L-Glutamin	Invitrogen
<b>Trypsin</b>			Biochrom
<b>HBSS</b>			Invitrogen
<b>Trypsin in PBS:</b>		PBS	Biochrom
	0,02 %	Trypsin	
<b>Einfriermedium</b>	70 % (v/v)	RPMI	Biochrom
	20 % (v/v)	FCS	Biochrom
	10 % (v/v)	DMSO	Sigma

### 2.1.2 Verwendete molekularbiologische Kits

<b>QIAquick Gel Extraction Kit</b>	Qiagen
<b>QIAquick PCR Purification kit</b>	QIAGEN
<b>Vectastain® ABC Mouse IgG Kit</b>	Vector

## 2.1.3 Primer

<b>Hexamerprimer</b> (0,2 µg/ µl)	pd(N)6	Amersham
prozentuale Zusammensetzung:	dA=22,2%	Pharmacia
	dC=24,5%	
	dG=23,6%	
	dT=29,7%	

## GAPDH-Primer (Invitrogen)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
1	GAC AAC AGC CTC AAG CTC ATC
2	GAC GGC AGG TCA GGT CCA CCA
3	AAT CGG TCC TGC ACC ACC (nested)
4	ATG CCA GTG AGC TTC CCG (nested)

## c-kit-PCR-Primer (Life Technologies™ Invitrogen), fett gedruckt: Kpn I-Schnittstelle

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Richtung	Position
<b>A</b>	<b>GGTACCGCTACCGCGATGAGAGG</b>	forward	13 - 29
<b>B</b>	ATAGGATGGTGGCTGATGAC	reverse	3112-3131
<b>C</b>	CATCGCAGCTACCG	forward	6 - 19
<b>D</b>	ATCGCAGCTACCGCGATGA	forward	7 - 25
<b>E</b>	<b>GGTACCCATCGCAGCTACCGCGATGA</b>	forward	6 - 25
<b>F</b>	GTGAATCTACTTGGAGCCTGCA	forward	1981-2002
<b>G</b>	GCAACAATATTCTGTAATGACCAG	reverse	2043-2019
<b>H</b>	GTGTGCTCAGAAAGACAGGATTGC	reverse	3092-3068
<b>I</b>	TGCAATAGGATGGTGGCTGA	reverse	3135-3115

## 2.1.4 PCR-Reagenzien

Klentaq-Kit		Qiagen-Kit	
HPLC-H <sub>2</sub> O	36,5 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O	27 µl
Klentaq-Puffer	5 µl	10x Qiagen-Puffer	5 µl
dNTP-Lösung 20 mM	1 µl	dNTP-Lösung 20 mM	0,5 µl
Klentaq- Polymerase	0,5 µl	Q-Solution	10 µl
cDNA	5 µl	Qiagen-Taq-Polymerase	0,5 µl
Primer	2 µl	cDNA	5 µl
		Primer	2 µl

## 2.1.5 Antikörper

## Primärantikörper

Bezeichnung	Art	Bindungs- region	Firma
c-kit (C-14):sc-1493	pAK Ziege gegen humanes c-kit IgG <sub>1</sub>	C-Terminus	Santa Cruz
c-kit (C-19):sc-168	pAK Kaninchen gegen humanes c-kit IgG <sub>1</sub>	C-Terminus	Santa Cruz
c-kit (sc-13508)	mAK Maus gegen humanes c-kit IgG <sub>1</sub>	Volle-Länge- Klon	Santa Cruz
c-kit(sc-13507)- FITC	mAK Maus gegen humanes c-kit IgG <sub>1</sub>	Volle-Länge- Klon	Santa Cruz
β-actin (I-19): sc-1616	pAK Ziege gegen humanes c-kit IgG <sub>1</sub>	C-Terminus	Santa Cruz

## Sekundärantikörper

Bezeichnung	Art	Firma
E0433	biotinylierter AK Ziege gegen Maus- Immunglobuline	DAKO
E0466	biotinylierter AK Kaninchen gegen Ziegen- Immunglobuline	DAKO

### 2.1.6 Biologische Materialien: Zelllinien

Tab.1: Zelllinien

Zelllinie	Tumor/ Gewebeart	Referenz
FM	Melanozyten	Meier et al., 2003
FK 374	Keratinocyten	Meier et al., 2003
WM 35	RGP Melanom	Meier et al., 2000
WM 3211	RGP Melanom	Meier et al., 2000
WM 1551	RGP Melanom	Meier et al., 2000
WM 1552	RGP Melanom	Meier et al., 2000
SBCI 2	RGP Melanom	Meier et al., 2000
IGR 39	RGP Melanom	Aubert et al., 1980
WM 115	VGP Melanom	Meier et al., 2000
WM 793	VGP Melanom	Meier et al., 2000
WM 451-LU	hochaggressives Melanom	Meier et al., 2000
WM 1205-LU	hochaggressives Melanom	Meier et al., 2000
SK-Mel 13	metastatisches Melanom	Carey et al., 1976
SK-Mel 19	metastatisches Melanom	Carey et al., 1976
SK-Mel 28	metastatisches Melanom	Carey et al., 1976
G 361	metastatisches Melanom	Reeds et al., 1978
WM 852	metastatisches Melanom	Meier et al, 2000
M 5	metastatisches Melanom	Levy et al, 1983
MeWo	metastatisches Melanom	Carey et al., 1976
HL 60	Pleuramesotheliom	Collins et al, 1977
CH3LC	Lungenkarzinom	DKFZ Heidelberg
Colo 205	Kolonkarzinom, Metastase	Semple et al., 1978
MCF 7	Mammakarzinom	Sugarman et al., 1985
HT 29	Kolonkarzinom	Didier et al., 1996
SW 480	Kolonkarzinom	Fogh et al., 1977
T24	Blasenkarzinom	O'Toole et al., 1972
WM 1491-1	Nävuszellen	Meier et al, 2000
NZ 680	Nävuszellen	
Y 79	Retinoblastom	

### 2.1.7 Geräte

Schüttler HS 260 basic (Firma IKA)

Vortex-Genie-2 (Scientific Industries)

Magnetrührer: RCT basic (IKA), Magnetic stirrer HI200M (Hanna Industries)

pH-Meter 761 Calimatic (Knick)

Heizblock: DRI-Block DB-2D (Techne)

Waage (Sartorius)

Electrophoresis Power Supply: EPS 200 und 3500 (Pharmacia Biotech)

Gelkammern: Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD, Hercules, Ca,USA), AGS



Zentrifugen: Biofuge pico, fresco, 13; Megafuge 1.0 R; Varifuge 3.OR (alle Heraeus)

Akku-Pipettus (Hirschmann)

Pipetten (Gilson, Eppendorf)

Mikrowelle (Bosch)

Brutschränke (Heraeus)

Template Tamer (Oncor Appligene)

Folienschweißgerät (Futura)

Photometer Spectronic (Genesys 5)

PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research)

UV Stratalinker 1800 (Stratagene)

Mikroskop CK 40 (Olympus)

Saugpipette (Inotech)

Schneidemaschine `800 Frigocut E´ (Reichert-Jung)

### **2.1.8 Sonstige Materialien**

Fotoentwickler Kodak GBX Developer und Fixierer (Sigma)

Scientific imaging film x-OMAT (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA)

Filmentwicklungskassette (Dr.Goos-Suprema)

PVDF Western Blotting Membranes (Roche, Mannheim, Deutschland)

Nylon Membranes, positively charged (Boehringer Mannheim, Deutschland)

Neubauer Zählkammer

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Zellkulturbedingungen**

In der vorliegenden Arbeit wurden in der Zellkultur und anschließenden FACS-Analyse diverse Melanom- und Tumorzelllinien sowie Melanozyten und Nävuszellen verwendet (s.Tab.2), wobei ausschließlich adhärent wachsende Zellen verwendet wurden. Alle verwendeten Medien sind unter 2.1.1 aufgeführt.

Die Zellen wurden in unbeschichteten T 75-Kulturflaschen in 15 ml Nährmedium bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und 35 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zelllinien und ihre zugehörigen Medien sind in Tab.2 aufgelistet.

**Tab.2: Zelllinien und -medien**

Zelllinie	Zellmedium	Stopp-Lösung
Melanozyten	M-199 komplett	L15 + 10% FCS
NZ 680	M-199 komplett	L15 + 10% FCS
SBCL2	T 2%	L15 + 10% FCS
WM 35	T 2%	L15 + 10% FCS
WM 1552	T 2%	L15 + 10% FCS
WM 793	T 2%	L15 + 10% FCS
WM 1205	T 2%	L15 + 10% FCS
WM 852	T 2%	L15 + 10% FCS
SK 28	RPMI 1640 komplett	RPMI 1640 komplett
Mewo	RPMI 1640 komplett	RPMI 1640 komplett
G 361	McCoy komplett	McCoy
T 24	RPMI 1640 komplett	RPMI 1640 komplett
CH3LC	RPMI 1640 komplett	RPMI 1640 komplett
Colo 205	RPMI 1640 komplett	RPMI 1640 komplett
MCF 7	RPMI 1640 komplett	RPMI 1640 komplett

Jeden zweiten Tag wurde das Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Das Medium wurde mit einer Vakuumpipette an der den Zellen gegenüberliegenden Seite der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 15 ml frischem Medium versorgt, bevor die Zellen wieder im Brutschrank bei 37°C kultiviert wurden. Ab einer Konfluenz von ca. 80 % müssen die Zellen gesplittet werden. Dazu mußten die Zellen zunächst vom Boden der Flasche abgelöst, also abtrypsiniert werden. Alle mit FCS-haltigen Medien gefütterten Zellen wurden zuvor in HBSS gewaschen. Dadurch wurde das FCS ausgewaschen, welches das Trypsin ansonsten blockieren würde. Der Überstand wurde abgesaugt und 4 ml Trypsin in PBS zu den Zellen gegeben. Man inkubiert die Kulturflaschen für 3 bis 5 min im Brutschrank, da bei 37°C das Temperaturoptimum für Trypsin herrscht. Der Kontakt der Zellen mit Trypsin sollte jedoch 10 min nicht überschreiten, da das Trypsin sonst die Zellmembran zerstört. Wenn unter dem Mikroskop sichtbar war, daß sich ca. 90 % der Zellen gelöst hatten, erkennbar daran, daß die Zellen kugelig erscheinen, wurden 8 ml der jeweils geeigneten Stopp-Lösung auf die Zellen gegeben, um den Vorgang zu beenden. Dafür ist das in den Stopp-Lösungen enthaltene FCS verantwortlich. Die gesamte Lösung wurde in ein 15 ml-

Falcon-Reaktionsgefäß pipettiert und 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet konnte nun in Nährmedium suspendiert und auf mehrere, in der Regel zwei oder vier, Kulturflaschen verteilt werden.

### **2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Das Auftauen von Zellen erforderte ein zügiges, aber dennoch umsichtiges Arbeiten, da das Einfriermedium (s.2.1.1) DMSO enthält. DMSO bietet einerseits einen Gefrierschutz für die Zellen, hat aber in flüssigem Zustand zelltoxische Wirkung. 7 ml des jeweiligen Nährmediums wurden in einem Falcon-Tube vorgelegt. Die im Wasserbad angetauten Zellen wurden tröpfchenweise in das Medium gegeben. Anschließend wurde 3 min bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in ihrem entsprechenden Nährmedium suspendiert in eine T 75-Kulturflasche mit 15 ml Medium gegeben. Nach ca. 10 h, wenn die Zellen am Boden der Kulturflasche angewachsen waren, wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Dadurch wurde das restliche DMSO aus der Lösung entfernt.

Das Einfrieren der Zellen verlief wie folgt: Nach dem Abtrypsinieren wurden die Zellen in 1 ml speziellem Einfriermedium zügig aufgenommen und in ein Kryoröhrchen gegeben. Das Kryoröhrchen wurde für ein paar Tage bei -80°C in „Mister Frosty“ gelagert. Dies ist eine in Isopropanol schwimmende Box, die ein langsames, gleichmäßiges und Wasserkristall-freies und damit zellschonendes Einfrieren ermöglicht. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff konserviert.

### **2.2.1.3 FACS-Analyse**

Die FACS-Analyse, auch Durchflußzytometrie genannt, ist eine Methode, Zellpopulationen zu charakterisieren und zu identifizieren. Diese Identifizierung wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Fluoreszenz-markierten monoklonalen c-kit-Antikörper sc-13507-FITC (Santa Cruz) durchgeführt, der an Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat (FITC) gekoppelt ist.

Der FITC-Kanal des Durchflußzytometers wird durch Licht der Wellenlänge zwischen 450 und 500 nm, also blaues Licht, angeregt und strahlt ein energieärmeres, gelb-grünes Licht der Wellenlänge 500 bis 550 nm aus. In der

Durchflußzytometrie passieren die Zellen einzeln nacheinander einen Laserstrahl. Dieser mißt die Fluoreszenz jeder dieser Zellen. Die Fluoreszenzintensität läßt Rückschlüsse über die Menge an Antigen, hier der Oberflächenrezeptor c-kit, zu. Vor der Messung im Durchflußzytometer mußten die Zellen zunächst mit dem Fluoreszenz-markierten c-kit-Antikörper sc-13507-FITC inkubiert werden. Der Ablauf war wie folgt:

Pro Zelllinie wurden für die Färbung  $10^6$  Zellen eingesetzt, deren Anzahl pro ml zuvor mit der Neubauer Zählkammer bestimmt wurde. Die Zellen wurden anschließend in PBS / 1% BSA gewaschen und für 4 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Färbung mit dem c-kit-Antikörper war eine Oberflächenfärbung. Das heißt, daß die Zellen ohne weitere Vorbehandlung mit dem Antikörper inkubiert werden konnten. Es wurde eine 1:20-Verdünnung des sc-13507-FITC-Antikörpers in PBS / 1% BSA und eine Inkubationszeit von 30 min gewählt. Da der Antikörper lichtempfindlich ist, fand die Inkubation unter Lichtausschluß statt. Nach der Färbung mit dem Antikörper wurden die Zellen nochmals in PBS + 1% BSA gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte die Fluoreszenzmessung.

## **2.2.2 Proteinchemische Methoden**

### **2.2.2.1 Proteinextraktion aus Zelllinien**

Die Zellpellets der verschiedenen Zelllinien wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Von diesen wurde eine Proteinextraktion durchgeführt.

Zu 30ml PBS wurden 0,5% Triton X, 5mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 10  $\mu\text{M}$  Pepstatin, 10  $\mu\text{M}$  Leupeptin und 25  $\mu\text{g}$  / ml Aprotinin pipettiert, gemixt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Die Zellpellets wurden nun in jeweils 1,2 ml der Lösung suspendiert, 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einen Roller gelegt und anschließend 20 min bei 12000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und in vorbereitete Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben.

Die Zellysate sind in dieser Form bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mehrere Monate haltbar.

### 2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay

Mit dem BIO-RAD Protein Assay nach Bradford wird die Proteinkonzentration der einzelnen Zellysate bestimmt. Erst die Kenntnis der Konzentration ermöglicht es, im Rahmen des Western Blottings die gewünschte definierte Gesamtproteinmenge auf das Polyacrylamidgel aufzutragen. Somit sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Zelllinien miteinander vergleichbar.

Die Grundlage für die Messung der Proteinkonzentration bildet das Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD). Es enthält den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250. Dieser hat nach Komplexbildung mit Proteinen ein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Das Absorptionsmaximum des ungebundenen Farbstoffes hingegen liegt bei 465 nm.

Aus einem Gemisch aus jeweils 10 µl Zellysat oder BSA (Roth), 800 µl PBS und 200 µl Protein-Standard-Lösung (BIO-RAD) wurde durch Zugabe verschiedener definierter Konzentrationen von BSA eine Verdünnungsreihe hergestellt, deren Messung die Eichgerade ergibt. Anhand dieser Eichgerade ist es möglich, über die optische Dichte der Zellysate ihre Konzentration auszurechnen und somit die eingesetzte Gesamtproteinmengen der verschiedenen Zelllinien im Western Blot anzugleichen.

### 2.2.2.3 Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

Zunächst wurde zu jeder Proteinprobe die Hälfte an Volumen 2x Lämmli-Puffer (s.2.1.1) gegeben. Der Lämmli-Puffer enthält zwei Stoffe, die für die Denaturierung der Proteine verantwortlich sind: SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol. SDS ist ein anionisches Detergens, welches nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstören soll und durch Bindung an die Proteine (1,4g SDS / g Protein) dafür sorgt, daß Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden.  $\beta$ -Mercaptoethanol wird hinzugegeben, um Disulfidbrücken zu reduzieren.

Die Proben wurden nun noch 3 min bei 100°C zur Unterstützung der Denaturierung und der SDS-Bindung an das Protein erhitzt und dann auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

### 2.2.2.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese dient der Fraktionierung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Eine für zwei 10%ige Polyacrylamidgele ausreichende Menge an Gel wurde wie folgt hergestellt: 3,9 ml 38%iges Acrylamid / 2% Bisacrylamid, 3,75 ml 1,5M TRIS Base pH 8,8, 150 µl 10%-SDS und 7,2 ml autoklaviertes Millipore wurden gemischt. Direkt vor dem Gießen der Gele wurden 150 µl APS und 15 µl TEMED dazu pipettiert. Dies bewirkt die Polymerisation des Gels. Pro Gel wurden jeweils zwei durch einen Spacer getrennte Glasplatten senkrecht in die von BIORAD mitgelieferte Vorrichtung gestellt. Nun wurde die Gellösung luftblasenfrei mit Hilfe eines Pipettus zwischen die Glasplatten gegossen und am oberen Ende ein Kamm eingeschoben. Nach ca. 15 min waren die Gele vollständig polymerisiert. Sie wurden nun in die Elektrophoresekammer gespannt, mit 1x Laufpuffer (s.2.1.1) gefüllt und das Gel mit jeweils 30 µg Zellysat pro Zelllinie beladen.

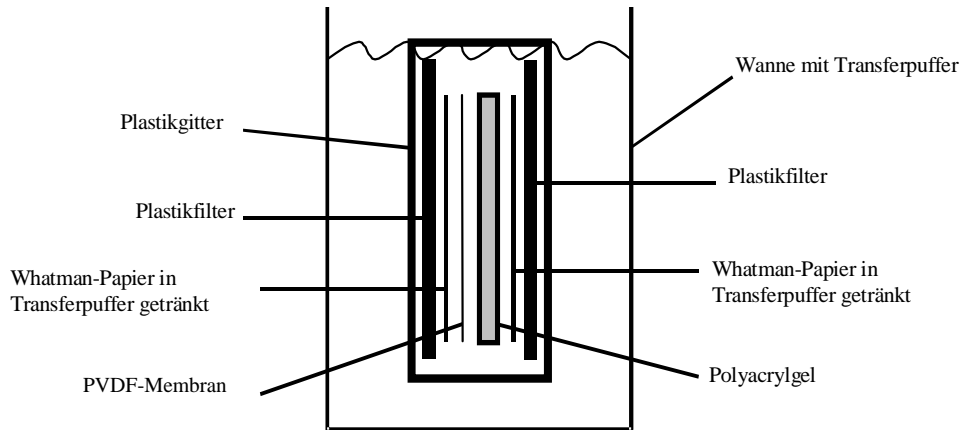
Der Rainbow Marker RPN 800 mit einem Molekulargewicht von 10000 bis 250000 (Amersham LIFE SCIENCE) wurde zur Größenorientierung auf jedes Gel aufgetragen. Zur Probenauffrennung folgte zunächst ein Vorlauf mit 3 min bei 220 V, 150 mA und 100 W, danach wurde die Spannung für 1 h 15 min auf 150 V reduziert. Dabei wandern die Proteine in Richtung der Anode, da die Proteine durch das an sie gebundene SDS, einem diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem, negativ geladen sind.

Die in der vorliegenden Arbeit zu detektierenden Proteingrößen waren 145kDa für das c-kit-Protein und 45 kDa für  $\beta$ -Actin.  $\beta$ -Actin ist ein Haushaltsgen und dient als Beladungskontrolle.

#### **2.2.2.5 Western Blotting**

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Roche) wie folgt transferiert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min in Transferpuffer gelegt. Die für den Blot benötigten Whatmanpapiere und Membranen wurden zum Befeuchten vor der Behandlung mit Transferpuffer (s.2.1.1) noch kurz in 100% Methanol getaucht und danach zwei Mal mit autoklaviertem Millipore-Wasser gewaschen. Der Blot wurde wie in Abb.2 dargestellt aufgebaut.

Der Proteintransfer erfolgte 3 h bei 100 V und 400 mA.



**Abb.2: Aufbau des Naß-Western Blots zum Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran**

### 2.2.2.6 Detektion

Nach dem Blotten wurden die Proteine mittels einer Antikörperreaktion detektiert, wobei alle Wasch- und Inkubationsschritte auf dem Schüttler erfolgten. Die Membranen wurden kurz in 1xPBS gewaschen. Die Membran wurde nun in 1xPBS / 0,1% Tween 20 / 10% Milchpulver für 3 h bei RT blockiert. Dadurch lassen sich unspezifische Bindungen an den freien Stellen der Membran minimieren. Dann wurden die Membranen in der jeweiligen Antikörperlösung inkubiert.

Für die Detektion des c-kit-Proteins wurden die drei verschiedenen oben genannten c-kit-Antikörper in Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:500 in 10 ml 1x PBS / 0,1% Tween 20 / 10% Milchpulver getestet, wobei die Behandlung mit dem c-kit-Antikörper sc-13508 in einer 1:66,6-Verdünnung zum Ergebnis geführt hat. Zur Detektion des  $\beta$ -Actin-Proteins wurde der  $\beta$ -Actin-Antikörper I-19 als 1:100-Verdünnung ebenfalls in 10 ml 1xPBS / 0,1% Tween 20 / 10% Milchpulver verwendet.

Es folgte die Inkubation bei 4°C über Nacht. Danach wurden die Membranen 3x 10 min in 1xPBS gewaschen und für 1,5 h bei RT in der zugehörigen Zweitantikörperlösung inkubiert.

Für die Antikörper C-14 (Santa Cruz) sowie C-19 (Santa Cruz) wurde der Zweitantikörper E 0466 (DAKO), für den Antikörper sc-13508 (Santa Cruz) der Zweitantikörper E0433 (DAKO) in Verdünnungen zwischen 1:1000 und 1:1500 in 1xPBS / 0,1% Tween 20 / 10% Milchpulver getestet. Für den  $\beta$ -Actin-Antikörper I-19 wurde der E0466-Zweitantikörper als 1:1500-Verdünnung in derselben Lösung

eingesetzt. Die Membranen wurden wieder 3x 10 min in 1xPBS gewaschen und anschließend mit 1:100-verdünntem Streptavidin-AP (DAKO) in 1xPBS / 0,1 % Tween 20 / 10% Milchpulver für 1,5 h bei RT inkubiert.

Erneut wurden nun die Membranen 3x 10 min in 1xPBS gewaschen und kurz in Äquilibriumspuffer geschwenkt. Die Membranen wurden einzeln mit jeweils 7 ml Äquilibriumspuffer mit CDP-Star®(Roche) 1:100 verdünnt in einen Plastikbeutel eingeschweißt. CDP-Star®(Roche) wird durch die alkalische Phosphatase im Streptavidin-AP (DAKO) dephosphoryliert. Es bildet sich ein meta-stabiles Dioxetan-Phenolat-Anion, welches in gepufferter Lösung zerfällt und Licht der Wellenlänge 466nm emittiert. Diese Lichtemission kann in der Dunkelkammer durch Auflegen eines Filmes (Kodak) und dessen Entwicklung in Form von dunklen Banden nachgewiesen werden. Die Auflegezeit konnte zwischen wenigen Sekunden und ca. 5 min variieren und mußte bei jeder Entwicklung individuell neu bestimmt werden. Im Anschluß wurden die Filme noch in 1:5- verdünntem Entwickler (Sigma) geschwärzt, bis sich die Signale detektieren ließen und abschließend ca. 30 sec in 1:5-verdünntem Fixierer (Sigma) in eine haltbare Form gebracht.

## **2.2.3 Histologische Methoden**

### **2.2.3.1 Immunhistologie**

Die Immunhistologie an Paraffin- bzw. Kryostatschnitten wurde angewendet, um die c-kit-Rezeptor-Expression durch Antikörperfärbung direkt in Nativgewebe nachzuweisen. Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung ist die Behandlung von Gewebeschnitten mit Antikörper und Zweitantikörper und anschließender Färbung, um den Komplex sichtbar zu machen. Die Vorgehensweise ist nachfolgend beschrieben.

#### **2.2.3.1.1 Herstellung von Paraffinschnitten**

Paraffinschnitte wurden aus in Paraffin eingebettetem Gewebe hergestellt. Dazu wurde zunächst das gewünschte Gewebeteil in 4%igem Formalin fixiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung in einer absteigenden Konzentrationsreihe Ethanol. Dieser Arbeitsvorgang war automatisiert. Nach dem Ethanol folgte noch ein Waschschrift mit Xylol und zum Schluß mit Paraffin. Anschließend wurde es in Paraffin gegossen, so daß ein Block entstand. Vor dem



Schneiden mußte der Block bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Zum Anfertigen der Schnitte wurde der Paraffinblock mit dem eingebetteten Gewebe in das Mikrotom Modell 2040 von Reichert-Jung eingespannt. Es wurde eine Serie von Schnitten der Dicke  $3\mu\text{m}$  hergestellt, zur Entfaltung in kaltes Wasser gelegt, auf Objektträger aufgezogen und in einem  $55^{\circ}$  warmen Wasserbad geglättet. Die Objektträger wurden durch Trocknen haltbar gemacht.

Vor der immunhistologischen Färbung werden die Schnitte entparaffiniert. Dazu werden die Schnitte am Abend zuvor über Nacht bei  $60^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank (Heraeus) gelagert, damit sich das Paraffin am nächsten Tag besser herauslösen läßt. Die Schnitte werden dann zunächst zwei Mal in 100% Xylol, danach in einer von 100% absteigenden Ethanolreihe gewaschen und zuletzt bis zur weiteren Bearbeitung in 1x PBS gestellt.

#### **2.2.3.1.2 Herstellung von Kryostatschnitten**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gefrierschnitte wurden wie folgt hergestellt:

Auf dem Objektträgertisch der Schneidemaschine (Reichert-Jung) wurden in den Bajonettverschluß die in Tissue-Tek (Sakura Finetek) eingebetteten Gewebe zum Abkühlen eingehakt. Tissue-Tek ist ein Einbettungsmedium für Gefrierschnitte und ermöglicht langsames und damit gewebeschonendes Abtauen und Einfrieren der Gewebe. Es wurden Schnitte von  $5\mu\text{m}$  Dicke angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und gründlich getrocknet. Danach wurden sie 10 min in Aceton fixiert, wiederum getrocknet und bis zur Behandlung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Um die empfindlichen Schnitte nicht zu beschädigen, mußten sie zunächst stufenweise von  $-80^{\circ}\text{C}$  aufgetaut werden. Dazu wurden sie 20 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , anschließend nochmal 20 min bei  $-4^{\circ}\text{C}$  und schließlich 20 min bei RT gelagert. Danach wurde der Ständer mit den Objektträgern 10 min in Aceton getaucht und 3x 5 min in 1xPBS gewaschen. Nun waren die Schnitte bereit zur weiteren Bearbeitung.

Es wurden folgende Gewebeschnitte immunhistologisch behandelt: kongenitale Nävi, Lentigo Maligna Melanome, superfiziell spreitende Melanome und Hautmetastasen.

Von jedem Gewebeblock wurden jeweils zwei Schnitte angefertigt. Ein Schnitt wurde mit Erst- und Zweitantikörper, der zweite diente als Negativkontrolle und wurde nur mit dem Zweitantikörper behandelt.

### **2.2.3.1.3 Immunhistologische Färbung**

Während der gesamten Behandlung war unbedingt darauf zu achten, daß die Schnitte niemals austrockneten. Daher war das zügige Wechseln der Inkubationslösungen wichtig.

Es wurde die Avidin-Biotin-Methode angewandt. Deren Grundlage ist die Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Benötigt wurden ein Primärantikörper und ein Biotin-konjugierter Sekundärantikörper, der an ersteren bindet. Die angegebenen Lösungsmengen waren für 40 bis 50 Schnitte ausreichend.

Getestet wurden die Antikörper C-14, C-19 sowie sc-13508 (Santa Cruz, s.2.1.1) in Verdünnungen zwischen 1:20 und 1:200. Mit dem Antikörper sc-13508 in der Verdünnung 1:100 wurden die besten Ergebnisse erzielt.

Für C-14 und C-19 wurde als Zweitantikörper E0466 (DAKO), für sc-13508 der Zweitantikörper aus dem Vectastain<sup>®</sup>-Kit (Vector Laboratories) in Verdünnungen zwischen 1:20 und 1:300 ausgetestet, wobei sich die Verdünnung 1:50 als die optimalste erwies.

Das dritte benötigte Reagenz war schließlich ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Valenzen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die stark ausgeprägte Affinität des Avidins zum Biotin eine höhere Empfindlichkeit aufweist als andere direkte oder indirekte Färbemethoden.

Zunächst wurden die Schnitte für ca. 30 min bei RT mit dem Präinkubationspuffer (s.2.1.1) blockiert. Dieser reduziert die Hintergrundfärbung, d.h. eine unspezifische Anfärbung des Präparats. Die häufigste Ursache dieser Hintergrundfärbung ist die Anlagerung von Proteinen, also auch der Antikörper, an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Präparate. Der Puffer wurde vorsichtig abgesaugt und es folgte die Inkubation mit dem Antikörper für 1 h bei RT.

Bei einer Kalkulation von 200 µl Erstantikörperlösung pro Schnitt sind für 40 Schnitte 8 ml Erstantikörperlösung anzusetzen. Diese setzen sich aus 8 ml 1x

PBS, 400  $\mu$ l Horse Normal Serum (Roche) , 40  $\mu$ l Triton X-100 (Merck) und 80  $\mu$ l Erstantikörper für eine 1:100-Verdünnung zusammen.

Die Antikörperverdünnungen ergaben sich aus der Beurteilung zweier Kriterien: der spezifischen Antigenfärbung und der unspezifischen Hintergrundfärbung. Die spezifische Färbung sollte so intensiv wie möglich, die unspezifische so gering wie möglich ausfallen. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS wurde die Zweitantikörperlösung auf die Schnitte gegeben.

Eine für 50 Schnitte ausreichende Menge von 10 ml Zweitantikörperlösung setzte sich aus 10 ml 1x PBS mit 4 Tropfen `Blue` (Vectastain<sup>®</sup> ABC Mouse IgG Kit von Vector Laboratories) zusammen und ergab so eine 1:50-Verdünnung. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei RT. Erneut wurde die Lösung abgesaugt und die Schnitte wurden drei Mal in 1x PBS gewaschen. Mit der Mischung aus 15 ml 1x PBS, 3 Tropfen Lösung A sowie 3 Tropfen Lösung B des AP-Reagens wurden die Schnitte 1 h bei RT inkubiert. Nach drei Mal Waschen in 1xPBS folgte die Farbreaktion bei Dunkelheit.

Dazu wurde die Färbelösung aus 15 Tropfen Neu-Fuchsin (DAKO) und 15 Tropfen `Activating Agent` (DAKO) gemischt, nach 3 min mit 10 ml Substratpuffer und 10 Tropfen Levamisole (DAKO) aufgefüllt und auf die Schnitte pipettiert. Die Dauer der Farbreaktion betrug zwischen 10 und 20 min. Sie richtete sich nach der Intensität der Färbung und wurde abgestoppt, wenn eine ebenmäßige und noch nicht zu intensive Färbung erreicht war. Es gilt, eine Überfärbung zu vermeiden, da hier der Anteil an unspezifischer Färbung ansteigt und die Aussagekraft der Methode sinkt. Der Reaktionsstopp erfolgte in Millipore-H<sub>2</sub>O, anschließend wurden die Schnitte in gefiltertem Hämatoxylin für 2 min gegengefärbt. Die Intensität der Gegenfärbung wird durch ihre Länge reguliert. Dabei kann eine zu intensive Gegenfärbung die positive Antigenfärbung maskieren. Die gefärbten Schnitte wurden 3 Mal in Millipore-H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Damit war der Färbevorgang abgeschlossen. Die fertigen Präparate wurden eingebettet, damit sie ihre Farbintensität über mehrere Jahre bewahren. Beurteilt wurden die Präparate am Mikroskop .

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 RNase-freies Arbeiten

RNA degradiert bei Kontakt mit RNasen. Daher verlangt der Umgang mit RNA ein sorgfältiges und sauberes Vorgehen. Dazu wird mit Handschuhen gearbeitet, alle Arbeitsschritte erfolgen möglichst bei 4°C, es werden sämtliche Arbeitsmaterialien zuvor autoklaviert und anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen sowie gesonderte Pipetten benutzt. Anzumerken ist, daß DEPC zwar RNasen durch kovalente Modifikationen vor allem des Histidinrestes im aktiven Zentrum zerstört, jedoch auch auf Nukleinsäuren einen schädigenden Einfluß nimmt. Diesen Vorgang kann man durch zweimaliges Autoklavieren der Lösungen nach einer Behandlung mit DEPC umgehen, da hierbei DEPC in CO<sub>2</sub> und Ethanol zerfällt und verdampft. Alle Arbeitsschritte beim Umgang mit RNA erfolgen auf Eis, zentrifugiert wird bei 4°C.

### 2.2.4.2 RNA-Isolierung aus diversen Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde RNA aus Zellpellets verschiedener Zelllinien, darunter Melanomzelllinien, diversen anderen Tumorzelllinien sowie Melanozyten, die bei -80°C gelagert wurden, isoliert.

Es wurden 800 µl RNA-Clean zum Pellet gegeben und durch Vortexen vollständig homogenisiert. Das im RNA-Clean (AGS Heidelberg) enthaltene Guanidinium-Thiocyanat zerstört Zellbestandteile und inhibiert freiwerdende RNasen. Es kamen weitere 1000 µl RNA-Clean und 180 µl Chloroform dazu und es wurde nochmals gevortext. Chloroform denaturiert Proteine und stabilisiert zusätzlich die instabile Phasengrenze zwischen der wässrigen DNA-Lösung und dem im RNA-Clean enthaltenen Phenol. Nach 10 min wurde das Reaktionsgefäß 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Es bilden sich 2 Phasen, eine organische und eine wässrige. Die RNA reichert sich in der oberen wässrigen Phase an. Die DNA hingegen befindet sich pH-bedingt in der organischen bzw. in der Interphase zwischen den beiden Phasen. Die wässrige Oberphase wurde mit der Pipette abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Verhältnis 1:2 mit Chloroform gemischt. Diese Mischung wurde erneut intensiv gevortext, und zur Phasentrennung 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und im Verhältnis 1:2 mit Isopropanol gemischt, gut gevortext und 15 min auf Eis gehalten, um die RNA auszufällen. Nach 15 min Zentrifugation mit 13000 rpm wurde der Überstand verworfen. Das

verbleibende Pellet wurde nun zur Entsalzung mit 70%igem Ethanol gewaschen, bis das Pellet vom Rand des Reaktionsgefäßes gelöst war und nochmals 5 min mit 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Das verbleibende Pellet war nun die extrahierte RNA. Sie wurde im Thermoblock bei 37°C getrocknet, bis das Ethanol verdampft war, jedoch maximal 15 min. Abschließend wurde das RNA-Pellet je nach Größe in 25 bis 50 µl TE-Puffer gelöst und nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung bei -80°C gelagert.

#### 2.2.4.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Im Anschluß an die RNA-Isolierung wurde die Konzentration der Nukleinsäure bestimmt. Dazu machte man sich ihre photometrischen Eigenschaften zunutze. Da RNA ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm hat und die Absorption von 1 einer RNA- Menge von 40 µg/ml entspricht, ergibt sich folgende Formel zur Konzentrationsermittlung:

$$c(\mu\text{g/ml}) = \text{OD} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Es galt, die optische Dichte (OD) der RNA zu bestimmen. Mittels Photometer wurde die RNA gegen reines Lösungsmittel, in diesem Fall TE-Puffer, gemessen. Die OD sollte systembedingt zwischen 0,05 und 2 liegen, damit das Lambert-Beer'sche Gesetz gewahrt bleibt. Dies erreicht man durch entsprechende Verdünnung der RNA mit TE-Puffer.

Darüberhinaus wurde auch die Reinheit der RNA gemessen. Dazu wurde der Quotient des Absorptionsmaximums von RNA und aromatischen Aminosäuren, das bei 280 nm liegt, herangezogen. Das Kriterium der Reinheit war erfüllt, wenn nun der Quotient von 260 nm zu 280 nm zwischen 1,8 und 2,0 lag. Ein Quotient kleiner als 1,4 zeigt eine starke Proteinverunreinigung an.

#### 2.2.4.4 cDNA-Synthese

##### Methode I: c-DNA-Herstellung mit dem SUPERSRIPT™-RT-Enzym

##### (Invitrogen)

Bei der cDNA-Herstellung findet eine reverse Transkription der mRNA in cDNA statt. Das heißt, die Sequenzabfolge der mRNA wird durch das Enzym Reverse

Transkriptase in die komplementäre DNA umgeschrieben. Die verankerte Base des verwendeten 3'-Primer bestimmt, welcher Abschnitt der mRNA revers transkribiert wird und stellt somit auch den Unterschied zwischen den Primern dar. Es wurden Hexamerprimer verwendet. Der Einsatz an RNA betrug 3000 ng. Aus folgender Formel ergab sich dann die einzusetzende RNA-Menge :

$$\frac{\text{RNA-Konz. der Zelllinie (ng)}}{1 \mu\text{l}} = \frac{3000 \text{ ng}}{x \mu\text{l}}$$

Diese Menge wurde mit DEPC-Wasser auf 27  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Einem Mix aus 8,0  $\mu\text{l}$  5xRT-Puffer, 1  $\mu\text{l}$  Hexamerprimer (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 2,5  $\mu\text{l}$  2mM dNTPs und 1  $\mu\text{l}$  DTT-Stabilisator wurde die in TE-Puffer (s.2.1.1) gelöste RNA zugegeben und gevortext. Es folgten 10 min Denaturierung der mRNA bei 70°C mit anschließender Abkühlung auf Eis für 3 min. Nach Zugabe von 0,5  $\mu\text{l}$  RT-Enzym begann die Erststrangsynthese bei 42°C und war nach 1 h beendet. Das Enzym wurde 15 min bei 70°C inaktiviert. Die Herstellung der cDNA war abgeschlossen und konnte kurzzeitig auf Eis zwischengelagert oder für die längere Konservierung bei -20°C aufbewahrt werden.

#### **Methode II: cDNA-Herstellung mit dem Sensiscript®-RT-Enzym (QIAGEN)**

Der Einsatz an mRNA wurde aus oben aufgeführter Formel berechnet und auf 29,5  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde einem Mix aus 8  $\mu\text{l}$  RT-Puffer, 1  $\mu\text{l}$  Hexamerprimern (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und 2mM dNTPs hinzugefügt und kurz zentrifugiert. Die Denaturierung der mRNA erfolgte bei 70°C für 10 min, es folgten 3 min Lagerung auf Eis. Die Zugabe von 0,5  $\mu\text{l}$  Sensiscript-RT-Enzym startete die Erststrangsynthese, die nach 1 h bei 42°C abgeschlossen war. Die Reaktion wurde 15 min bei 70°C abgestoppt, nochmals kurz zentrifugiert und die cDNA bei -20°C gelagert.

#### **2.2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) ist eine *in vitro*-Technik zur gezielten Amplifikation von Nukleinsäuren, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden.

Die klassische PCR besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation: Die anfängliche Temperaturerhöhung dient der Denaturierung der DNA in Einzelstränge. Als zweite Stufe kommt die Anlagerung, das Annealing, der Primer an den zu amplifizierenden, nun einzelsträngig vorliegenden DNA-Abschnitt. Dazu wird der Reaktionsansatz nach der Denaturierung auf eine Temperatur abgekühlt, die durch die Primersequenz festgelegt wird. Primer können synthetisch hergestellt werden, sollten eine Länge von ca. 20 Nukleinsäuren haben und sind komplementär zu den 5'- bzw. 3'-Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Bei der PCR werden zwei Primer verwendet: einer, der am *sense*-Strang und ein zweiter, der am Gegenstrang, dem *antisense*-Strang, bindet. Nach jedem PCR-Zyklus hat theoretisch eine Verdoppelung des von den beiden Primern eingerahmten DNA-Abschnittes stattgefunden. Dies ermöglicht die exponentielle Amplifikation von DNA. Die Anlagerung der Primer ist ausschlaggebend für die Spezifität der gesamten PCR. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Bei dieser Temperatur herrscht das Aktivitätsoptimum der Taq-Polymerase, welche nun die Primer verlängert und somit die komplementäre DNA-Sequenz polymerisiert. Eine ausreichend lange Elongationszeit ist wichtig, da nur vollständig verlängerte DNA-Stränge in der nächsten Runde der PCR wieder als Matrize dienen können.

#### 2.2.4.5.1 PCR zur Amplifizierung von GAPDH

Die GAPDH-PCR dient dem Nachweis des GAPDH-Gens, einem sogenannten Haushaltsgen. Dies bedeutet, daß GAPDH ubiquitär exprimiert wird und somit geeignet ist, den Erfolg der cDNA-Herstellung nachzuweisen. Primer 1 und Primer 2 rahmen das Gen ein und ermöglichen den Nachweis eines spezifischen Genabschnittes. Da die GAPDH-PCR eine verschachtelte („nested“) PCR ist, dient in der zweiten Runde das entstandene DNA-Molekül als Matrize. Es werden dann die Primer 3 und 4 eingesetzt, die sich innerhalb des von den ersten beiden Primer eingegrenzten Abschnittes befinden. Dies erhöht die Sensitivität und Spezifität der PCR durch Erhöhung des spezifischen Primer-Annealings.

Das Volumen des Ansatzes zur Amplifikation des GAPDH-Gens betrug 50 µl und setzte sich folgendermaßen zusammen: 1xTaq-Puffer (pH 9), 400 µM dNTP, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, jeweils 0,4 µM von Primer 1 und Primer 2 (s.2.1.1) und 2,5 µM Taq-Polymerase. Mit HPLC-H<sub>2</sub>O wurde dieser Ansatz auf 45 µl aufgefüllt und die PCR

mit einem Hot start bei 85°C begonnen. Dies bedeutet, daß zunächst der Ansatz erhitzt wurde, bevor man 5 µl cDNA hinzufügte. Nach dem Hot start folgte ein in 25 Zyklen ablaufendes Programm. Es beinhaltete 1 min Denaturierung der DNA bei 94°C, das Annealing bei 56°C für 1 min und die Elongation für 1 min 5 sec bei 72°C pro Zyklus. Zur Überprüfung des Erfolges der Amplifikation trug man jeweils 10 µl der Nukleinsäure auf ein 2%iges Agarosegel auf. Zur Größenorientierung wurde eine 1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen) aufgetragen.

#### 2.2.4.5.2 PCR zur Amplifizierung von *c-kit*

Zur Amplifizierung des *c-kit*-Gens wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Einmal der Versuch der Amplifizierung der Volle-Länge-cDNA von ca. 3090 bp. Zum anderen die Amplifikation von zwei kürzeren Fragmenten des Gens, das eine mit ca. 1100 bp und das andere mit einer Länge von ca. 2040 bp, um dann die zwei Amplikons mit Restriktionsendonukleasen zu schneiden und in einen pBluescriptvektor zu klonieren. Auf diese Weise sollte letztendlich ebenfalls die Volle-Länge-cDNA erhalten werden. Da dies nicht funktioniert hat, wird an dieser Stelle nicht im Detail auf diese Methode eingegangen.

Bei der Amplifizierung des Teilfragmentes mit einer Länge von ca. 1100 bp wurden folgende Parameter variiert: Die cDNA der Zelllinien WM 3211, G 361, Knochenmark und Blut wurde mit Methode I hergestellt (2.2.4.4), die cDNA-Herstellung der Zelllinien SBC12, HT 29 sowie T 24 erfolgte mit der Methode II (2.2.4.4). Jede cDNA wurde jeweils mit dem Klentaq- und dem Qiagen-PCR-Kit getestet (s.2.1.4). Jede der cDNAs wurde mit jeweils 1 µl des *c-kit*-Primers F für den *sense* sowie *c-kit*-Primer H bzw. I für den *anti-sense*-Strang getestet. Im PCR-Programm wurden die Anzahl der Zyklen für jedes DNA-Template mit 30, 35 und 40, jeweils mit Annealing-Temperaturen von 55°C bis 64°C variiert. Die Annealing-Zeit betrug konstant 1,5 min. Die Denaturierung wurde bei 45 sec und 94°C konstant gehalten, ebenso wie die Extensionszeit von 1 min bei 72°C.

Bei der Amplifizierung des Teilfragmentes mit einer Länge von ca. 2040 bp wurden folgende Parameter variiert: Die cDNA der Zelllinien WM 3211, G 361 und Knochenmark wurde mit Methode I hergestellt (2.2.4.4), die cDNA-Herstellung der Zelllinien SBC12 sowie HT 29 erfolgte mit Methode II (2.2.4.4). Jede cDNA wurde jeweils mit dem Klentaq- und dem Quiagen-PCR-Kit getestet (s.2.1.4). Jede der



cDNAs wurde mit jeweils 1  $\mu$ l der c-kit- Primer C, D bzw. E für den *sense* sowie c-kit-Primer G für den *anti-sense*-Strang getestet. Im PCR-Programm wurden die Anzahl der Zyklen für jedes DNA-Template mit 30, 35 und 40, jeweils mit Annealing-Temperaturen von 55°C bis 64°C variiert. Die Annealing-Zeit betrug konstant 1,5 min. Die Denaturierung wurde bei 45 sec bei 94°C konstant gehalten, ebenso wie die Extensionszeit von 2 min bei 72°C.

Bei der Amplifizierung der Volle-Länge-cDNA der Größe von ca. 3090 bp wurden folgende Parameter variiert: Die cDNA-Herstellung erfolgte für die Zelllinien WM 3211 und G 361 mit Methode I (2.2.4.4) und für die Zelllinien SBC12 sowie T 24 mit Methode II (2.2.4.4). Darüberhinaus wurde MgCl von 5 mM bis 7,5 mM bei jedem DNA-Template getestet. Jedes DNA-Template wurde mit jeweils 1  $\mu$ l der c-kit-Primer A, C, D bzw. E für den *sense* sowie der c-kit-Primer B, H und I für den *anti-sense*-Strang getestet.

Zusätzlich wurden als „nested PCR“ die Primer D, E und I als äußere sowie die Primer A und B als innere Primer durchgeführt. Im PCR-Programm wurden die Anzahl der Zyklen für jede cDNA mit 30, 35 und 40 mit Annealing-Temperaturen von 55°C bis 68°C variiert. Die Annealing-Zeit betrug konstant 1,5 min. Die Denaturierung wurde mit 45 sec bei 94°C konstant gehalten, ebenso wie die Extensionszeit von 3 min bei 72°C.

#### 2.2.4.5.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die einfachste und am häufigsten eingesetzte Methode zum Nachweis der in der PCR amplifizierten DNA ist die Gelelektrophorese. 10  $\mu$ l PCR-Produkt wurden auf einem 2%igen Agarosegel in benachbarten Spuren aufgetragen und aufgetrennt. Die Banden wurden nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiumbromid) angefärbt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert. Durch anschließende UV-Belichtung (312 nm) mit einem Transilluminator wurde die DNA zum Fluoreszieren gebracht. Durch Photographie des Gels konnte das Ergebnis dokumentiert werden.

Das Agarosegel trennt die Nukleinsäuren durch seine Porenstruktur der Größe nach auf. Durch die Phosphatgruppen hat die DNA eine negative Ladung und

wandert nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung Anode. Die Laufgeschwindigkeit der Nukleinsäure verhält sich proportional zum Logarithmus seiner Molmasse. Die Dichte des Gels bestimmt ebenfalls die Laufgeschwindigkeit. Deshalb eignen sich höherprozentige Gele besser für kleinere DNA-Fragmente.

Ein 2%iges Gel wurde wie folgt hergestellt: 2 g Agarose in 100 ml TBE wurden in einem Erlenmeyerkolben aufgekocht, bis es gelöst war. Das Gemisch sollte auf ca. 60°C abgekühlt sein, bevor man es in eine Gelkammer gießt und einen Kamm zur Aussparung der Slots einsetzt. Nach ungefähr 10 min war das Gel fest und konnte beladen werden. Aufgetragen wurden pro Slot 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl 6x Ladepuffer. Dieser enthält Bromphenolblau, welches eine Laufgeschwindigkeit entsprechend einem 300 bp großen Fragmentes hat und Xylencyanol, welches sich wie ein 4 kb großes Amplikon verhält. Ein Größenmarker wurde als Orientierung aufgetragen. Er setzte sich aus 1 µl einer 1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen) und 2 µl 6x Laufpuffer zusammen. Der Marker enthält mehrere Nukleinsäure-Fragmente unterschiedlicher, jedoch exakt definierter Längen. Diese werden ebenfalls im Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und zur Größenabschätzung der zu untersuchenden Proben herangezogen.

Nach Beladen des Gels wurde dieses vorsichtig mit 1x TBE als Laufpuffer überschichtet. Dann wurde eine Spannung von 120 V angelegt und es erfolgte eine Auftrennung der Fragmente bei einer Stromstärke von 400 mA für 1 h 30 min. Es folgte die Anfärbung in Ethidiumbromid für 20 min und die photographische Dokumentation.

#### **2.2.4.6 Gelelution zur Gewinnung definierter DNA-Fragmente aus einem Agarosegel**

Das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) diente dazu, ein einzelnes definiertes DNA-Fragment aus einem Agarosegel zu eluieren, um die DNA danach weiter verwerten zu können. Bei diesem Elutionsverfahren wurde das die gewünschte DNA enthaltende Gelstück verflüssigt und die DNA in stark salzigem Milieu an eine in der Extraktionssäule befindliche Silizium-Gel-Membran gebunden. Die Membran wurde mehrmals gewaschen und die DNA mit einer Niedrigsalzlösung von der Membran eluiert.

Dazu wurde zunächst das betreffende Agarosegelstück nach der Anfärbung in Ethidiumbromid unter einer Hand-UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 366 nm mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen, das dreifache Volumen an Puffer QG des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) hinzugefügt und 10 min bei 50°C inkubiert. Die Suspension wurde auf die QIAquick spin- Säule (Qiagen) gegeben und bei 13000 rpm bei RT für 1 min zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren passierte die Suspension die Silizium-Gel-Membran (Qiagen), an der die DNA nun haften blieb. Die Durchlaufraktion wurde verworfen. Man gab 0,5 ml Puffer QG auf die Säule und zentrifugierte erneut. Danach wurden 0,75 ml Puffer PE des QIAquick Gel Extraction Kits auf die Säule gegeben und nochmals zentrifugiert. Nun wurde die Säule auf ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt, 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) auf die Säule gegeben und ein letztes Mal zentrifugiert. In dem im Reaktionsgefäß befindlichen Eluat befand sich die gewünschte DNA. Sie konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

#### **2.2.4.7 Herstellung Digoxigenin(DIG)-markierter Sonden**

Üblicherweise werden zwischen 10 ng und 3 µg DNA zur DIG-Markierung eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden 500 ng der aus dem Agarosegel eluierten DNA zur DIG-Markierung mit dem DIG DNA Labeling Mix (Roche) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit HPLC-Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Jeweils 5 µl 10 x Klenow-Puffer (MBI Fermentas) und Hexamerprimer wurden hinzugefügt und das Gemisch 10 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt und danach für 2 min auf Eis gestellt. Nun wurden 5 µl 10 x- konzentrierter DIG-Nukleotid-Mix, 3,5 µl DEPC-Wasser und 1,5 µl Klenow-Enzym (2 units/ µl) dazu pipettiert und die Mischung für 1 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Während dieser Inkubation erfolgte die DIG-Markierung. Zur Inaktivierung des Klenow-Enzyms wurden anschließend 1 µl 0,5 M EDTA zugegeben. Das entstandene Produkt wurde zur Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) behandelt. Die Reinigung diente dem Entfernen der Reste von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen mit Hilfe der QIAquick spin Säule (Qiagen). Dazu wurde das fünffache des vorliegenden Volumens an Puffer PB des QIAquick PCR Purification Kits mit der DIG-markierten DNA gemischt, auf die Säule gegeben und die Säule 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DIG-markierte DNA

befand sich nun in der Silizium-Gel-Membran der Säule. Sie wurde durch Zugabe von 0,75 ml Puffer PE des QIAquick PCR Purification Kits und erneute Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm gereinigt. Die Durchlauffraktion wurde verworfen und die Säule auf ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgesetzt. Um die DIG-markierte DNA nun wieder von der Membran zu lösen, wurden 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) auf die Säule pipettiert. Daraufhin wurde abschließend nochmals wie oben zentrifugiert. Die DIG-markierte und frisch gereinigte DNA befand sich im Eppendorf-Tube und wurde nach ihrem Qualitätsnachweis (s.u.) bei -20°C aufbewahrt.

Den Erfolg der DIG-Markierung wurde durch die Detektion mit Anti-DIG-Antikörper (Roche) getestet. Es wurden folgende vier Konzentrationen (1:2, 1:10, 1:100 und 1:1000) der in DEPC-Wasser verdünnten DIG-markierten Probe auf eine Nylonmembran (Boehringer Mannheim) aufgetragen und die Membran kurz trocken gelassen. Es folgte das Crosslinken im UV Stratalink-Gerät (Stratagene) mit 1200 J und die anschließende Detektion im Schnellverfahren. Das heißt, die Membran wurde 1 min in 1 x Maleinsäurepuffer (s.2.1.1) und anschließend 2 x 10 min in 1 x Blockierungspuffer (s.2.1.1) gewaschen. Die Membran wurde mit 15 ml 1 x Blockierungspuffer und 1,5 µl Anti-DIG-AP für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Der Antikörper wurde 2 x 10 min mit 1 x Maleinsäurepuffer heruntergewaschen. Die Membran wurde daraufhin maximal 2 min in Äquilibrierungspuffer (pH 9,5) (s.2.1.1) geschwenkt. Zur Entwicklung der Chemilumineszenz folgte nun die Behandlung der Membran mit CDP-Star® (Roche) in einer 1:100-Verdünnung, das Einschweißen der Membran in einen Plastikbeutel und Dokumentation des Ergebnisses durch Exposition und Entwicklung eines Röntgenfilms (Kodak).

#### 2.2.4.8 Northern Blotting

Die Methode des Northern Blotting dient dem Nachweis der Expression eines bestimmten Gens auf der Ebene der Transkription unter Verwendung von Gesamt-RNA. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zelllinien auf *c-kit* getestet.

Dazu wurde die aus Zelllinien isolierte RNA auf ein Formaldehyd-haltiges Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Bei der anschließenden UV-Belichtung sollten sich zwei Banden zeigen. Cytoplasmatische

RNA eukaryontischer Zellen besteht zu ca. 95% aus rRNA. Diese setzt sich wiederum aus 28S-, 18S- und 5S-RNA zusammen. Bei guten RNA-Präparationen sind diese Moleküle in den entsprechenden Banden zu sehen, wobei die 5S-RNA aus dem Gel gelaufen und somit nicht mehr zu sehen ist. Sie können so als interne Größenmarker dienen.

Danach wurden die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäuren zur weiteren Untersuchung auf eine Nylonmembran transferiert. Hier wurde die Kapillarblot-Technik angewandt, d.h. die im Gel vorhandene RNA wurde durch Kapillarkräfte auf die Membran transferiert, indem der Blot-Puffer durch Auflegen einer dicken Schicht aus Papiertüchern durch das Gel und die Membran gesaugt wurde. Nach dem Crosslinken der RNA mit Hilfe von UV-Strahlung waren die Nukleinsäuren auf der Membran fixiert und konnten anschließend durch Hybridisierung mit der markierten Sonde identifiziert werden.

Nach dem Nachweis, daß sich RNA in ausreichend guter Qualität auf der Membran befindet, folgten weitere Hybridisierungen mit einer spezifischen, markierten Sonde.

#### **2.2.4.8.1 RNA-Gel**

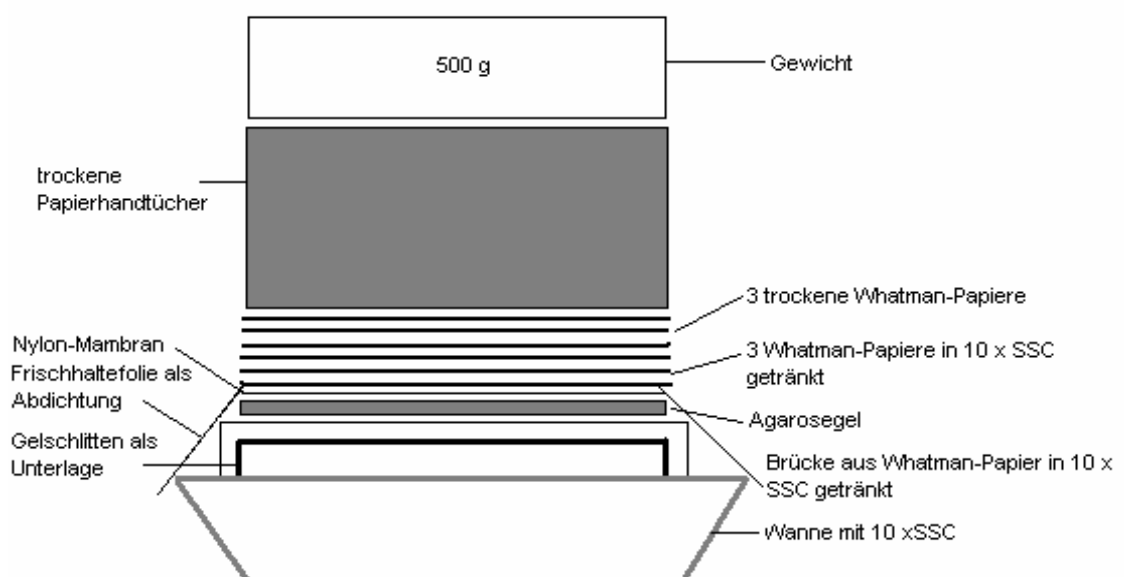
Zur Elektrophorese wurde ein Formaldehyd-haltiges Agarosegel verwendet. Formaldehyd besitzt denaturierende Wirkung dadurch, daß die Aldehydgruppe mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin Schiff'sche Basen bildet, deren Aminogruppen dann nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Verfügung stehen. Dadurch wird die Ausbildung von Sekundärstrukturen und Aggregaten verhindert. Doch Formaldehyd reagiert auch mit anderen Aminogruppen, weshalb für Formaldehydgele als Laufpuffer ein Gemisch aus MOPS und Natriumacetat verwendet wurde. Die RNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel in MOPS, Formaldehyd und Formamid denaturiert. Das Formamid ist in der Lage, die Basenpaarung der RNA zu zerstören und so eine Reaktion der Basen mit Formaldehyd zu ermöglichen. Für das Gel wurde 1 g Agarose in 73,8 ml DEPC-Wasser erhitzt, bis das Gemisch klar war, auf ca. 60°C abgekühlt, damit das Formaldehyd nicht thermisch zerstört wurde. Es wurde 10 ml MOPS und 16,2 ml 37%iges Formaldehyd zugegeben. Bevor das Gel in die Kammer gegossen wurde, wurden diese und der Kamm mit 10% SDS+ DEPC-Wasser gewaschen und das Gel nach dem Gießen ausgehärtet. Jede Probe setzte sich aus 10 µg

RNA, 2  $\mu$ l 10xMOPS, 3,5  $\mu$ l 37%igem Formaldehyd, 10  $\mu$ l Formamid und 2  $\mu$ l 10x Ladepuffer (s.2.1.1) zusammen. Die Proben wurden 15 min bei 65°C erhitzt und danach 2 min auf Eis gestellt, auf das Gel aufgetragen, 5 min bei 100 V und 400mA in das Gel laufen gelassen, die Kammer dann unter Berücksichtigung der Verdampfung ausreichend mit 1x MOPS (s.2.1.1) aufgefüllt und das Gel schließlich über Nacht 16 h bei 25 V und 16 mA laufen gelassen.

Anschließend wurde das Elektrophoresegel mit frischem Ethidiumbromid in autoklaviertem 1x TBE (s.2.1.1) 20 min angefärbt und photographisch mit einem seitlich angelegten Lineal, welches der Größenorientierung diente, dokumentiert. Wie oben schon erwähnt, sollten hier die 18S- sowie 28S- Bande als interner Größenmarker sichtbar sein, deren Ausprägungsgrad ein Maß für die Qualität der RNA ist. Vor dem Blotten des Gels mußte das Formaldehyd entfernt werden, da sonst die Aminogruppen der Basen nicht für die Hybridisierung mit der markierten Sonde zur Verfügung stehen würden. Das Gel wurde 2x 15 min in 20x SSC (s.2.1.1) geschüttelt.

#### 2.2.4.8.2 Northern Blotting und Detektion

Es folgte der Blotaufbau, wie in Abb.3 ersichtlich, wobei die Membran und die Whatmanpapiere zuvor ebenfalls in DEPC-Wasser und 20 x SSC gewaschen wurden.



**Abb.3: Aufbau des Northern Blots**

Am nächsten Tag erfolgte der Abbau des Blots und das Crosslinken der Membran im UV Stratalinker 1800 (Stratagene). Die Membran wurde kurz in 10 x SSC (s.2.1.1) angefeuchtet, in ein Glasröhrchen mit 10 x SSC gerollt, 30 ml DIG easy Hyb-Vorhybridisierungspuffer (Roche) hinzugefügt und für 1 bis 5 h bei 50°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Die DIG-markierte Probe wurde mit 500 µl Hybridisierungspuffer (Roche) in ein Eppendorf-Tube pipettiert und 10 min bei 100°C erhitzt. Ab der zweiten Verwendung ist darauf zu achten, die Probe wegen des Formamids in der Hybridisierungslösung nur noch auf 70°C zu erhitzen. Die Probe kam für 3 min auf Eis, wurde anschließend mit 9,5 ml vorgewärmtem DIG Easy Hyb-Puffer (Roche) gemischt und nach Verwerfen des Vorhybridisierungspuffers unter Vermeidung von Luftblasenbildung vorsichtig zu der Membran in das Glasröhrchen pipettiert. Die Membran wurde bei 50°C über Nacht mit der DIG-markierten Probe hybridisiert. Da die DIG-markierte Probe wiederholt verwendet werden kann, wurde sie nach dem Hybridisieren in ein 50 ml-Falcon-Tube gefüllt und bei -20°C gelagert. Die Membran wurde 2 x 5 min bei 50°C in 2 x SSC / 0,1% SDS, 1 min in 1 x Maleinsäurepuffer und 2 x 15 min in 2 x Blockierungspuffer bei RT gewaschen. Es folgte die Behandlung mit dem Anti-Digoxigenin-AP (Roche) 1:10000 in 2 x Blockierungspuffer verdünnt für 45 min bei RT. Die Membran wurde 2 x 15 min in 1 x Maleinsäurepuffer und 2 min in Äquilibrierungspuffer gewaschen. Es folgte die Chemilumineszenzdetektion mit 70 µl CDP-Star® (Roche) in 7 ml Äquilibrierungspuffer für eine Dauer von 10 min. Die Lichtemission des CDP-Star® wurde in der Dunkelkammer durch Auflegen eines Filmes (Kodak) nachgewiesen. Die Filme wurden entwickelt, bis die Signale detektierbar wurden und mit Fixierer (Sigma) behandelt, um sie haltbar zu machen.

### 3. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Expressionsprofil des *c-kit*-Rezeptors auf Protein- und RNA-Ebene im Verlauf der Melanomprogression darzustellen.

Der Nachweis der *c-kit*-Proteinexpression in Melanomzelllinien erfolgte durch FACS-Analyse und Western Blot und in Nativgewebe durch Immunhistologie. Der Nachweis der RNA-Expression erfolgte über RT-PCR und Northern Blotting. Die Ergebnisse der jeweils angewandten Methoden sind nachfolgend dargestellt.

#### 3.1 Nachweis der c-kit-Proteinexpression

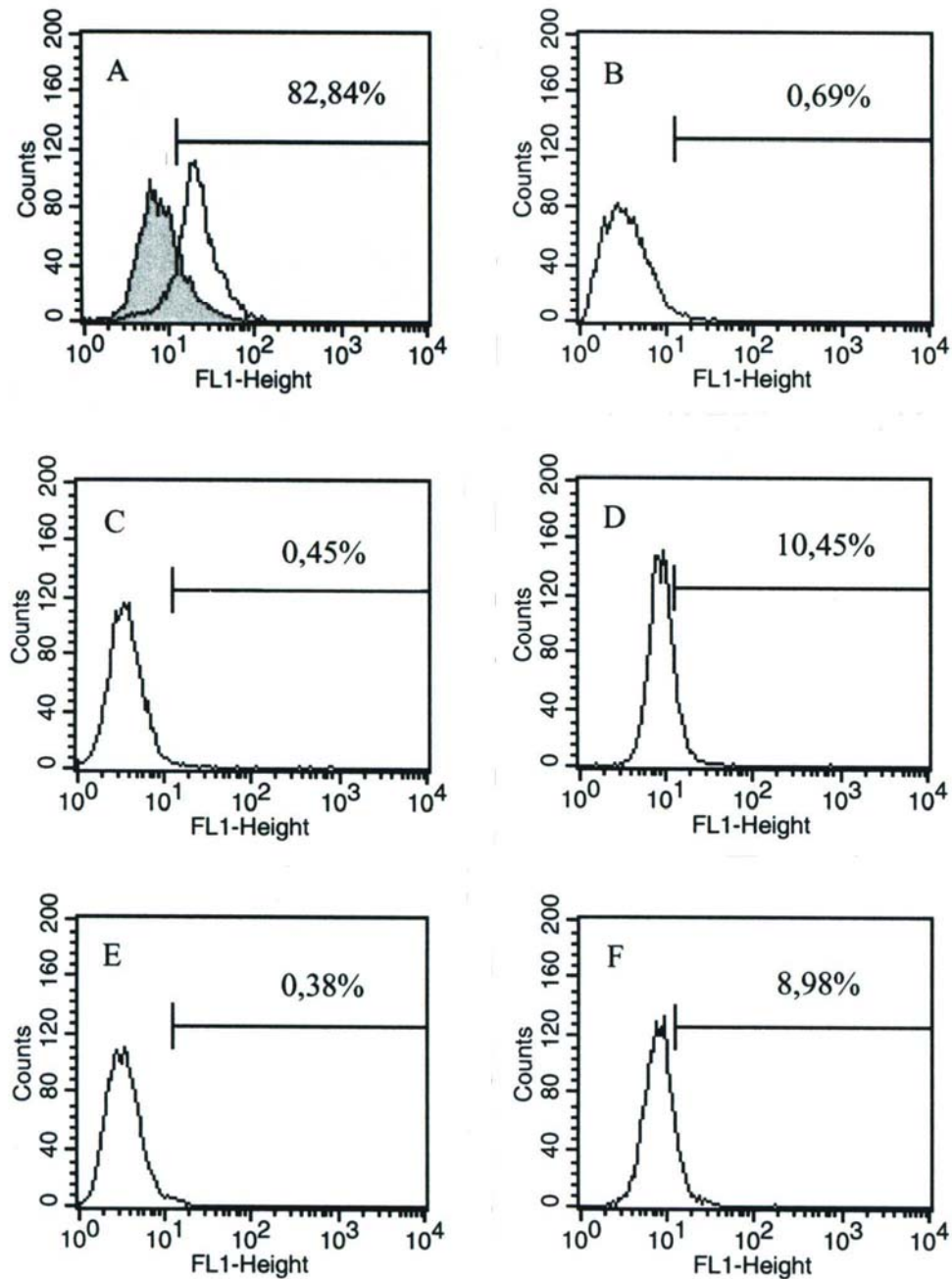
##### 3.1.1 Detektion der c-kit-Proteinexpression in Melanomzelllinien über FACS-Analyse

Die Expressionsdetektion des Oberflächenrezeptors *c-kit* in Melanomzelllinien erfolgte durch FACS-Analyse. Als Grundlage dienten die in Tab.2 aufgeführten Zelllinien aus der Zellkultur. Pro Zelllinie wurden  $10^6$  Zellen eingesetzt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

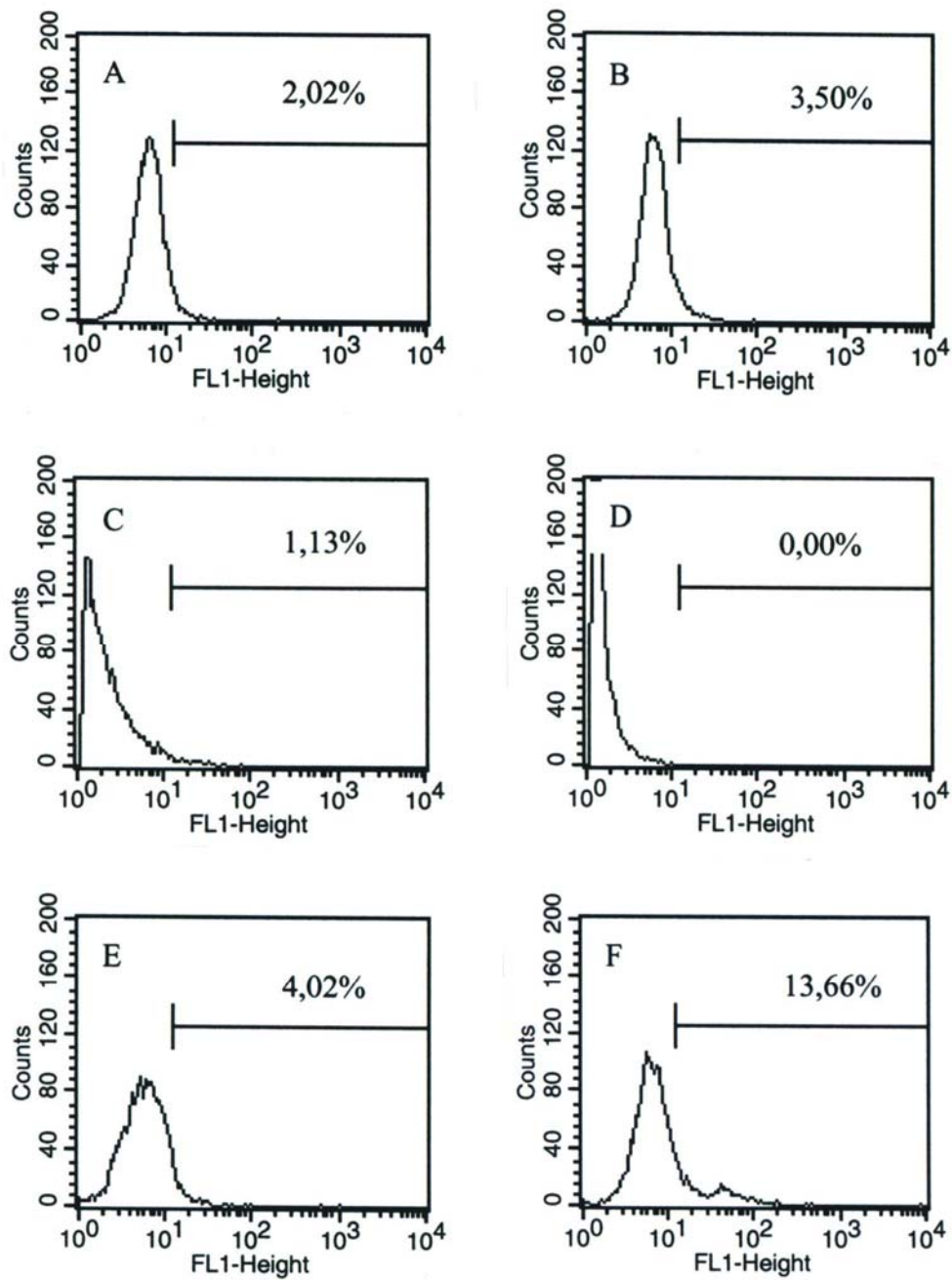
In der Durchflußzytometrie wurde der gängigste Fluoreszenzfarbstoff FITC verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein Merkmal, und zwar die Expression des Oberflächenrezeptors *c-kit* in einer homogenen Zellpopulation gemessen. Vor der Messung im Durchflußzytometer wurden die Zellen mit dem Fluoreszenz-markierten Antikörper sc-13507-FITC (Santa Cruz, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:20 in PBS/1 % BSA für die Dauer von 30 min inkubiert. Durch das Festlegen einer Grenze wurden die Zellen in eine negative und in eine positive Population aufgeteilt, wobei die positive Zellpopulation den mit dem FITC-Antikörper markierten Zellen entsprach. In den Abb.3 bis 5 sind die prozentualen Anteile der positiven Zellen pro Zelllinie angegeben. Alle ungefärbten Melanozyten wurden als *c-kit*-negativ definiert und ein Marker gesetzt. Die gefärbten Zellen aller Zelllinien rechts des Markers wurden als positiv definiert.

82,84% der Melanozyten waren positiv für *c-kit*. Die Nävuszellen, alle Melanom- und alle Tumorzelllinien waren negativ für *c-kit*.

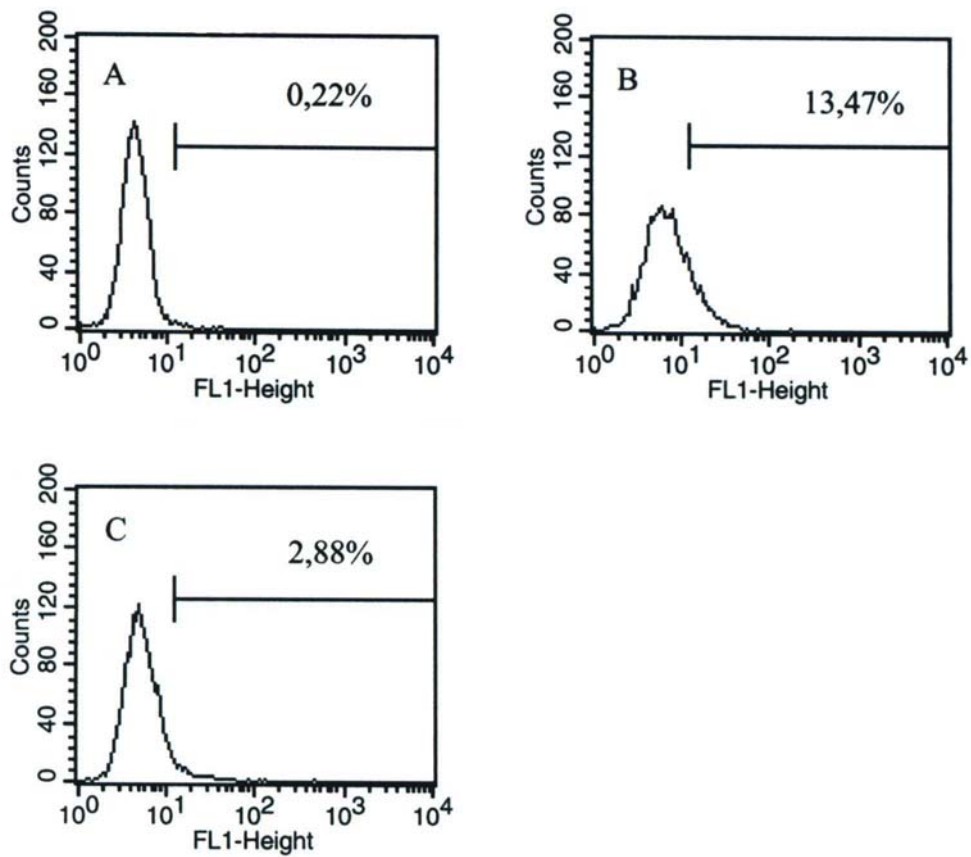




**Abb.3 FACS-Analyse für c-kit-Expression.** Die grau schattierte Zellpopulation in Bild A zeigt ungefärbte Melanozyten, alle weißen Zellpopulationen zeigen die mit dem FITC-gekoppelten Antikörper sc-13507-FITC (Santa Cruz, CA, USA) gefärbten Zellen in einer Verdünnung von 1:20. Bild A zeigt Melanozyten, Bild B zeigt Nävuszellen NZ 680, Bild C SBC12, Bild D WM 35, Bild E WM 1552C, Bild F WM 793.



**Abb.4 FACS-Analyse für c-kit-Expression.** Die Zellpopulationen zeigen die mit dem FITC-gekoppelten Antikörper sc-13507-FITC (Santa Cruz, CA, USA) gefärbten Zellen in einer Verdünnung von 1:20. Bild A zeigt WM 1205LU, Bild B WM 852, Bild C Mewo, Bild D G 361, Bild E SK 28, Bild F CH3LC.

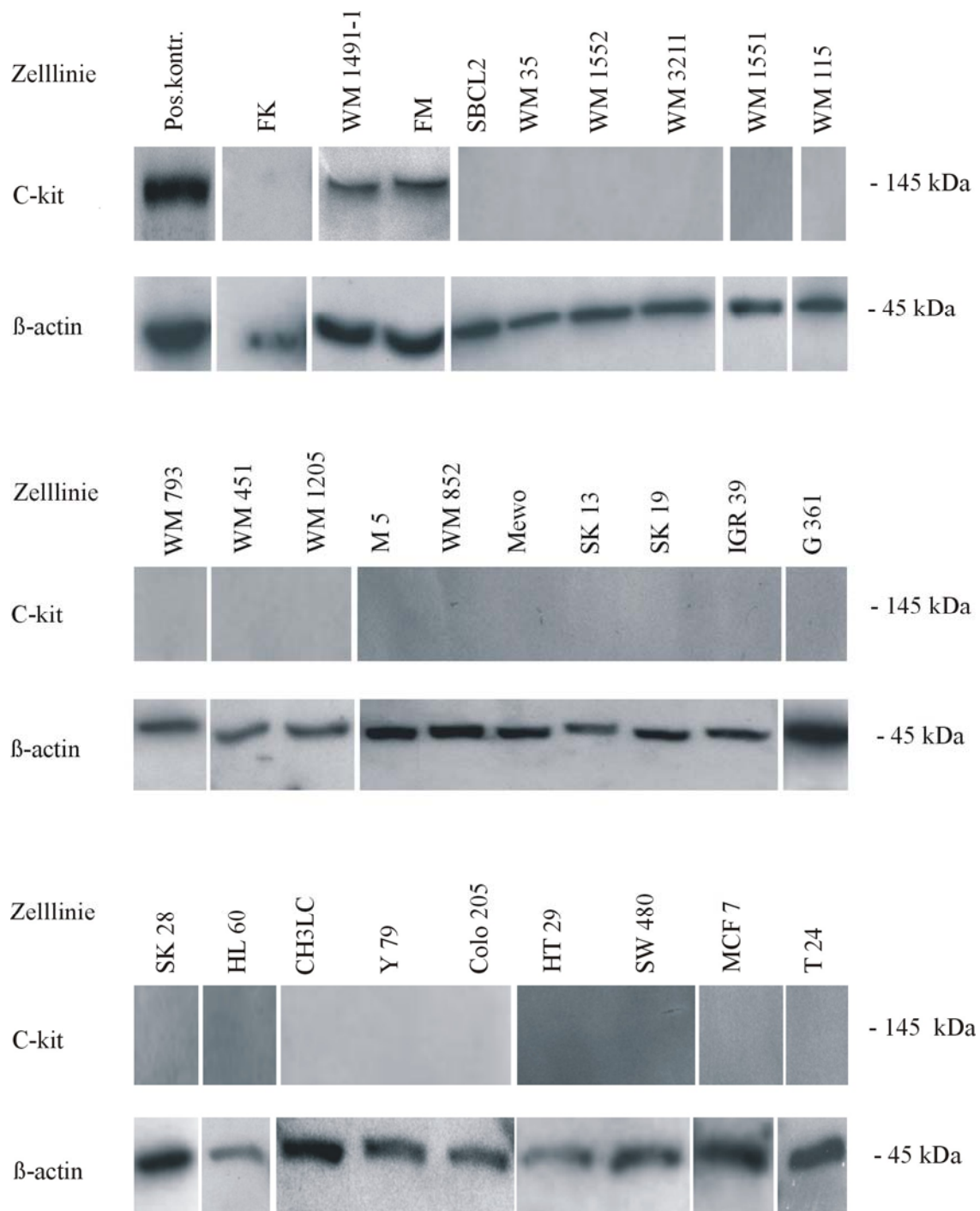


**Abb.5 FACS-Analyse für c-kit-Expression.** Die Zellpopulationen zeigen die mit dem FITC-gekoppelten Antikörper sc-13507-FITC (Santa Cruz, CA, USA) gefärbten Zellen in einer Verdünnung von 1:20. Bild A zeigt Colo 205, Bild B MCF 7, Bild C T 24.

### 3.1.2 Detektion der c-kit-Proteinexpression in Melanomzelllinien über Western Blot

Der Western Blot diente dem Nachweis des c-kit-Proteins. Dazu wurde mit Zellen diverser Zelllinien (s.Tab.1;2.1.6) eine Proteinextraktion durchgeführt. Die Proteinkonzentration der Gesamtzell-Lysate wurde anschließend mit dem BIO-RAD Protein Assay basierend auf der Bradford-Methode ermittelt. Dies ermöglichte es, in den Western Blots eine definierte Gesamtproteinmenge (30 µg) auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufzutragen. Als Positivkontrolle dienten CCRF-CEM- Zellysate (Santa Cruz, CA, USA) aus humanen T-Zell-Leukämie-Zellen. Es wurden das c-kit-Protein der Größe 145 kDa und das β-actin der Größe 45 kDa detektiert. β-actin ist ein Haushaltsgen, welches als Beladungskontrolle diente. Nach dem Blotten erfolgte die Detektion des c-kit-Proteins mittels Antikörperreaktion. Hierbei wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen humanes c-kit IgG<sub>1</sub> sc-13508 in einer 1:66,6- Verdünnung in 10 ml 1 x PBS / 0,1% Tween 20 / 10 % Milchpulver die besten Ergebnisse erzielt. Die polyklonalen Antikörper erwiesen sich als ungeeignet, da eine zu hohe Hintergrundreaktion durch Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen keine Aussage über die spezifische Reaktion zuließ. Zur Detektion des β-actin-Proteins wurde der β-actin-Antikörper I-19 als 1:100-Verdünnung ebenfalls in 10 ml 1 x PBS / 0,1 % Tween 20 / 10 % Milchpulver verwendet.

Das c-kit-Protein konnte in Melanozyten und im Nävuszellnävus nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß die Expression des c-kit-Proteins schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Melanomprogression nicht mehr stattfindet.



**Abb.6 Western Blot-Ergebnisse.** Der c-kit-Nachweis in den verschiedenen Zelllinien erfolgte durch Detektion mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen humanes c-kit IgG<sub>1</sub> sc-13508 in einer 1:66,6- Verdünnung in 10 ml 1 x PBS / 0,1% Tween 20 / 10 % Milchpulver. Der β-actin-Nachweis erfolgte durch β-actin-Antikörper I-19 als 1:100-Verdünnung in 10 ml 1 x PBS / 0,1 % Tween 20 / 10 % Milchpulver. Positiv für c-kit waren WM 1491-1 (Nävuszellen) sowie FM (Melanozyten). Als Positivkontrolle wurden CCRF-CEM- Zellysate (Santa Cruz, CA, USA) verwendet.

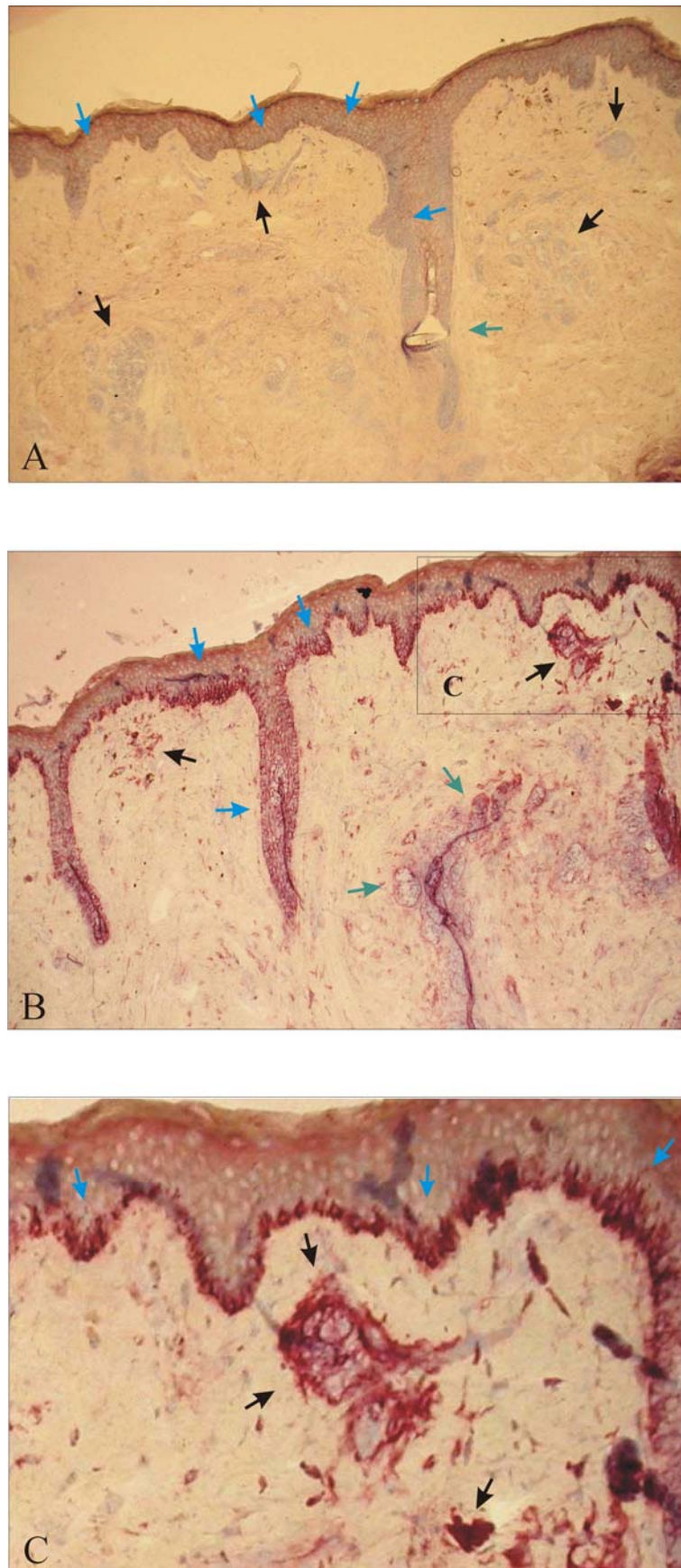
### 3.1.3 Nachweis der c-kit-Proteinexpression in Melanomgewebe über Immunhistologie

Die Immunhistologie wurde angewendet, um die Expression des c-kit-Rezeptors nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* in diversen Nativgeweben zu untersuchen. Die Untersuchung an Nativgeweben ist insofern interessant, als daß der durch homogene und heterogene Interaktionen gekennzeichnete Zellverband hier ein völlig anderes Milieu bietet als die Zellkultur, welche aus über Generationen hinweg angezüchteten isolierten und homogenen Zellpopulationen besteht.

Für die immunhistologische Färbung wurden von kongenitalen Nävi, Lentigo Maligna Melanomen, superfiziell spreitenden Melanomen sowie von Hautmetastasen jeweils Paraffin- sowie Kryostatschnitte angefertigt. Es wurden die Antikörper C-14, C-19 und sc-13508 (Santa Cruz, CA, USA) in den Verdünnungen zwischen 1:20 und 1:200 ausgetestet. In der vorliegenden Arbeit wurden Kryostatschnitten verwendet, da die Antikörper nicht paraffingängig waren. Mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen humanes c-kit IgG<sub>1</sub> sc-13508 in der Verdünnung 1:100 wurden die besten Ergebnisse erzielt. Die polyklonalen Antikörper C-14 und C-19 führten zu unspezifischen Färbungen und damit schwer interpretierbaren Ergebnissen. Die unspezifische Färbung ist ein oft zu beobachtendes Problem bei polyklonalen Antikörpern.

Von jedem Gewebestück wurden Serienschnitte angefertigt. Ein Schnitt wurde jeweils mit Antikörper behandelt, ein zweiter diente als Negativkontrolle und wurde nur mit dem jeweiligen Zweitantikörper behandelt. Die Schnitte wurden nach der Antikörperfärbung mit HE gegengefärbt. Insgesamt wurden mehrere Nävi, superfiziell spreitende Melanome, ein Lentigo Maligna Melanom sowie einige Hautmetastasen gefärbt. Die Ergebnisse der verschiedenen Subtypen von Melanomen waren einheitlich, einige Schnitte waren jedoch durch Überfärbung nicht beurteilbar und werden daher hier nicht gezeigt.

Um eine Übersicht über alle Entwicklungsstadien des Melanoms zu geben, werden nachfolgend exemplarisch jeweils die immunhistologischen Färbungen eines Nävus, eines superfiziell spreitenden Melanoms, eines Lentigo Maligna Melanoms sowie einer Hautmetastase gezeigt und beschrieben. Bild A jeder Abbildung zeigt jeweils die Negativkontrolle und die Bilder B und C die c-kit-Antikörperfärbungen, wobei C ein vergrößerter Ausschnitt aus Bild B ist.



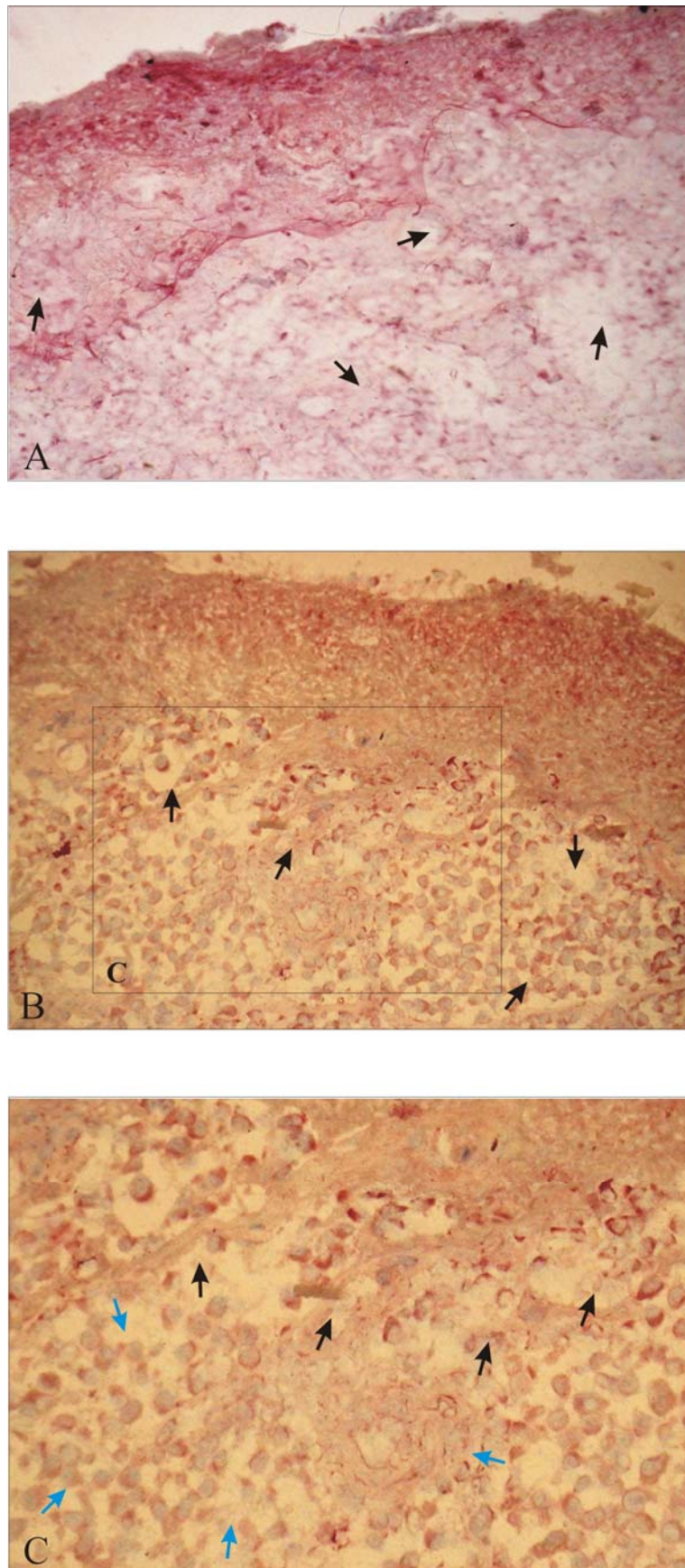
**Abb.7 Immunhistologische Färbung eines Nävus.** Bild A: Negativkontrolle, Bild B und C: Färbungen mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen humanes c-kit IgG<sub>1</sub> sc-13508 in der Verdünnung 1:100. Bild C: vergrößerter Ausschnitt aus Bild B. Fortsetzung siehe nächste Seite .

Abb.7 zeigt die Färbung eines Nävus. In der Negativkontrolle Abb.7A stellen sich die Nävuszellnester bläulich-violett dar (schwarze Pfeile), ebenso die Melanozyten entlang der Basalmembran (blaue Pfeile). Mittig ist ein angeschnittener Haarfollikel zu sehen (grüner Pfeil).

In Abb.7B zeigt sich in kräftigem Rot eine deutliche c-kit-Färbung der Nävuszellnester (schwarze Pfeile) sowie eine rote Färbung entlang der basalen Epidermis (blaue Pfeile).

Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich um Melanozyten und nicht um Keratinozyten, da diese bereits in der weitaus spezifischeren Methode des Western Blottings negativ waren. Desweiteren sind die Talgdrüsen (grüne Pfeile) angefärbt.



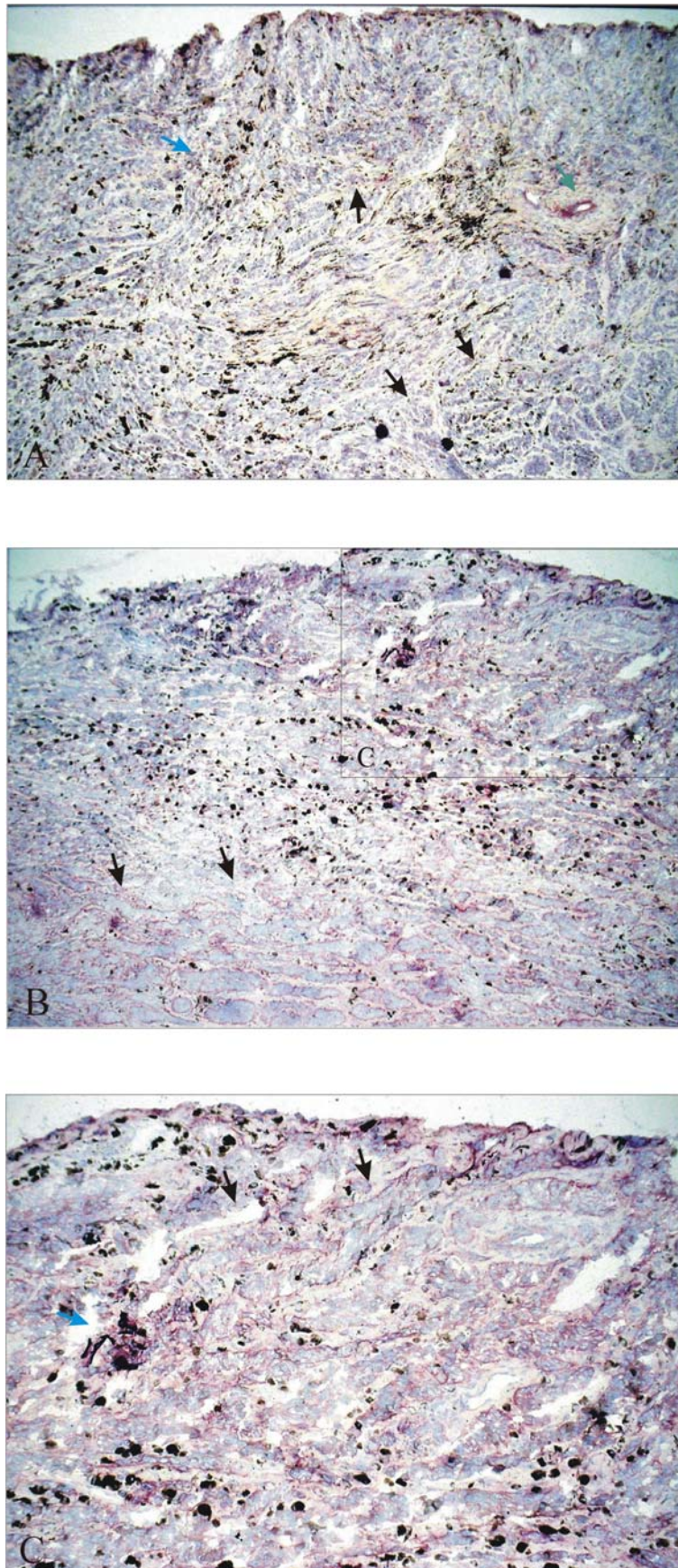


**Abb.8 Immunhistologische Färbung eines superfiziell spreitenden Melanoms.** Bild A: Negativkontrolle, Bild B und C: Färbungen mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen humanes c-kit IgG<sub>1</sub> sc-13508 in der Verdünnung 1:100. Fortsetzung siehe nächste Seite.

Die Schnitte in Abb.8 stammen von einem superfiziell spreitenden Melanom mit ulzeriertem knotigen Anteil, Level IV nach Clark und der größten vertikalen Tumordicke von 5 mm. In Abb.8A, der Negativkontrolle, stellen sich die Tumorzellen subepidermal verstreut bläulich-violett dar (schwarze Pfeile). Abb.8B und 8C (vergrößerter Ausschnitt aus Bild B) zeigen die c-kit-Antikörperfärbungen. Deutlich erkennbar ist hier eine rötliche Färbung der bläulichen Tumorzellen an der Junktionszone, die c-kit noch zu exprimieren scheinen (schwarze Pfeile).

Mit zunehmender Invasionstiefe jedoch nimmt die Anfärbung der Tumorzellen ab, die Anfärbung geht in der tiefen Dermis sogar gänzlich verloren, dies wird besonders in Abb.8C deutlich. Hier erkennt man eine ausgeprägte rote c-kit-Färbung der Melanomzellen an der Junktionszone im oberen Teil der Abbildung, während die tiefer liegenden Tumorzellen negativ für c-kit sind (blaue Pfeile).

Dies könnte man als einen Hinweis darauf deuten, daß durch den Verlust von c-kit die Invasionsfähigkeit der Melanomzellen ansteigt.

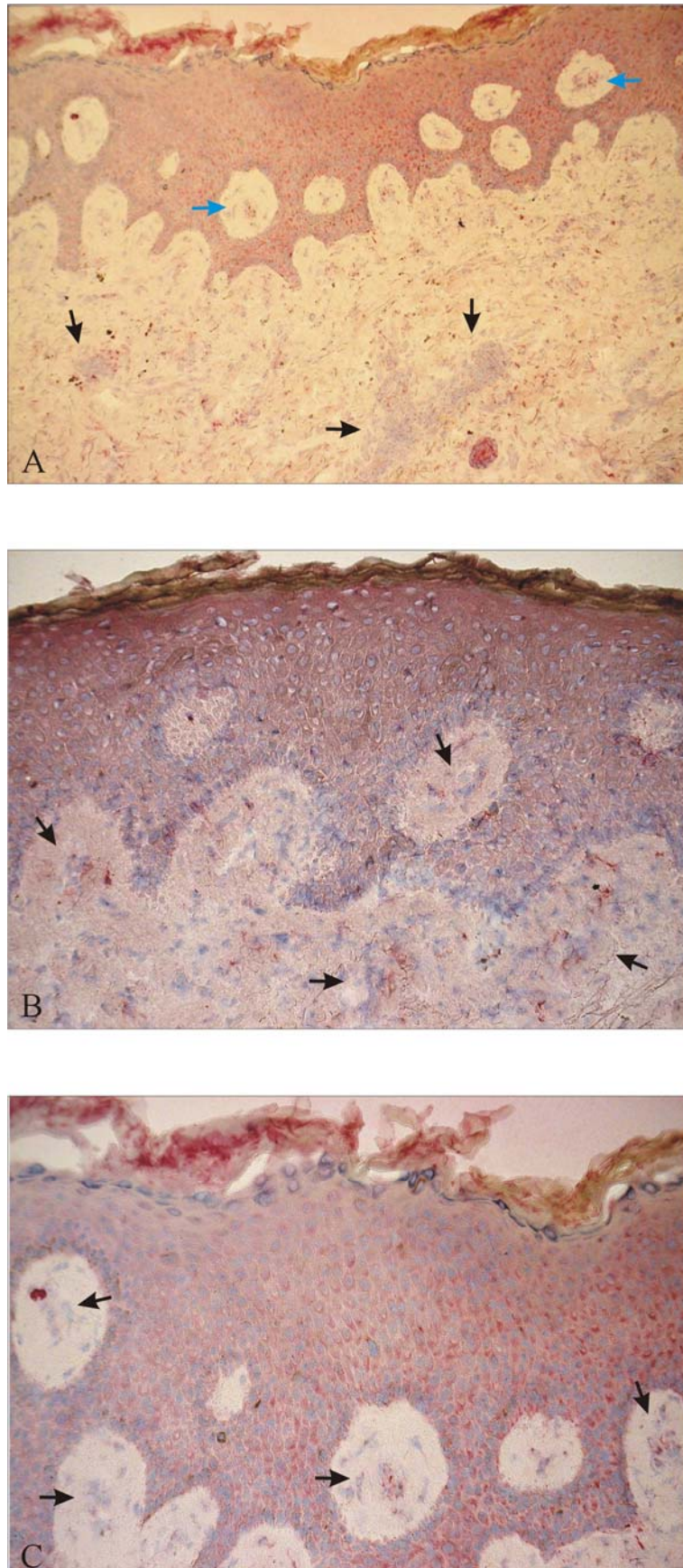


**Abb. 9 Lentigo Maligna Melanom-Färbung.** Bild A zeigt die Negativkontrolle, Bild B und C (vergrößerter Ausschnitt aus Bild B) zeigen Färbungen mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen humanes c-kit IgG<sub>1</sub> sc-13508 in der Verdünnung 1:100. Fortsetzung siehe nächste Seite.

In Abb.9 ist ein polypöses Lentigo Maligna Melanom, mindestens Level V nach Clark mit einer Tumordicke von mindestens 20 mm zu sehen.

Die Tumorzellverbände stellen sich bläulich-violett dar (schwarze Pfeile), die sich als Tumorzellnester durch die gesamte Ausdehnung der Schnitte ziehen. Das Pigment stellt sich bräunlich-schwarz dar. Hierbei handelt es sich um stark pigmentierte Nester spindelförmiger atypischer Melanozyten (blaue Pfeile). In Abb.9A sieht man darüberhinaus ein angeschnittenes Gefäß (grüner Pfeil).

Die Färbungen in Abb.9B und 9C sind eindeutig negativ für c-kit. Die Tumorzellen sind wie in der Negativkontrolle bläulich-violett (schwarzer Pfeil). Lediglich die Pigmentanhäufung in Abb.9C links im Bild zeigt eine leicht rötliche Färbung (blauer Pfeil). Dies könnte allerdings auch ein unspezifisches Färbepräzipitat sein, wie es in Pigmentaggregaten häufig zu beobachten ist.



**Abb.10 Immunhistologische Färbung einer Melanom-Hautmetastase.** Bild A zeigt die Negativkontrolle, Bild B und C zeigen Färbungen mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen humanes c-kit IgG<sub>1</sub> sc-13508 in der Verdünnung 1:100. Fortsetzung siehe nächste Seite.

Abb.10 zeigt eine Hautmetastase eines malignen Melanoms.

In Bild A liegen unter einer weitgehend unauffälligen Epidermis relativ gut abgegrenzte Knoten des malignen Melanoms. Die Tumorzellen sind bläulich-violett (schwarze Pfeile) und sind vereinzelt auch in den Papillenspitzen zu sehen (blaue Pfeile).

Die Abb.10B und 10C (vergrößerter Ausschnitt aus Bild B) zeigen die c-kit-Antikörper-behandelten Gewebsschnitte, die eindeutig negativ für c-kit sind. Die Tumorzellen sind ebenso wie in der Negativkontrolle bläulich (schwarze Pfeile).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Melanozyten im Nävus, die Nävuszellnester und darüber hinaus die Talgdrüsen positiv für c-kit waren, ebenso wie einige Tumorzellen an der Junktionszone eines superfiziell spreitenden Melanoms. Tiefere Schichten des superfiziell spreitenden Melanoms, das Lentigo Maligna Melanom sowie die Hautmetastase waren negativ für c-kit.

### **3.2 Nachweis der *c-kit*-Expression auf RNA-Ebene**

#### **3.2.1 Detektion der *c-kit*-RNA-Expression über PCR**

Neben dem Nachweis von c-kit auf Proteinebene erfolgte auch die Untersuchung der RNA-Expression. Hierbei wurde zum einen versucht, das *c-kit*-Gen über RT-PCR zu amplifizieren, zum anderen wurde das Expressionsprofil von *c-kit* auf RNA-Ebene durch die Methode des Northern Blottings bestimmt. Nach der Extraktion von Gesamt-RNA wurde anschließend die RNA einiger Zelllinien für die PCR in cDNA umgeschrieben. Der Vorteil der Verwendung von Zellen aus der Zellkultur liegt darin, daß zum einen das Material nicht so stark begrenzt ist und zum anderen qualitativ gute RNA auf einfache Art isoliert werden kann. Aus den in Tab.1 aufgelisteten Zelllinien wurde zunächst Gesamt-RNA extrahiert. Die Qualität der RNA wurde mit Hilfe des Photometers bestimmt. Dazu wurde der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm sowie 280 nm gebildet. Je niedriger dieser Quotient ist, desto verunreinigter ist die RNA mit Proteinen. Ein Quotienten von über 1,8 ist anzustreben. Die Ratio aus den Extinktionswerten bei 260 nm und 280 nm, d.h. die Reinheit, lag in der vorliegenden Arbeit zwischen 1,895 und 2,128.

Die RNA-Extinktionswerte sind nachfolgend in Tab.3 aufgelistet.

Tab.3: RNA-Extinktionswerte

Zelllinie	RNA-Konzentration [ng/ $\mu$ l]	Reinheit Ratio 260/280
SK 28	5348	2,099
SK 19	876	1,973
Mewo	3672	2,096
SW 480	3500	2,119
T 24	4248	2,128
WM 451 LU	6612	2,051
WM 1205 LU	2424	2,068
SBCL2	2056	2,107
CH3LC	2136	2,078
Colo 205	2956	2,064
MCF 7	7420	2,120
HT 29	784	2,021
M 5	4244	2,093
WM 793	2356	2,045
WM 115	5044	1,998
WM 35	3640	2,106
WM 3211	1468	2,085
IGR 39	3040	2,071
WM 852	652	1,895
FK 374	3808	2,102
WM 1552 C	4044	2,089

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Expressionsprofil von *c-kit* in mehreren Melanomzelllinien über PCR erstellt. Hierzu wurde versucht, zum einen Teilfragmente mit der Größe 1100 bp bzw. 2040 bp, zum anderen den Voll-Länge-Klon mit der Größe von 3090 bp des *c-kit*-Gens aus einer Auswahl an Melanomzelllinien zu amplifizieren.

Es wurde aus der extrahierten RNA cDNA mit Methode I und mit Methode II hergestellt (s.2.2.4.4) und zunächst in einer PCR zur Amplifizierung des GAPDH-Gens, einem Haushaltsgen, einem Qualitätsnachweis unterzogen. Die GAPDH war für alle untersuchten Zelllinien positiv, die Bilder werden hier nicht gezeigt. Danach folgten die Versuche zur *c-kit*-Amplifikation und anschließender Kontrolle auf einem 2%iges Agarosegel. Als Größentorientierung diente eine 1 kb-Leiter (Gibco BRL). Bei den Negativkontrollen wurde in der PCR keine cDNA zugesetzt.

Zur Amplifizierung des kürzeren *c-kit*-Teilfragments der Länge von ca. 1100 bp wurde die cDNA folgender Zelllinien eingesetzt: SBCL2, WM 3211, G 361, Blut sowie Knochenmark.

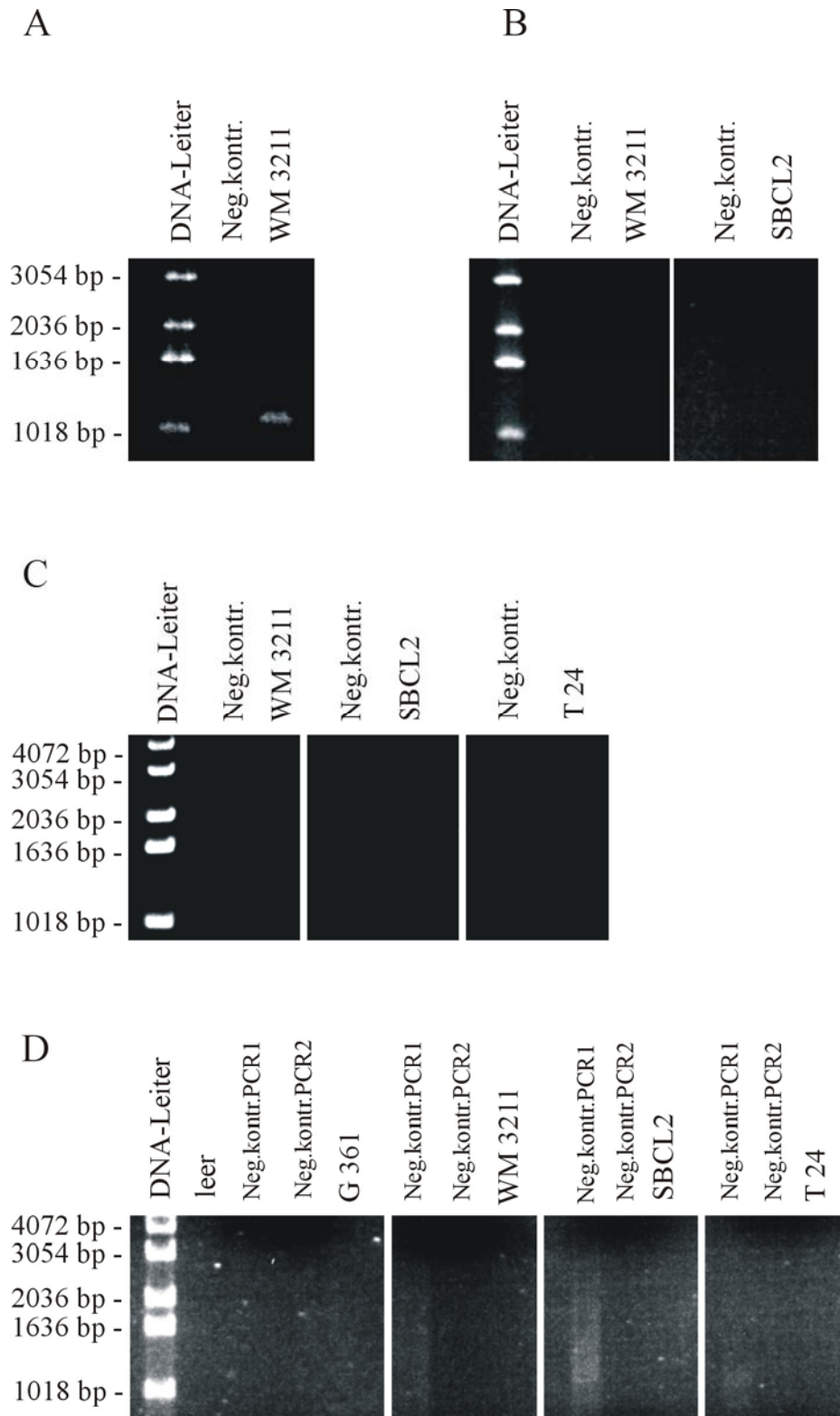
Als einzige positive PCR-Reaktion ist in Abb.11.A die Amplifikation der cDNA aus der Zelllinie WM 3211 zu sehen. Diese Amplifikation gelang einmalig und war in nachfolgenden PCR-Reaktionen nicht mehr reproduzierbar, so daß in Betracht gezogen werden muß, daß es sich hierbei nur um ein Artefakt gehandelt hat. Die Abbildungen der übrigen negativen PCR-Reaktionen des kürzeren Teilfragmentes werden nicht gezeigt.

Zur Amplifizierung des *c-kit*-Teilfragments der Länge von ca. 2040 bp wurde cDNA der Zelllinien SBC12, WM 3211, G 361, Knochenmark, sowie HT 29 verwendet. Alle Versuche der Amplifikation dieses Fragments erwiesen sich als negativ, Abb.11B zeigt exemplarisch zwei PCR-Reaktionen, auf die Darstellung der restlichen negativen PCR-Reaktionen wurde verzichtet.

Zur Amplifizierung des Volle-Länge-Klons mit der Größe von ca. 3090 bp wurde die cDNA der Zelllinien SBC12, WM 3211, G 361, und T 24 verwendet. Alle PCR-Reaktionen und auch alle „nested“-PCR-Reaktionen zur Volle-Länge-Klon-Amplifikation waren negativ, eine Auswahl der Ergebnisse der PCR-Reaktionen ist in Abb.11C für die normalen, in Abb.11D für die „nested“-PCR-Reaktionen aufgezeigt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß somit die untersuchten Zelllinien bis auf eine positive Amplifikation mit WM 3211 negativ für *c-kit* waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die hier ausgewählten Tumorzelllinien *c-kit* nicht exprimieren.



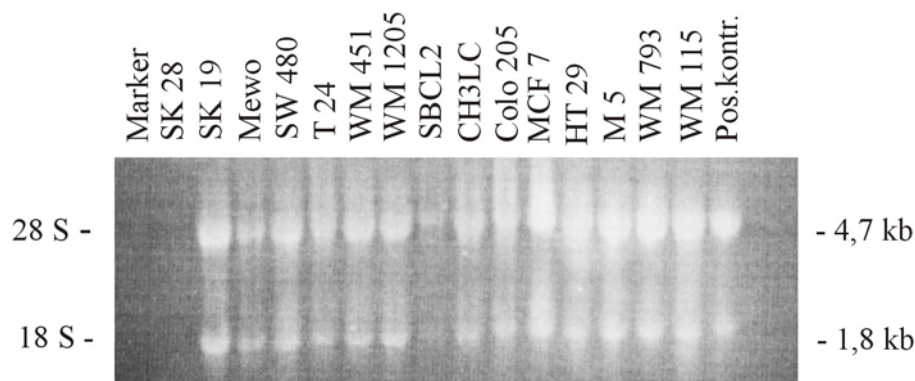


**Abb.11 Übersicht der PCR-Ergebnisse.** Bild A zeigt die Amplifikation des 1100 kb-Fragments von *c-kit*, die Bande ist bei ca. 1100 bp zu sehen. Bild B zeigt exemplarisch die Amplifikation des 2040 bp-Fragments von *c-kit*, Bild C zeigt exemplarisch die Amplifikation des Volle-Länge-Klons (3090 bp) von *c-kit*, Bild D zeigt exemplarisch die Amplifikation des Volle-Länge-Klons von *c-kit* mit Hilfe der „nested“ PCR. Die 1 kb-DNA-Leiter (Gibco BRL) diente der Größenkontrolle.

### 3.2.2 Nachweis der *c-kit*-RNA-Expression über Northern Blotting

Durch Northern Blotting folgte schließlich eine weitere Untersuchung des *c-kit*-Expressionsprofils auf RNA-Ebene.

Es wurden pro Zelllinie 10 µg RNA eingesetzt. Abb.12 zeigt, daß die RNA bis auf die Zelllinie SK Mel 28 durchgehend intakt ist. Dabei ist zum einen das Vorhandensein und zum anderen die deutliche Trennung der 28 S- und 18 S-Fraktion der Beleg für die RNA-Qualität.



**Abb.12 RNA-Gel** zum Qualitätsnachweis der RNA. Die 18 S-Bande ist bei 1,8 kb, die 28 S-Bande bei 4,7 kb zu sehen.

Als Positivkontrolle für den Northern Blot diente die DNA aus der positiven PCR der *c-kit*-Amplifikation des kürzeren Teilfragments der Größe von ca. 1100 bp (s.Abb.11A, PCR). Dabei wurde durch Gelelektion das DNA-Fragment aus dem Agarosegel, auf dem die PCR-Produkte aufgetragen wurden, gewonnen (s.2.2.4.6) und mit auf das RNA-Gel aufgetragen.

Nach dem Qualitätsnachweis der RNA wurde diese auf eine Membran geblottet und danach mit einer 28 S-Sonde zum Nachweis des Vorhandenseins der RNA und anschließend mit der Digoxigenen(DIG)-markierten Sonde gegen *c-kit* hybridisiert.

Abb.13 zeigt die Ergebnisse des Northern Blots.

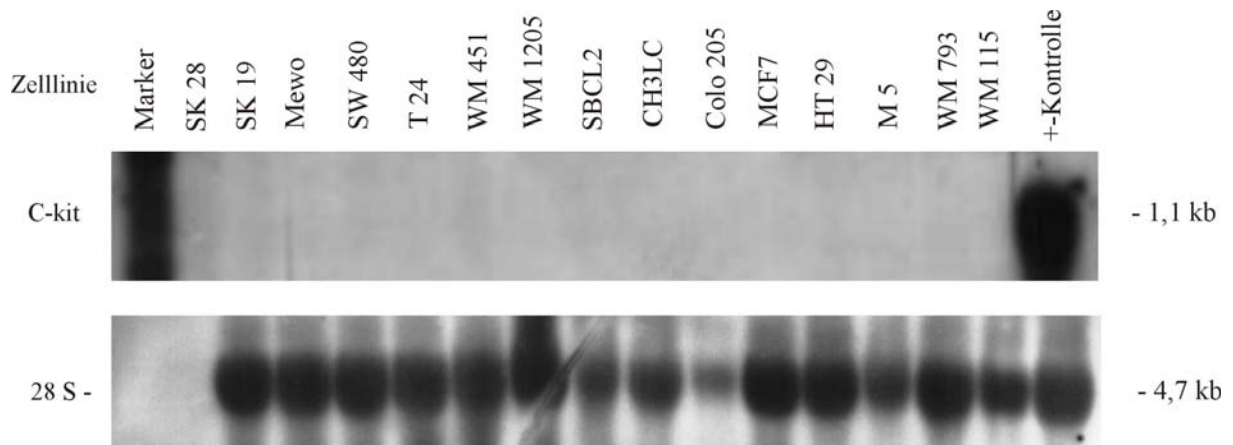


Abb.13 Ergebnisse des Northern Blot.

Bei der 28 S-Sonden-Hybridisierung zeigt sich zusätzlich zum RNA-Gel, daß die RNA von SK 28 degradiert ist. Die Qualität der übrigen RNA ist gut. Alle Zelllinien sind negativ für *c-kit*, lediglich bei der Positivkontrolle ist eine Bande zu sehen. Dies weist neben der 28 S-Sonden-Hybridisierung darauf hin, daß die Methode an sich funktioniert hat. Die übrigen Zelllinien scheinen *c-kit* auf RNA-Ebene nicht zu exprimieren. Melanozyten und Nävuszellen standen zum Zeitpunkt der Versuche leider nicht zur Verfügung.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das *c-kit*-Expressionsprofil einerseits auf Proteinebene durch FACS-Analyse und Western Blotting, andererseits auf RNA-Ebene durch PCR und Northern Blotting erstellt.

Durch die zellbiologische Methode der FACS-Analyse wurde gezeigt, daß der *c-kit*-Rezeptor lediglich in Melanozyten exprimiert wird, während in Nävus-, Melanom- sowie anderen Tumorzellen kein *c-kit* nachgewiesen werden konnte.

In der proteinchemischen Methode des Western Blots waren die Melanozyten ebenfalls positiv für *c-kit*, ebenso wie Nävuszellnävi. Dagegen waren alle Melanom- und Tumorzelllinien negativ für das *c-kit*-Protein.

In der Immunhistologie zeigte sich ein vergleichbares Bild. Hier waren die Melanozyten und die Nävuszellnester positiv für den *c-kit*-Rezeptor, ebenso wie die Talgdrüsen. Klar zu sehen war am Beispiel des superfiziell spreitenden Melanoms zusätzlich, daß einige Melanomzellen, die sich eher „oberflächlich“ an der Junktionszone befinden, positiv für *c-kit* waren. Stärker invasiv wachsende Melanomzellen der tieferen Schichten waren *c-kit*-negativ.

Ebenso negativ für den *c-kit*-Rezeptor waren das Lentigo Maligna Melanom sowie die Hautmetastase.

Mit Hilfe der PCR konnte das kürzere Teilfragment von *c-kit* mit einer Länge von ca. 1100 bp einmalig erfolgreich amplifiziert werden, alle weiteren PCR-Reaktionen zur Amplifikation von *c-kit* waren negativ.

Im Northern Blot waren alle Melanom- sowie Tumorzellen negativ für *c-kit*, Melanozyten und Nävuszellen standen zum Zeitpunkt der Versuche leider nicht zur Verfügung.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Expressionsprofil von *c-kit* erstellt. Die Expressionsanalyse von *c-kit* sollte aufzeigen, ob ein Zusammenhang zwischen der *c-kit*-Expression und der Melanomprogression besteht.

In der FACS-Analyse und im Western Blotting konnte eine *c-kit*-Expression in Melanozyten gefunden werden, im Western Blotting waren darüberhinaus auch Nävuszellnävi *c-kit*-positiv, wohingegen in beiden Methoden alle Melanom- und Tumorzelllinien *c-kit*-negativ waren. Dieses Ergebnis konnte in der Immunhistologie bestätigt werden. Hier konnte darüberhinaus bei einem superfiziell spreitenden Melanom gezeigt werden, daß einige oberflächliche Melanomzellen *c-kit*-positiv waren und die Expression mit fortschreitender Invasion der Tumorzellen nicht mehr nachweisbar war.

### 4.1 Die Rolle von *c-kit* bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms

Der *c-kit*-Rezeptor ist ein Proto-Onkogen aus der Familie der Wachstumsfaktoren mit transmembraner Tyrosinkinaseaktivität, zu denen auch die PDGF/CSF-1-Rezeptoren gehören (Yarden et al., 1987). *C-kit* spielt bei der Entwicklung, Differenzierung und Proliferation von embryonalen Melanoblasten zu Melanozyten eine entscheidende Rolle (Funasaka et al., 1992; Larue et al., 1992; Lassam und Bickford, 1992; Mayer und Green, 1968; MINTZ und RUSSELL, 1957; Natali et al., 1992).

In der vorliegenden Arbeit konnte über die FACS-Analyse und das Western Blotting eine *c-kit*-Expression in Melanozyten nachgewiesen werden und auch in der Immunhistologie waren insbesondere die Melanozyten entlang der Basalmembran positiv für den *c-kit*-Rezeptor. Lammie et al. (1994) beschrieben ebenfalls eine Färbung der basalen Melanozyten der Epidermis und Shen et al. (2003) fanden durch Tissue Arrays an melanozytären Läsionen in gesunder Haut eine *c-kit*-Expression in normalen Melanozyten und Mastzellen (Shen et al., 2003). Während ihrer Entstehung wandern die Melanozyten von der Neuralleiste in die Basalschicht der Epidermis und in die Haarfollikel (Luo et al., 2003). Neben dem *c-kit*-Rezeptor ist auch sein Ligand SCF an der Migration, dem Überleben und der Proliferation von Melanozyten beteiligt (Wehrle-Haller, 2003; Yoshida et al., 2001).

Mutationen von *c-kit* und seinem Liganden SCF resultieren im Piebaldismus (Geissler et al., 1988b; Spritz et al., 1993a; Spritz et al., 1993b) und führen zu Defekten in der Melanogenese, Gametogenese und Hämatopoese (Geissler et al., 1988b; Chabot et al., 1988b).

Eine *c-kit*-Expression zeigte sich in der vorliegenden Arbeit außer bei Melanozyten auch bei Nävuszellen. Die Färbung war in der Immunhistologie gleichmäßig in den Nävuszellnestern. Ohashi et al. (1996) beschrieben eine *c-kit*-Expression in gewöhnlichen Nävi und Montone et al. (1997) fanden in Compound-Nävi die stärkste *c-kit*-Expression in der Junctionszone sowie in der superfiziellen subdermalen Schicht (Ohashi et al., 1996b; Montone et al., 1997). Eine *c-kit*-Färbung bei Nävi konnten auch Shen et al. (2003) anhand von Tissue Arrays an melanozytären Läsionen bestätigen (Shen et al., 2003). Sie beschrieben 10 von 17 benignen Nävi und alle 18 untersuchten dysplastischen Nävi waren positiv für *c-kit*. Bei den benignen Nävi konnten sie, verglichen mit den subepidermalen Schichten, in tieferen Schichten der Nävi eine schwächere *c-kit*-Expression feststellen, wobei die Bedeutung dieses Befundes unklar ist. Auch Stefanou et al. (2004) zeigten an immunhistologischen *c-kit*-Färbungen eine *c-kit*-Expression bei Nävi, und zwar vorzugsweise in der Junctionszone (Stefanou et al., 2004). Entsprechend zeigten Takahashi et al. (1995) immunhistologisch eine *c-kit*-Expression in epidermalen Nävuszellen und eine SCF-Expression in dermalen Komponenten von Nävi (Takahashi et al., 1995).

Die in der vorliegenden Arbeit bei dem Gewebeschnitt des Nävus ebenfalls zu sehende Anfärbung der Talgdrüse ist in bisherigen Studien nicht beschrieben worden. Zwar haben Lammie et al. (1994) sowie Galli et al. (1993) eine *c-kit*-Expression in diversen Drüsengeweben, wie etwa in Epithelzellen der Brustdrüse, der Speicheldrüse, der Schweißdrüse sowie im Drüsengewebe der Speiseröhre beschrieben, auf die Expression in Talgdrüsen wird jedoch in diesen Arbeiten nicht eingegangen (Lammie et al., 1994; Galli et al., 1993b).

In der vorliegenden Arbeit ergab sich allerdings hinsichtlich der *c-kit*-Expression in Nävuszellen eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des Western Blottings und denen der FACS-Analyse. Während die Nävuszellen im Western Blotting positiv für *c-kit* waren, konnte mittels FACS-Analyse die Expression von *c-kit* in Nävuszellen nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, daß im Western Blotting und in der FACS-Analyse

unterschiedliche Nävuszellen verwendet wurden, die die beschriebenen Differenzen in der c-kit-Expression aufweisen könnten. Um diese Frage zu klären, müßte man weitere Expressionsuntersuchungen an einer größeren Anzahl an unterschiedlichen Nävuszellarten durchführen, um hier eventuelle Unterschiede in der Expression zu klären. Dies gestaltet sich jedoch insofern schwierig, als daß die Kultivierung von Nävuszellen nicht einfach ist und so ein limitierender Faktor für eine Untersuchung dieser Art wäre. Es wäre aber auch denkbar, daß die Nävuszellen, die bei der FACS-Analyse verwendet wurden, schon zu lange in Kultur gehalten worden waren und so zum Zeitpunkt der Untersuchungen eventuell nicht mehr optimal funktionsfähig gewesen sind.

Einen neuen Hinweis für die diagnostische Rolle von c-kit lieferten Herron et al. (2004) im Hinblick auf die Differenzierung zwischen benignen und malignen Proliferationen innerhalb von großen kongenitalen melanozytären Nävi (CMN) (Herron et al., 2004). Sie fanden bei einer Studie an Kindern mit großen CMN, daß 97% der untersuchten benignen proliferativen Knoten innerhalb von großen kongenitalen melanozytären Nävi c-kit exprimierten. Sie deuteten diese Expression als eine verspätete Melanozytenreifung in den proliferativen Knoten und als einen Hinweis auf ihre benigne Natur. So könnte c-kit diagnostischen Wert im Zusammenhang mit einer Proliferation innerhalb von CMN haben.

Der c-kit-Rezeptor und sein Ligand SCF spielen auch bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms eine Rolle. Die maligne Transformation von Melanozyten wird mit einer veränderten c-kit-Rezeptor-Expression assoziiert. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit eine Reihe von Melanom- sowie Melanommetastasenzelllinien auf die c-kit-Expression untersucht.

Bislang konnten diverse Studien zeigen, daß die Progression des malignen Melanoms mit dem Verlust der Expression des *c-kit*-Proto-Onkogens zusammenhängt (Gutman et al., 1994; Lassam und Bickford, 1992; Natali et al., 1992; Zakut et al., 1993b). Diese Studien haben aufgezeigt, daß die Expression der Tyrosinkinase c-kit während dem Tumorwachstum und der Invasion der Melanomzellen allmählich abnimmt. Bei der Mehrzahl an Melanomzelllinien sowie metastatischen Läsionen konnte keine Expression des c-kit-Rezeptors nachgewiesen werden (Lassam und Bickford, 1992; Natali et al., 1992; Zakut et al., 1993b).

In den Methoden des Western Blottings und des Northern Blottings waren in der vorliegenden Arbeit alle Melanomzelllinien negativ für *c-kit*, und zwar sowohl alle radial als auch vertikal wachsende Melanomzelllinien sowie alle metastatischen Zelllinien. In der PCR konnte durch die Amplifikation eines Teilfragmentes von *c-kit* in der Melanomzelllinie 'WM 3211', einer RGP-Melanomzelllinie, die Expression von *c-kit* nachgewiesen werden. Das Ergebnis der PCR ist jedoch mit Vorsicht zu genießen, da das Ergebnis nicht reproduziert werden konnte.

In der Immunhistologie an einem superfiziell spreitenden Melanom zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Färbung der Melanomzellen an der Invasionsfront im Bereich der Junctionszone, die auf eine Expression des *c-kit*-Rezeptors hindeutet. In den tieferen Schichten der Dermis hingegen war keine Färbung der Tumorzellen zu sehen, diese scheinen den *c-kit*-Rezeptor somit nicht mehr zu exprimieren.

Potti et al. (2003) konnten ebenfalls an immunhistologischen Färbungen von 202 Melanomen bei 22,8% der Melanome eine *c-kit*-Expression nachweisen, die hauptsächlich bei superfiziell spreitenden Melanomen zu finden war (Potti et al., 2003). Sie korrelierten die *c-kit*-Expression mit der Überlebenszeit der Patienten, fanden jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen *c-kit*-positiven und –negativen Patienten, so daß *c-kit* nicht von prognostischem Nutzen ist.

Auch Stefanou et al. (2004) konnten an immunhistologischen *c-kit*-Färbungen von verschiedenen Melanomen feststellen, daß bei radial wachsenden Melanomen die *c-kit*-Expression in stärkerem Ausmaß als bei vertikal wachsenden Melanomen ausfiel (Stefanou et al., 2004). Sie vermuteten auch, daß der *c-kit*-Expressionsverlust zur Melanomprogression beitragen könnte. Es wird desweiteren vermutet, daß der *c-kit*-Expressionsverlust in der Phase der Einwanderung der Melanomzellen in die Dermis auftritt (Ohashi et al., 1996b). Ebenso zeigten Woenckhaus et al. (2003) anhand der Immunhistologie einen mit der Melanomprogression korrelierenden Verlust der *c-kit*-Expression von Nävi über Primärmelanome bis hin zu Melanommetastasen (Woenckhaus et al., 2003). Dabei war der Expressionsverlust von *c-kit* verstärkt in den dermalen Komponenten aller Primärtumore zu beobachten.

Takahashi et al. (1995) fanden entsprechend eine *c-kit*-Expression in epidermalen Nävuszellen. *c-kit* wurde in keiner Melanomzelllinie exprimiert, was auch eine herunterregulierte Expression aufzeigte (Takahashi et al., 1995).



Etwas aus dem Rahmen fällt die Expressionsuntersuchung in melanozytären Läsionen mit Tissue Array von Shen et al. (2003). Sie fanden 95,7% c-kit-positive maligne Melanome und immerhin noch 32,2% c-kit-positive Metastasen mit mäßiger bis starker c-kit-Färbung (Shen et al., 2003). Dies sind recht hohe Expressionswerte, wobei die Färbeintensität bei den Metastasen im Vergleich zu der in den dysplastischen Nävi schwächer war. Trotz dieser Zahlen ist auch hier der Trend zum Expressionsverlust gegeben. Aber auch Guerriere-Kovach et al. (2004) konstatierten aufgrund ihrer immunhistologischen Untersuchungen an diversen Melanomen, daß die Primärmelanome c-kit-Antikörper-positiv waren, wohingegen auch hier alle Metastasen von Melanomen der Haut negativ für den c-kit-Rezeptor waren und sie auch hier wieder die herunterregulierte Expression bestätigten (Guerriere-Kovach et al., 2004).

Die genauen Regulationsmechanismen von c-kit und dessen Expressionsverlust sind allerdings noch unklar. Es wird von einem komplexen Zusammenspiel diverser Faktoren und Signalwege ausgegangen, die noch nicht vollständig verstanden sind.

c-kit ist zwar manchmal in Melanomen exprimiert (Hornick et al., 2002), allerdings besteht eine generelle Tendenz der c-kit-Herunterregulierung, die mit dem Verlust des Transkriptionsfaktors AP-2 assoziiert ist (Ohashi et al., 1996b; Hornick und Fletcher, 2002; Huang et al., 1998; Luca und Bar-Eli, 1998). Dafür spricht zum einen die Korrelation zwischen der Expression von c-kit und dem Transkriptionsfaktor AP-2, der an die *c-kit*-Promotorregion bindet. Studien ergaben, daß die *c-kit*-Expression durch AP-2 gesteuert wird und daß die AP-2-Expression das Fortschreiten des Tumorwachstums sowie das metastatische Potential in humanen Melanomzellen zu unterdrücken vermag (Huang et al., 1998).

Der mit der Melanomprogression korrelierende Expressionsverlust von *c-kit* und AP-2 wurde von Woenckhaus et al. (2003) in stärkstem Maße in den dermalen Schichten von Primärmelanomen gefunden (Woenckhaus et al., 2003). Zum anderen finden bei *c-kit* weder Deletionen noch Rearrangements statt, was ebenfalls darauf hindeutet, daß der Expressionsverlust höchstwahrscheinlich durch eine veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren zustande kommt (Huang et al., 1996b; Lassam und Bickford, 1992; Zakut et al., 1993b). Es ist bekannt, daß AP-2 außer *c-kit* auch MUC18, E-Cadherin, MMP-2 sowie p21

reguliert und beim Tumorwachstum und der Metastasierung eine Rolle spielt (Bar-Eli, 2001; Jean et al., 1998a). Desweiteren konnte festgestellt werden, daß bei c-kit-positiven Melanomzellen durch den c-kit-Liganden SCF Apoptose getriggert werden konnte. Der Verlust der c-kit-Rezeptorexpression in Melanomzellen führt wahrscheinlich dazu, daß sich die Melanomzellen der SCF/c-kit-vermittelten Apoptose entziehen. Dies könnte das Tumorwachstum und letztlich die Metastasierung erleichtern (Huang et al., 1996b). Ein Hinweis hierfür findet sich in der von Takahashi et al. (1995) durchgeführten immunhistologischen Studie, in welcher eine c-kit-Expression in epidermalen Nävuszellen und SCF-Expressionen in dermalen Komponenten von Nävi gezeigt wurde, wohingegen bei Melanomen in nur einer von fünf Melanomzelllinien SCF und in keiner Melanomzelllinie c-kit nachgewiesen werden konnten (Takahashi et al., 1995). Dieser Expressionsverlust der beiden Faktoren in Melanomzelllinien könnte möglicherweise zum Tumorwachstum beitragen.

Außer mit dem malignen Melanom werden SCF und c-kit auch mit hämatologischen und nicht-hämatologischen Neoplasien in Zusammenhang gebracht. Bei gastrointestinalen Tumoren (GIST) beispielsweise finden sich aktivierte Mutationen des c-kit-Rezeptors, die bei diesen Tumoren als therapeutische Zielstruktur in Betracht gezogen werden. Bei anderen Tumoren wiederum geht man davon aus, daß eine autokrine Produktion von SCF zu einer klonalen Expansion c-kit-exprimierender Zellen führt (Hirota et al., 1998; Nakahara et al., 1998; Nishida et al., 1998). Eine Koexpression von SCF und c-kit wurde beim Mammakarzinom, beim kleinzelligen Lungenkarzinom, bei gynäkologischen Tumoren sowie bei malignen Gliomen beobachtet (Hines et al., 1995b; Rygaard et al., 1993; Stanulla et al., 1995; Inoue et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den Pigmentzellen und diversen Melanomzelllinien auch eine Reihe anderer Tumorzelllinien auf die c-kit-Expression hin untersucht, wie etwa einige Kolonkarzinomzelllinien, ein Mammakarzinom, ein Blasenkarzinom, ein Retinoblastom sowie ein Pleuramesotheliom. Diese Tumorzelllinien zeigten sich in den gesamten angewandten Methoden negativ für c-kit. Eine c-kit-Expression konnte bislang unter den hier aufgeführten Tumoren lediglich im Mammakarzinom nachgewiesen werden, wo es jedoch nicht konstitutiv exprimiert wird, so daß man hier eventuell eine c-kit-Expression hätte erwarten können (Ulivi et al., 2004; Tsuura et al., 1994a).

#### 4.2 c-kit als mögliche molekulare Zielstruktur bei der Melanomtherapie?

Die c-kit-Tyrosinkinaseaktivität ist einerseits für die Transformation von *c-kit*, andererseits für die parakrinen und autokrinen Mechanismen entscheidend, die bei einer Reihe von Neoplasien zu beobachten sind. Daher wird die *c-kit*-Kinasedomäne als Zielstruktur zur Therapie von Malignomen in Betracht gezogen. Der Gedanke war, die Funktion der *c-kit*-Tyrosinkinase zu hemmen.

Hierzu wurde als einer der ersten c-kit-Rezeptor-Blocker 2-Phenyl-Aminopyrimidin-Derivat STI571, auch unter dem Namen Imatinib mesylate oder dem Handelsnamen Gleevec bekannt, entwickelt (Wang et al., 2000; Buchdunger et al., 2000; Heinrich et al., 2000; Krystal et al., 2000). Imatinib (STI571, Gleevec) ist ein kleines Molekül, welches ATP-Bindungsstellen an die Kinasedomänen der Tyrosinasen PDGFR, c-kit und Abl kompetitiv reversibel hemmt (Buchdunger et al., 2000). STI571 wurde ursprünglich für die Inhibition der ABL-Tyrosinkinase im BCR-ABL-Onkoprotein, dem Philadelphia-Chromosom bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML), konstruiert (Druker et al., 1996; Buchdunger et al., 1996). Es wurden bislang Phase I- und II-Studien an Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) durchgeführt. Bei der CML führt die Translokation des t(9,22)Philadelphia-Chromosoms durch die Fusion des Abl- und Bcr-Gens zu einer Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase. Die Behandlung mit Imatinib führte tatsächlich zur Inhibition der katalytischen Aktivität von Abl und induzierte bei einer Behandlungsdauer von drei bis sechs Monaten Remissionen. So war bei 50 – 70 % der Patienten kein Philadelphiachromosom mehr im Rückenmark nachweisbar, welches für die CML typisch ist (Shah und Sawyers, 2003).

Interessant zu erwähnen ist der von Raanani et al. (2002) gefundene Nebenbefund bei Gleevec-Studien im Rahmen der CML, wo es bei einem Patienten zu Depigmentierungserscheinungen an den Akren gekommen war, vermutlich durch die Hemmung des c-kit-Rezeptors und die daraus folgende Störung in der Melanozytenentwicklung (Raanani et al., 2002).

Es stellte sich im Verlauf diverser Studien heraus, daß STI571 neben BCR-ABL und ABL auch die c-kit-, PDGFR- $\beta$ - sowie ARG-Kinaseaktivität inhibiert (Buchdunger et al., 2002). Die Testung von STI571 auch an anderen Neoplasien lag nahe und es konnte festgestellt werden, daß STI571 auch beim kleinzelligen Lungenkarzinom zur Wachstumshemmung und c-kit-Inhibition führte (Wang et al., 2000; Krystal et al., 2000). Bislang existieren sehr limitierte Therapieoptionen für

das kleinzellige Lungenkarzinom, das zwischen 15 und 25% aller Lungenkarzinome ausmacht. c-kit wird in über 70% der kleinzelligen Lungenkarzinome überexprimiert (Sekido et al., 1991; Krystal et al., 1996). Daneben werden bei dieser Malignomart noch andere Rezeptortyrosinkinasen exprimiert, wie etwa c-Met (Rygaard et al., 1993; Maulik et al., 2002). Daher setzt man große Hoffnungen auf die Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren. In Studien an Zelllinien zeigte sich eine Dosis-abhängige Wachstumsinhibition durch STI571, die stark mit der c-kit-Expression korrelierte (Wang et al., 2000; Krystal et al., 2000). Bei einer Phase II-Studie an 19 Patienten mit Gleevec (600 mg) zeigte sich außer bei einem Patient durch eine Krankheitsstabilisierung über 90 Tage jedoch kein Ansprechen auf die Therapie. Bei dieser Studie konnte man jedoch durch immunhistologische Methoden auch nur bei 28% der Tumoren eine c-kit-Expression nachweisen, was den ausbleibenden Therapieerfolg möglicherweise erklären könnte (La Rosee et al., 2002). Untersuchungen mit Gleevec an Patienten mit c-kit-positiven kleinzelligen Lungenkarzinomen stehen also derzeit noch aus.

Neben Gleevec existieren inzwischen noch weitere c-kit-Tyrosinaseblocker: Indolinon-Tyrosinkinase-Inhibitoren blockierten die c-kit-Kinase und das SCF-abhängige Wachstum beim kleinzelligen Lungenkarzinom. Dabei zeigte sich die stärkste Wirkung von SU5416 und SU6597 bei der Zellwachstumshemmung (Krystal, 2001). SU5416 und SU6668 blockierten darüberhinaus auch die c-kit-Aktivierung sowie die c-kit-vermittelte Lebensfähigkeit der Blasten bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Smolich et al., 2001).

Inzwischen wurde STI571 auch bei anderen c-kit-positiven Neoplasien getestet, so etwa bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) (Tuveson et al., 2001; Joensuu et al., 2001). C-kit ist für die Entwicklung und Funktion der intestinalen Cajal-Zellen entscheidend, von denen sich höchstwahrscheinlich GIST-Zellen ableiten (Isozaki et al., 1995). Bei GISTs führen häufige c-kit-Mutationen zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase und nachfolgender Transformation (Hirota et al., 1998). Dies konnte durch die Wirkung von STI571 bei GIST-Patienten, bei denen konventionelle Therapien erfolglos blieben, bestätigt werden (Tuveson et al., 2001; Joensuu et al., 2001). Mehr als 80% der Patienten sprachen auf die STI571-Therapie an, jedoch war bei keinem Patienten eine Komplettremission zu

beobachten, während 14% resistent gegenüber der Therapie waren (Demetri et al., 2002). Die höchste Wirksamkeit wurde mit Imatinib bei GISTs mit Mutationen in Exon 9 und 11 des *c-kit*-Gens festgestellt. GISTs mit Expressionen des *c-kit*-Wildtyps zeigten nur schwache Wirkung (Heinrich et al., 2003). Interessanterweise zeigen 35% der GISTs mit einer *c-kit*-Wildtyp-Expression konstitutiv aktiviertes PDGFR $\alpha$  auf (Heinrich et al., 2003). Dies erklärt wahrscheinlich das Ansprechen dieser Kohorte auf Imatinib. Daten über die Langzeitwirkung der Imatinib-Therapie bei gastrointestinalen Stromatumoren liegen jedoch noch nicht vor.

Tyrosinkinaseinhibitoren wurden auch bei der Mastozytose getestet. Die Mastozytose ist durch eine ungewöhnliche Vermehrung von Mastzellen gekennzeichnet, die sich bei Erwachsenen zur Mastzell-Leukämie entwickelt (Middelkamp Hup et al., 2002; Tharp and Longley, Jr., 2001; Simpson and Metcalfe, 2002). Mastzellen exprimieren den *c-kit*-Rezeptor und werden unter anderem auch von SCF reguliert. Charakteristisch für die adulte Mastozytose sind Punktmutationen in der *c-kit*-Kinase (Nagata et al., 1995; Kanakura et al., 1994; Furitsu et al., 1993). Die meisten dieser Mutationen zeigten sich bislang resistent gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren, einige könnten in geringem Ausmaß auf die Kinase-Inhibitoren ansprechen (Ma et al., 2002).

Te Kronnie et al. (2004) untersuchten die Wirkung von Imatinib an *c-kit*-positiven neuroektodermalen Tumoren, darunter an Ewing-Sarkomen und Neuroblastomen (Te et al., 2004). Sie konnten zwar eine Zeit- und Dosis-abhängige Apoptose der Tumorzellen verzeichnen, jedoch schien dies nicht an *c-kit* als Zielstruktur zu liegen, denn die Zellen sprachen nach der Behandlung mit Imatinib immer noch auf die Stimulation mit dem *c-kit*-Liganden SCF an. Die Apoptose schien vielmehr auf einer Ansammlung an reaktiver Sauerstoffspezies zu beruhen. So hatte Imatinib zwar hemmende Effekte auf das Tumorwachstum, die *c-kit*-Signalkaskade scheint hierbei jedoch nicht die Zielstruktur zu sein.

Anders als beim malignen Melanom wird beim Uveamelanom eine hohe *c-kit*-Expression gefunden.

Studien belegten, daß *c-kit* sowohl bei der normalen als auch der pathologischen Proliferation uvealer Melanozyten durch SCF aktiviert ist (Mouriaux et al., 2001). Es wurde auch gezeigt, daß 75% der primären Uveamelanome *c-kit* exprimieren

und daß die Expression mit der mitotischen Rate korreliert. Diese Ergebnisse legen nahe, daß c-kit an der Transformation normaler Uvea-Melanozyten zu Tumorzellen beteiligt ist (Mouriaux et al., 2003). Dennoch ist bislang unklar, welche Rolle der SCF/c-kit-Signalweg tatsächlich spielt, denn Untersuchungen an einigen metastatischen Uveamelanomen mit Gleevec brachten sehr uneinheitliche Ergebnisse, was auf einen weitaus komplexeren molekularen Mechanismus als angenommen hinweist (Fiorentini et al., 2003).

Bislang ergaben Studien, daß die Aktivierung von c-kit, ob durch spezifische Mutationen oder autokrine Stimulationen, zu einer Aktivierung der ERK1/2- sowie der anti-apoptotischen Akt-Signalkaskade führt (Chian et al., 2001; Hemesath et al., 1998). Lefevre et al. (2004) konnten jedoch zeigen, daß es beim Uveamelanom durch die autokrine Stimulation von SCF/c-kit lediglich zur Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs kommt (Lefevre et al., 2004). Diese Aktivierung ist für die Proliferation, das Überleben und die Transformation von Uveamelanomzellen nötig und bestätigt die wichtige Rolle dieser Signalkaskade (Lennartsson et al., 1999). Die Unabhängigkeit der Uveamelanomzellen von der anti-apoptotischen Akt-Signalkaskade könnte entscheidend für das Überleben dieser Tumorzellen sein. Es wäre interessant, der Frage nachzugehen, inwiefern es bei der Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs Parallelen zwischen dem kutanen und dem Uveamelanom gibt. Bislang ergaben Untersuchungen von Kortylewski et al. (2001), daß zumindest einige der Zellzykluskomponenten übereinstimmen (Kortylewski et al., 2001).

Lefevre et al. (2004) konnten weiterhin zeigen, daß Gleevec neben konstitutiv aktivierten Mutationen von *c-kit* auch den Wildtyp von *c-kit* zu hemmen vermochte (Lefevre et al., 2004). Darüberhinaus sprachen jedoch auch c-kit-negative Zelllinien auf Gleevec an. Dies deutet darauf hin, daß beim Uveamelanom außer c-kit noch weitere Zielstrukturen von Gleevec existieren. Vermutlich handelt es sich hierbei, wie auch bei GISTs gefunden wurde, um PDGFR $\alpha$ -Mutationen (Pache et al., 2003).

Auch All-Ericsson et al. (2004) fanden hohe c-kit-Expressionen beim Uveamelanom, wobei sie keine Mutationen in Exon 9 oder 11 fanden, sondern durch die Anwesenheit von SCF eher autokrine/parakrine Stimulationsmechanismen vermuteten (All-Ericsson et al., 2004). Diese

Ergebnisse stärken die Annahme, daß c-kit im Rahmen der Uveamelanomtherapie mit STI571 eine Zielstruktur sein könnte.

Pache et al. (2003) führten eine Immunhistologie an diversen Uveamelanomen durch (Pache et al., 2003). Behandlungen mit einem c-kit-Antikörper ergaben schwache Färbungen bei 6% und starke Färbungen bei 69% der Melanome. Auch diese Ergebnisse lassen es sinnvoll erscheinen, den Nutzen einer Imatinib-Therapie bei Uveamelanompatienten weiter zu untersuchen.

Guerriere-Kovach et al. (2004) führten immunhistologische Untersuchungen an diversen primären und sekundären Melanomen durch (Guerriere-Kovach et al., 2004). Es zeigte sich bei 65% der sekundären Melanome eine positive c-kit-Färbung, jedoch ausschließlich, wenn der Primärtumor ein Uveamelanom war. Dies entspricht den Ergebnissen von Mouriaux et al. (2003), die eine c-kit-Expression in 75% der Uveamelanome fanden (Mouriaux et al., 2003). Die restlichen Melanometastasen waren negativ für c-kit, die primären Melanome zeigten allerdings regelmäßig eine c-kit-Färbung.

Die erfolgreichen Therpieversuche mit Imatinib in Studien führte dazu, daß Gleevec kürzlich von der „United States Food and Drug Administration“ für die Therapie von c-kit-positiven gastrointestinalen Stromatumoren und Philadelphia-Chromosom-positiven chronisch myeloischen Leukämien zugelassen wurde.

In Anbetracht dieser Ereignisse und der ersten Hinweise auf die Wirksamkeit beim Uveamelanom erschien es verlockend, die Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren auch bei der Therapie des malignen Melanoms zu testen.

Die Hoffnung wurde hier zum einen auf c-kit, zum anderen auf die PDGF-Rezeptoren als Zielstrukturen gesetzt. Der Gedanke war, durch die c-kit-Hemmung die MITF-Induktion und die nachfolgende Überexpression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2 zu unterdrücken und durch die PDGF-Rezeptoren-Hemmung die Angiogenese und damit die Tumorversorgung zu unterbinden.

Im Hinblick auf das maligne Melanom stellt sich allgemein zu Beginn die Frage, ob hier dieselbe Ausgangslage herrscht wie bei den anderen Tumorarten, bei denen Gleevec Erfolge gezeigt hat. Eine Voraussetzung wäre eine Expression der Tyrosinkinasen in den Melanomen, die als Zielstruktur von Tyrosinkinaseinhibitoren denkbar wären. Es scheint jedoch, als seien beim malignen Melanom andere Grundvoraussetzungen als bei GISTs und der CML

gegeben. Beim malignen Melanom spielen c-kit und sein Ligand SCF eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Differenzierung von gesunden Melanoblasten. Während der Melanomprogression, also dem Tumorwachstum, der Invasion und der Metastasierung wird die c-kit-Expression herunterreguliert. Tatsächlich ist bei der Mehrzahl an metastatischen humanen Melanomzelllinien keine c-kit-Expression mehr nachweisbar (Lassam und Bickford, 1992; Natali et al., 1992; Zakut et al., 1993b). Huang et al. (1996, 1998) konnten zeigen, daß die Überexpression von c-kit *in vivo* signifikant das Tumorwachstum zu hemmen vermag und daß die Behandlung c-kit-positiver Melanomzellen mit dem Liganden SCF zur Apoptose in diesen Zellen führte (Huang et al., 1996a; Huang et al., 1998). Dies führte zu der Frage, ob die Transformation von Melanozyten zu Melanomzellen mit Veränderungen in der c-kit-Expression zusammenhängt. Diverse Studien an anderen c-kit-positiven Tumoren haben gezeigt, daß Imatinib das Tumorwachstum hemmen kann (Krystal et al., 2000; Merchant et al., 2002; Vitali et al., 2003). Beim malignen Melanom jedoch weisen die bisherigen Daten darauf hin, daß der c-kit-Rezeptor hier eher protektiven Charakter besitzt. So liegt die Vermutung nahe, daß die Behandlung von Melanomen mit Imatinib umgekehrt zum Wachstum c-kit-positiver Melanomzellen führen könnte. Darüberhinaus könnte die Behandlung mit Imatinib auch in einer Selektion von aggressiveren c-kit-negativen Melanomzellen *in vivo* resultieren. Die funktionelle Inhibition von c-kit-positiven Melanomzellen könnte so das Tumorwachstum eher fördern als unterdrücken.

McGary et al. (2004) führten zur Klärung dieser Frage eine *in vivo*-Studie an Mäusen durch, in der sie die Wirkung von Imatinib auf PDGFR und c-kit exprimierende Melanome untersuchten (McGary et al., 2004). Sie konnten zeigen, daß Imatinib weder bei PDGFR- noch c-kit-positiven Melanomen einen Einfluß auf die Tumorgroße hatte, obwohl funktionelle Inhibitionen der Rezeptoren nachweisbar waren, die die ausreichende Dosis von Imatinib bestätigen konnten. Andererseits war Imatinib auch nicht in der Lage, bei c-kit-positiven Melanomen das Tumorwachstum zu fördern, wie zuvor befürchtet wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Transformation von Tumorzellen nicht allein von einem Molekül abhängt, sondern ein vielschichtiger Prozess ist, der sich über mehrere Stufen hinweg abspielt und an dem mehrere Signalkaskaden beteiligt sind.



Bislang konnten auch in Phase II-Studien zur Melanomtherapie mit Gleevec keine durchschlagenden Erfolge erzielt werden. Noch liegen keine Erkenntnisse vor, ob durch die Hemmung der PDGF-Rezeptoren die Angiogenese unterdrückt werden könnte, um die Melanomprogression zu verhindern.

Potti et al. (2003) sind der Auffassung, daß die Tatsache, daß c-kit-Expressionen bei immerhin 22,8% ihrer untersuchten Melanome zu finden waren, in zukünftigen klinischen Studien Aufschluß darüber geben wird, ob in der spezifischen Patientenkohorte mit c-kit-positiven Melanomen c-kit als Zielstruktur von therapeutischer Bedeutung sein könnte (Potti et al., 2003).

Auch Shen et al. (2003) vermuten, daß bei signifikanter Tyrosinkinase-Expression bei malignen Melanom Therapieerfolge mit STI571 erzielt werden könnten (Shen et al., 2003).

Kato et al. (2004) führten Studien am familiären Melanom durch und zeigten mit Antikörpern gegen c-kit an RET-Kinase-transfizierten Mäusen, daß c-kit eine Rolle bei der RET-abhängigen Melanomentwicklung spielt (Kato et al., 2004). Andererseits fanden sie bei benignen melanozytären Tumoren eine starke c-kit-Expression, die während der Progression zum Melanom abnahm. Kato et al. (2004) vermuten, daß einige Fälle von familiären Melanomen mit c-kit-spezifischen Antikörpern therapiert werden könnten (Kato et al., 2004). Frühere Studien von Reith et al. (1990) scheiterten bei dem Versuch, durch c-kit-Antikörper Therapieerfolge, allerdings bei nicht-hereditären Melanomen, zu erzielen (Reith et al., 1990).

### 4.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß tendentiell c-kit in Melanomen und in allen metastatischen Zelllinien herunterreguliert wird, in der Immunhistologie zeigte sich eindrücklich, daß es eine Korrelation zwischen dem Verlust der c-kit-Expression und dem Invasionspotential von Melanomzellen geben könnte. Huang et al. (1996) konnten zeigen, daß bei Anwesenheit des Liganden SCF in c-kit-positiven Melanomzellen Apoptose induziert wird, während dies bei Melanozyten nicht der Fall ist (Huang et al., 1996a; Scott et al., 1994).

Es ist aber auch bekannt, daß c-kit neben den apoptotischen Funktionen auch an anti-apoptotischen Signalwegen beteiligt ist, wie etwa an der Aktivierung des

MITF-Signalweges sowie der PI-3-Kinase-Kaskade, die beide am Zellüberleben mitwirken, wobei hier noch nicht geklärt ist, ob dies nur auf gesunde Zellen oder auch auf Tumorzellen zutrifft (Blume-Jensen et al., 1998; Hemesath et al., 1998; McGill et al., 2002).

Diese divergierenden Daten deuten darauf, daß es zwischen benignen und malignen Zellen Unterschiede hinsichtlich der Apoptoseinduktion gibt und verdeutlichen auch, daß die genaue Rolle des c-kit-Rezeptors bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms weiterhin nicht vollständig geklärt ist. Desweiteren ist bislang nicht bekannt, ob die c-kit-Expression beim Melanom und bei Nävi über dieselben oder über verschiedenen Signalwege stattfindet (Potti et al., 2004).

Bei mehreren Neoplasien wird die c-kit-Tyrosinkinase als potentielle therapeutische Zielstruktur in Betracht gezogen. Bei GISTs zeigte sich, daß es durch Gleevec zu lang anhaltenden Remissionen kommen kann. Jedoch ist bei dieser Art an Tumoren die *c-kit*-Mutation als einziges Onkogen denkbar, was das gute Ansprechen erklären würde. Studien mit Gleevec an CML-Patienten zeigten, daß diese Remissionen nur teilweise oder von kurzer Dauer sein können, in vielen Fällen bedingt durch eine Therapieresistenz. Bei dieser Tumorart könnte die Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität alleine nicht ausreichend sein, um eine Ausheilung zu erzielen, wobei Langzeitergebnisse bislang noch nicht vorliegen.

Aktivierte Mutationen von Genen, die für Zielstrukturen von Imatinib kodieren, sind ein Hinweis auf die Abhängigkeit einiger Neoplasien von Kinasen und erklären so auch das starke Ansprechen auf die Therapie mit ausschließlich einem Tyrosinkinaseinhibitor in einigen Studien (Arteaga und Baselga, 2004). Um Tyrosinkinaseinhibitoren gezielt und effektiv einzusetzen, wird es in zukünftigen Studien mit spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren vor allem auch wichtig sein, das geeignete Patientengut auszusuchen, die aktivierte Mutationen von Tyrosinkinasen als potentielle Zielstrukturen aufweisen. Darüberhinaus sind noch pharmakodynamische Studien hinsichtlich der zellulären und molekularen Veränderungen in den Geweben als Reaktion auf die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren notwendig, um die Therapien weiterhin zu optimieren (Arteaga und Baselga, 2004).

Die Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren beim Melanom bedarf noch weiterer Studien zur Klärung, welche Zielstrukturen hier eine Rolle spielen.

Die meisten der bislang entwickelten Tyrosinkinaseinhibitoren wirken spezifisch auf eine kleine Gruppe von Tyrosinkinasen. Sollte es gelingen, eine Anzahl an noch spezifischeren Inhibitoren zu konstruieren, könnte man mehrere dieser c-kit-Inhibitoren mit überlappenden Angriffspunkten synergistisch einsetzen. So würde eine effizientere Inhibition von *c-kit* möglich sein. Die Therapie mit mehreren Komponenten würde auch die Resistenzentwicklung entscheidend mindern (Sattler und Salgia, 2004).

Neben weiteren Erkenntnissen auf diesem Gebiet wird die Identifizierung weiterer durch c-kit aktivierter Signalwege möglicherweise alternative Zielstrukturen aufzeigen können. So könnte die Kombination aus einer gegen Onkogene und Signalwege gerichteten Therapie bei c-kit-vermittelten Neoplasien größere Wirkungen erzielen als die Therapie mit einzelnen Wirkstoffen (Sattler und Salgia, 2004).

Weitere Untersuchungen werden darüberhinaus Aufschluß darüber geben, ob die PDGF-Rezeptoren-Hemmung durch Gleevec die Angiogenese zu unterdrücken vermag und somit die Melanomprogression verhindern könnte.

Die verfügbaren Daten zeigen insgesamt, daß die Entstehung sowie die Progression des malignen Melanoms durch das komplexe Zusammenspiel vieler Faktoren und Signalwege gesteuert wird, die noch nicht ausreichend verstanden sind. Neue Einblicke in diese Mechanismen werden nötig sein, um Erfolge in der Melanomtherapie erzielen zu können. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet sind dringend erforderlich, denn die bislang verfügbaren Therapien konnten trotz allen Bemühungen beim Stadium IV-Melanom nur eine 10-Jahres-Überlebensrate von unter 1% erzielen.

## 5 Zusammenfassung

Der c-kit-Rezeptor spielt einerseits eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung einer ganzen Reihe von Zellen, unter anderem von Melanozyten, und ist an Signalkaskaden beteiligt, die zum Zellüberleben beitragen, andererseits ist er aber auch bei diversen Tumoren als Protoonkogen bekannt. Darüberhinaus reguliert c-kit jedoch auch Signaltransduktionswege, die bei Melanomzellen in Anwesenheit seines Liganden SCF zur Apoptose führen. Über seine Rolle bei der Entstehung sowie bei der Progression des malignen Melanoms liegen bislang noch ungenügende Daten vor und so zeigt sich letztlich ein recht uneinheitliches Bild über seine Funktion.

In bislang verfügbaren Arbeiten über c-kit wurde der Schwerpunkt größtenteils auf einzelne Funktionen von c-kit gelegt oder es wurde nur eine kleine Anzahl an unterschiedlichen Tumorzelllinien untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erstellung eines umfassenden Expressionsprofils von c-kit. Die c-kit-Expression wurde einerseits durch die Untersuchung einer Vielfalt an Zelllinien, die von Melanozyten über Nävi, RGP- und VGP-Melanome hinweg bis hin zu Melanommetastasen und einigen anderen Tumorzelllinien sowie Nativgeweben reichte, analysiert. Andererseits wurde die Expressionsuntersuchung der Zelllinien auf verschiedenen Expressionsstufen des Rezeptors, das heißt auf RNA-, DNA- und Proteinebene, durchgeführt. Hierzu wurden die Methoden des Northern Blottings, der PCR, des Western Blottings, der FACS-Analyse sowie der Immunhistologie angewandt.

Vor dem Hintergrund der bislang verfügbaren Daten sollte anhand dieser Zelllinien- und Methodenvielfalt untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der c-kit-Expression und der Progression des malignen Melanoms hergestellt werden kann. Von zentralem Interesse war hier die Frage, ob und zu welchem Zeitpunkt der Melanomprogression die Expression von c-kit verloren geht.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die zellbiologische Methode der FACS-Analyse in 82,84% der Melanozyten eine c-kit-Rezeptorexpression nachgewiesen werden, während die Nävuszellen, alle Melanom- sowie alle Tumorzellen negativ für c-kit waren.

Mit Hilfe der proteinchemischen Methode des Western Blots zeigten sich neben den Melanozyten zusätzlich Nävuszellen positiv für den Rezeptor, während die

Melanom- sowie die anderen Tumorzelllinien c-kit-negativ waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Expression des c-kit-Proteins schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Melanomprogression nicht mehr stattfindet.

In den immunhistologischen Untersuchungen an mehreren Nävi, superfiziell spreitenden Melanomen, einem Lentigo Maligna Melanom sowie einigen Hautmetastasen konnten die Ergebnisse des Western Blots bestätigt werden. Darüberhinaus zeigt sich anhand der Färbung eines superfiziell spreitenden Melanoms, daß die c-kit-Rezeptorexpression negativ mit dem Invasionspotential von Melanomzellen korreliert. Während hier eine deutliche Färbung der Tumorzellen an der Junktionszone auf eine c-kit-Expression hinweist, ist mit zunehmender Invasionstiefe des Melanoms jedoch eine abnehmende Anfärbung der Tumorzellen zu erkennen, in der tiefen Dermis geht die c-kit-Expression sogar gänzlich verloren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß durch den Expressionsverlust von c-kit die Invasionsfähigkeit der Melanomzellen ansteigt. Das Lentigo Maligna Melanom sowie die Färbung einer Melanomhautmetastase waren negativ für c-kit. Mit Hilfe der Methode der PCR konnte ein Teilfragment von c-kit einmalig erfolgreich amplifiziert werden, alle weiteren PCR-Reaktionen zur Amplifikation von c-kit waren negativ. Ebenso waren im Northern Blot alle Melanom- sowie Tumorzellen negativ für c-kit.

Insgesamt zeichnete sich über alle in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden hinweg die Tendenz ab, daß die Expression des c-kit-Rezeptors mit fortschreitender Progression des malignen Melanoms herunterreguliert wird.

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit lieferten Hinweise, daß dieser Expressionsverlust stattfindet, wenn die Tumorzellen ihr Invasionspotential in die Dermis erlangen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine negative Korrelation zwischen der Progression des malignen Melanoms und der c-kit-Rezeptor-Expression gefunden werden konnte.

## Reference List

- Alexander,W.S. and Nicola,N.A. (1998). Hemopoietic growth factor receptor abnormalities in leukemia. *Leuk. Res.* 22, 1097-1111.
- All-Ericsson,C., Girnita,L., Muller-Brunotte,A., Brodin,B., Seregard,S., Ostman,A., and Larsson,O. (2004). c-Kit-dependent growth of uveal melanoma cells: a potential therapeutic target? *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2075-2082.
- Armstrong,B.K. and Kricger,A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B* 63, 8-18.
- Arnaout,M.A., Goodman,S.L., and Xiong,J.P. (2002). Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 641-651.
- Arteaga,C.L. and Baselga,J. (2004). Tyrosine kinase inhibitors: why does the current process of clinical development not apply to them? *Cancer Cell* 5, 525-531.
- Ashman,L.K. (1999). The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 1037-1051.
- Bakker,T.R., Reed,D., Renno,T., and Jongeneel,C.V. (1999). Efficient adenoviral transfer of NF-kappaB inhibitor sensitizes melanoma to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Int. J. Cancer* 80, 320-323.
- Bale,S.J. and Dracopoli,N.C. (1989). Chromosome 9p and hereditary cutaneous malignant melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 70.
- Bale,S.J., Dracopoli,N.C., Tucker,M.A., Clark,W.H., Jr., Fraser,M.C., Stanger,B.Z., Green,P., Donis-Keller,H., Housman,D.E., and Greene,M.H. (1989). Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. *N. Engl. J. Med.* 320, 1367-1372.
- Bales,E.S., Dietrich,C., Bandyopadhyay,D., Schwahn,D.J., Xu,W., Didenko,V., Leiss,P., Conrad,N., Pereira-Smith,O., Orengo,I., and Medrano,E.E. (1999). High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. *J. Invest Dermatol.* 113, 1039-1046.
- Bar-Eli,M. (1997). Molecular mechanisms of melanoma metastasis. *J. Cell Physiol* 173, 275-278.
- Bar-Eli,M. (1999a). Role of AP-2 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 377-385.
- Bar-Eli,M. (1999b). Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* 67, 12-18.
- Bar-Eli,M. (2001). Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor. *Pigment Cell Res.* 14, 78-85.
- Barnhill,R.L., Xiao,M., Graves,D., and Antoniades,H.N. (1996). Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B and the PDGF-alpha receptor, but not the PDGF-beta receptor, in human malignant melanoma in vivo. *Br. J. Dermatol.* 135, 898-904.
- Bastian,B.C., LeBoit,P.E., and Pinkel,D. (2000). Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am. J. Pathol.* 157, 967-972.
- Bauer,J. and Garbe,C. (2003). Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res.* 16, 297-306.
- Bauer,J. and Garbe,C. (2004). Risk estimation for malignant transformation of melanocytic nevi. *Arch. Dermatol.* 140, 127.

- Bedogni,B., O'Neill,M.S., Welford,S.M., Bouley,D.M., Giaccia,A.J., Denko,N.C., and Powell,M.B. (2004). Topical treatment with inhibitors of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt and Raf/mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways reduces melanoma development in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* *64*, 2552-2560.
- Beere,H.M. (2001). Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Sci. STKE.* *2001*, RE1.
- Berking,C., Takemoto,R., Satyamoorthy,K., Elenitsas,R., and Herlyn,M. (2001a). Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin. *Am. J. Pathol.* *158*, 943-953.
- Berking,C., Takemoto,R., Satyamoorthy,K., Shirakawa,T., Eskandarpour,M., Hansson,J., VanBelle,P.A., Elder,D.E., and Herlyn,M. (2004). Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B. *Cancer Res.* *64*, 807-811.
- Berking,C., Takemoto,R., Schaidler,H., Showe,L., Satyamoorthy,K., Robbins,P., and Herlyn,M. (2001b). Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res.* *61*, 8306-8316.
- Bermont,L., Lamielle,F., Lorchel,F., Fauconnet,S., Esumi,H., Weisz,A., and Adessi,G.L. (2001a). Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 363-368.
- Bermont,L., Lamielle-Musard,F., Chezy,E., Weisz,A., and Adessi,G.L. (2001b). 17beta-estradiol inhibits forskolin-induced vascular endothelial growth factor promoter in MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *78*, 343-349.
- Bertolotto,C., Abbe,P., Hemesath,T.J., Bille,K., Fisher,D.E., Ortonne,J.P., and Ballotti,R. (1998). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* *142*, 827-835.
- Birkedal-Hansen,H., Moore,W.G., Bodden,M.K., Windsor,L.J., Birkedal-Hansen,B., DeCarlo,A., and Engler,J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* *4*, 197-250.
- Bissonnette,R.P., Echeverri,F., Mahboubi,A., and Green,D.R. (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* *359*, 552-554.
- Blechman,J.M., Lev,S., Brizzi,M.F., Leitner,O., Pegoraro,L., Givol,D., and Yarden,Y. (1993a). Soluble c-kit proteins and antireceptor monoclonal antibodies confine the binding site of the stem cell factor. *J. Biol. Chem.* *268*, 4399-4406.
- Blechman,J.M., Lev,S., Givol,D., and Yarden,Y. (1993b). Structure-function analyses of the kit receptor for the steel factor. *Stem Cells* *11 Suppl 2*, 12-21.
- Blood,C.H. and Zetter,B.R. (1990). Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* *1032*, 89-118.
- Blume-Jensen,P., Claesson-Welsh,L., Siegbahn,A., Zsebo,K.M., Westermark,B., and Heldin,C.H. (1991). Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J.* *10*, 4121-4128.
- Blume-Jensen,P., Janknecht,R., and Hunter,T. (1998). The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.* *8*, 779-782.
- Blume-Jensen,P., Jiang,G., Hyman,R., Lee,K.F., O'Gorman,S., and Hunter,T. (2000). Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat. Genet.* *24*, 157-162.

- Bohm, M., Moellmann, G., Cheng, E., Alvarez-Franco, M., Wagner, S., Sassone-Corsi, P., and Halaban, R. (1995). Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ.* 6, 291-302.
- Boissy, R.E. and Nordlund, J.J. (1997). Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. *Pigment Cell Res.* 10, 12-24.
- Boissy, R.E., Zhao, H., Oetting, W.S., Austin, L.M., Wildenberg, S.C., Boissy, Y.L., Zhao, Y., Sturm, R.A., Hearing, V.J., King, R.A., and Nordlund, J.J. (1996). Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as "OCA3". *Am. J. Hum. Genet.* 58, 1145-1156.
- Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682-4689.
- Bosher, J.M., Williams, T., and Hurst, H.C. (1995). The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 744-747.
- Bowen, M.A., Patel, D.D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A.R., Wang, W.C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J.M., Francke, U., and . (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J. Exp. Med.* 181, 2213-2220.
- Broome, P.M., Gause, P.R., Hyman, P., Gregus, J., Lluria-Prevatt, M., Nagle, R., and Bowden, G.T. (1999). Induction of melanoma in TPras transgenic mice. *Carcinogenesis* 20, 1747-1753.
- Brown, J.D. and Moon, R.T. (1998). Wnt signaling: why is everything so negative? *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 182-187.
- Buchdunger, E., Cioffi, C.L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B.J., and Lydon, N.B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 139-145.
- Buchdunger, E., O'Reilly, T., and Wood, J. (2002). Pharmacology of imatinib (STI571). *Eur. J. Cancer* 38 Suppl 5, S28-S36.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Druker, B.J., and Lydon, N.B. (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 56, 100-104.
- Buettner, R., Kannan, P., Imhof, A., Bauer, R., Yim, S.O., Glockshuber, R., Van Dyke, M.W., and Tainsky, M.A. (1993a). An alternatively spliced mRNA from the AP-2 gene encodes a negative regulator of transcriptional activation by AP-2. *Mol. Cell Biol.* 13, 4174-4185.
- Buettner, R., Kannan, P., Imhof, A., Bauer, R., Yim, S.O., Glockshuber, R., Van Dyke, M.W., and Tainsky, M.A. (1993b). An alternatively spliced mRNA from the AP-2 gene encodes a negative regulator of transcriptional activation by AP-2. *Mol. Cell Biol.* 13, 4174-4185.
- Burchill, S.A., Thody, A.J., and Ito, S. (1986). Melanocyte-stimulating hormone, tyrosinase activity and the regulation of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in the hair follicular melanocytes of the mouse. *J. Endocrinol.* 109, 15-21.
- Burchill, S.A., Virden, R., Fuller, B.B., and Thody, A.J. (1988). Regulation of tyrosinase synthesis by alpha-melanocyte-stimulating hormone in hair follicular melanocytes of the mouse. *J. Endocrinol.* 116, 17-23.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 487-525.
- Burridge, K., Nuckolls, G., Otey, C., Pavalko, F., Simon, K., and Turner, C. (1990). Actin-membrane interaction in focal adhesions. *Cell Differ. Dev.* 32, 337-342.



- Busca,R., Abbe,P., Mantoux,F., Aberdam,E., Peyssonnaud,C., Eychene,A., Ortonne,J.P., and Ballotti,R. (2000). Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J.* 19, 2900-2910.
- Busca,R. and Ballotti,R. (2000). Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 13, 60-69.
- Carrel,S., Hartmann,F., Salvi,S., Albrecht,H., Schreyer,M., and Rimoldi,D. (1995). Expression of type A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors on melanoma cells can be regulated by dbc-AMP and IFN gamma. *Int. J. Cancer* 62, 76-83.
- CRAWLEY,E.P., KRUSE,W.T., and PINKUS,H.K. (1952). Genetic aspects of malignant melanoma. *AMA. Arch. Derm. Syphilol.* 65, 440-450.
- Cerroni,L., Soyer,H.P., and Kerl,H. (1995). bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am. J. Dermatopathol.* 17, 7-11.
- Chabot,B., Stephenson,D.A., Chapman,V.M., Besmer,P., and Bernstein,A. (1988b). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88-89.
- Chabot,B., Stephenson,D.A., Chapman,V.M., Besmer,P., and Bernstein,A. (1988a). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88-89.
- Chawla-Sarkar,M., Leaman,D.W., and Borden,E.C. (2001). Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin. Cancer Res.* 7, 1821-1831.
- Chian,R., Young,S., Danilkovitch-Miagkova,A., Ronnstrand,L., Leonard,E., Ferrao,P., Ashman,L., and Linnekin,D. (2001). Phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the transformation of hematopoietic cells by the D816V c-Kit mutant. *Blood* 98, 1365-1373.
- Chin,L., Pomerantz,J., Polsky,D., Jacobson,M., Cohen,C., Cordon-Cardo,C., Horner,J.W., and DePinho,R.A. (1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev.* 11, 2822-2834.
- Chin,L., Tam,A., Pomerantz,J., Wong,M., Holash,J., Bardeesy,N., Shen,Q., O'Hagan,R., Pantginis,J., Zhou,H., Horner,J.W., Cordon-Cardo,C., Yancopoulos,G.D., and DePinho,R.A. (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400, 468-472.
- Chintamaneni,C.D., Halaban,R., Kobayashi,Y., Witkop,C.J., Jr., and Kwon,B.S. (1991). A single base insertion in the putative transmembrane domain of the tyrosinase gene as a cause for tyrosinase-negative oculocutaneous albinism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 5272-5276.
- Christofori,G. and Semb,H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24, 73-76.
- Claffey,K.P., Abrams,K., Shih,S.C., Brown,L.F., Mullen,A., and Keough,M. (2001). Fibroblast growth factor 2 activation of stromal cell vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Lab Invest* 81, 61-75.
- Claffey,K.P. and Robinson,G.S. (1996). Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 15, 165-176.
- Clark,W.H., Jr. (1991). Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 10, 83-88.
- Clark,W.H., Jr., Elder,D.E., Guerry,D., Epstein,M.N., Greene,M.H., and Van Horn,M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* 15, 1147-1165.

- Clark, W.H., Jr., Evans, H.L., Everett, M.A., Farmer, E.R., Graham, J.H., Mihm, M.C., Jr., Rosai, J., Sagebiel, R.W., and Wick, M.R. (1991). Early melanoma. Histologic terms. *Am. J. Dermatopathol.* *13*, 579-582.
- Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J.H., Shoji, M., Sexton, D.G., Cotsonis, G., Cerimele, F., Govindarajan, B., Macaron, N., and Arbiser, J.L. (2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin. Cancer Res.* *8*, 3728-3733.
- Collins, K.A. and White, W.L. (1995). Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and bcl-2 are differentially expressed in early evolving malignant melanoma. *Am. J. Dermatopathol.* *17*, 429-438.
- Costa, J.J., Demetri, G.D., Harrist, T.J., Dvorak, A.M., Hayes, D.F., Merica, E.A., Menchaca, D.M., Gringeri, A.J., Schwartz, L.B., and Galli, S.J. (1996). Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J. Exp. Med.* *183*, 2681-2686.
- Cowley, G.P. and Smith, M.E. (1996). Cadherin expression in melanocytic naevi and malignant melanomas. *J. Pathol.* *179*, 183-187.
- CRUICKSHANK, C.N. and HARCOURT, S.A. (1964). PIGMENT DONATION IN VITRO. *J. Invest Dermatol.* *42*, 183-184.
- Curran, S. and Murray, G.I. (1999). Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J. Pathol.* *189*, 300-308.
- Czajkowski, R., Placek, W., Drewa, G., Czajkowska, A., and Uchanska, G. (2004). FAMMM syndrome: pathogenesis and management. *Dermatol. Surg.* *30*, 291-296.
- Danielsen, T. and Rofstad, E.K. (1998). VEGF, bFGF and EGF in the angiogenesis of human melanoma xenografts. *Int. J. Cancer* *76*, 836-841.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., and Futreal, P.A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949-954.
- Degen, W.G., van Kempen, L.C., Gijzen, E.G., van Groningen, J.J., van Kooyk, Y., Bloemers, H.P., and Swart, G.W. (1998). MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am. J. Pathol.* *152*, 805-813.
- Demetri, G.D., von Mehren, M., Blanke, C.D., Van den Abbeele, A.D., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Heinrich, M.C., Tuveson, D.A., Singer, S., Janicek, M., Fletcher, J.A., Silverman, S.G., Silberman, S.L., Capdeville, R., Kiese, B., Peng, B., Dimitrijevic, S., Druker, B.J., Corless, C., Fletcher, C.D., and Joensuu, H. (2002). Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.* *347*, 472-480.
- Demetrick, D.J., Zhang, H., and Beach, D.H. (1994). Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4, and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet. Cell Genet.* *66*, 72-74.
- Demunter, A., Stas, M., Degreef, H., Wolf-Peeters, C., and van den Oord, J.J. (2001). Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J. Invest Dermatol.* *117*, 1483-1489.
- Descheemaeker, K.A., Wyns, S., Nelles, L., Auwerx, J., Ny, T., and Collen, D. (1992). Interaction of AP-1-, AP-2-, and Sp1-like proteins with two distinct sites in the upstream regulatory region of the

- plasminogen activator inhibitor-1 gene mediates the phorbol 12-myristate 13-acetate response. *J. Biol. Chem.* 267, 15086-15091.
- Detmar, M. (2000). The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J. Dermatol. Sci. 24 Suppl 1*, S78-S84.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499-3511.
- Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2, 561-566.
- Dummer, W., Bastian, B.C., Ernst, N., Schanzle, C., Schwaaf, A., and Brocker, E.B. (1996). Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. *Int. J. Cancer* 66, 607-610.
- Dummer, W., Becker, J.C., Schwaaf, A., Leverkus, M., Moll, T., and Brocker, E.B. (1995). Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res.* 5, 67-68.
- Durham-Pierre, D., Gardner, J.M., Nakatsu, Y., King, R.A., Francke, U., Ching, A., Aquaron, R., del, M., V, and Brilliant, M.H. (1994). African origin of an intragenic deletion of the human P gene in tyrosinase positive oculocutaneous albinism. *Nat. Genet.* 7, 176-179.
- Eberle, J., Weitmann, S., Thieck, O., Pech, H., Paul, M., and Orfanos, C.E. (1999). Downregulation of endothelin B receptor in human melanoma cell lines parallel to differentiation genes. *J. Invest Dermatol.* 112, 925-932.
- Elder, D.E., Clark, W.H., Jr., Elenitsas, R., Guerry, D., and Halpern, A.C. (1993). The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. *Semin. Diagn. Pathol.* 10, 18-35.
- Epstein, D.J., Vekemans, M., and Gros, P. (1991). Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* 67, 767-774.
- Esteve, J. (1993). Background mortality in clinical survival studies. *Lancet* 341, 1416-1417.
- Fears, T.R., Bird, C.C., Guerry, D., Sagebiel, R.W., Gail, M.H., Elder, D.E., Halpern, A., Holly, E.A., Hartge, P., and Tucker, M.A. (2002). Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk. *Cancer Res.* 62, 3992-3996.
- Felding-Habermann, B., Fransvea, E., O'Toole, T.E., Manzuk, L., Faha, B., and Hensler, M. (2002). Involvement of tumor cell integrin  $\alpha$ v  $\beta$ 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 19, 427-436.
- Ferrara, N. (2000). Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 55, 15-35.
- Fidler, I.J., Kumar, R., Bielenberg, D.R., and Ellis, L.M. (1998). Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis. *Cancer J. Sci. Am.* 4 Suppl 1, S58-S66.
- Fiorentini, G., Rossi, S., Lanzanova, G., Bernardeschi, P., Dentico, P., and De Giorgi, U. (2003). Potential use of imatinib mesylate in ocular melanoma and liposarcoma expressing immunohistochemical c-KIT (CD117). *Ann. Oncol.* 14, 805.
- Fitzpatrick, T.B., MIYAMOTO, M., and Ishikawa, K. (1967). The evolution of concepts of melanin biology. *Arch. Dermatol.* 96, 305-323.

- Flaxman,B.A., Sosis,A.C., and Van Scott,E.J. (1973). Changes in melanosome distribution in Caucasoid skin following topical application of nitrogen mustard. *J. Invest Dermatol.* 60, 321-326.
- Fleishman,R.A. (1996). Engraftment of W/c-kit mutant mice is determined by stem cell competition, not by increased marrow 'space'. *Exp. Hematol.* 24, 209-213.
- Fogel,M., Gutwein,P., Mechttersheimer,S., Riedle,S., Stoeck,A., Smirnov,A., Edler,L., Ben Arie,A., Huszar,M., and Altevoigt,P. (2003). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362, 869-875.
- Franco,A.V., Zhang,X.D., Van Berkel,E., Sanders,J.E., Zhang,X.Y., Thomas,W.D., Nguyen,T., and Hersey,P. (2001). The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J. Immunol.* 166, 5337-5345.
- Frisch,S.M. and Morisaki,J.H. (1990). Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol. Cell Biol.* 10, 6524-6532.
- Funasaka,Y., Boulton,T., Cobb,M., Yarden,Y., Fan,B., Lyman,S.D., Williams,D.E., Anderson,D.M., Zakut,R., Mishima,Y., and . (1992). c-Kit-kinase induces a cascade of protein tyrosine phosphorylation in normal human melanocytes in response to mast cell growth factor and stimulates mitogen-activated protein kinase but is down-regulated in melanomas. *Mol. Biol. Cell* 3, 197-209.
- Furitsu,T., Tsujimura,T., Tono,T., Ikeda,H., Kitayama,H., Koshimizu,U., Sugahara,H., Butterfield,J.H., Ashman,L.K., Kanayama,Y., and . (1993). Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J. Clin. Invest* 92, 1736-1744.
- Galli,S.J., Tsai,M., and Wershil,B.K. (1993a). The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am. J. Pathol.* 142, 965-974.
- Galli,S.J., Tsai,M., and Wershil,B.K. (1993b). The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am. J. Pathol.* 142, 965-974.
- Garbe,C., Thiess,S., Nurnberger,F., Ehlers,G., Albrecht,G., Lindlar,F., and Bertz,J. (1991). Incidence and mortality of malignant melanoma in Berlin (West) from 1980 to 1986. *Acta Derm. Venereol.* 71, 506-511.
- Gately,S. (2000). The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 19, 19-27.
- Gee,J.M., Robertson,J.F., Ellis,I.O., Nicholson,R.I., and Hurst,H.C. (1999). Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *J. Pathol.* 189, 514-520.
- Geissler,E.N., Ryan,M.A., and Housman,D.E. (1988a). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55, 185-192.
- Geissler,E.N., Ryan,M.A., and Housman,D.E. (1988b). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55, 185-192.
- Gershenwald,J.E., Sumner,W., Calderone,T., Wang,Z., Huang,S., and Bar-Eli,M. (2001). Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumor growth in vivo. *Oncogene* 20, 3363-3375.
- Giebel,L.B. and Spritz,R.A. (1991b). Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 8696-8699.
- Giebel,L.B. and Spritz,R.A. (1991a). Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 8696-8699.

Giebel,L.B., Strunk,K.M., King,R.A., Hanifin,J.M., and Spritz,R.A. (1990). A frequent tyrosinase gene mutation in classic, tyrosinase-negative (type IA) oculocutaneous albinism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 3255-3258.

Gilbertson,R.J., Perry,R.H., Kelly,P.J., Pearson,A.D., and Lunec,J. (1997). Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res.* 57, 3272-3280.

Gille,J., Swerlick,R.A., and Caughman,S.W. (1997). Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J.* 16, 750-759.

Gitay-Goren,H., Halaban,R., and Neufeld,G. (1993). Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 702-708.

Goding,C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* 14, 1712-1728.

Goldgeier,M.H., Klein,L.E., Klein-Angerer,S., Moellmann,G., and Nordlund,J.J. (1984). The distribution of melanocytes in the leptomeninges of the human brain. *J. Invest Dermatol.* 82, 235-238.

Gottschalk,A.R., Boise,L.H., Thompson,C.B., and Quintans,J. (1994). Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention by bcl-x but not bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 7350-7354.

Goulding,M.D., Chalepakis,G., Deutsch,U., Erselius,J.R., and Gruss,P. (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* 10, 1135-1147.

Grabbe,J., Welker,P., Dippel,E., and Czarnetzki,B.M. (1994). Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 287, 78-84.

Greene,M.H. (1985). The dysplastic nevus syndrome. 1985 status report. *Am. J. Dermatopathol.* 7 *Suppl.*, 117-121.

Greene,M.H. (1999). The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. *Cancer* 86, 2464-2477.

Greene,M.H., Clark,W.H., Jr., Tucker,M.A., Elder,D.E., Kraemer,K.H., Guerry,D., Witmer,W.K., Thompson,J., Matozzo,I., and Fraser,M.C. (1985). Acquired precursors of cutaneous malignant melanoma. The familial dysplastic nevus syndrome. *N. Engl. J. Med.* 312, 91-97.

Grichnik,J.M., Crawford,J., Jimenez,F., Kurtzberg,J., Buchanan,M., Blackwell,S., Clark,R.E., and Hitchcock,M.G. (1995). Human recombinant stem-cell factor induces melanocytic hyperplasia in susceptible patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 33, 577-583.

Griffith,T.S., Chin,W.A., Jackson,G.C., Lynch,D.H., and Kubin,M.Z. (1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.* 161, 2833-2840.

Gross,A., McDonnell,J.M., and Korsmeyer,S.J. (1999b). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911.

Gross,A., McDonnell,J.M., and Korsmeyer,S.J. (1999a). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911.

Grugel,S., Finkenzeller,G., Weindel,K., Barleon,B., and Marme,D. (1995). Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 270, 25915-25919.

Guerriere-Kovach,P.M., Hunt,E.L., Patterson,J.W., Glembocki,D.J., English,J.C., III, and Wick,M.R. (2004). Primary melanoma of the skin and cutaneous melanomatous metastases: comparative histologic features and immunophenotypes. *Am. J. Clin. Pathol.* 122, 70-77.

Gumbiner,B.M. and Yamada,K.M. (1995). Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 615-618.

Guo,C.S., Wehrle-Haller,B., Rossi,J., and Ciment,G. (1997). Autocrine regulation of neural crest cell development by steel factor. *Dev. Biol.* 184, 61-69.

Gutman,M., Even-Sapir,E., Merimsky,O., Trejo,L., Klausner,J.M., and Lev-Chelouche,D. (2002). The role of interleukin-8 in the initiation and progression of human cutaneous melanoma. *Anticancer Res.* 22, 3395-3398.

Gutman,M., Singh,R.K., Radinsky,R., and Bar-Eli,M. (1994). Intertumoral heterogeneity of receptor-tyrosine kinases expression in human melanoma cell lines with different metastatic capabilities. *Anticancer Res.* 14, 1759-1765.

Halaban,R. and Moellmann,G. (1990). Murine and human b locus pigmentation genes encode a glycoprotein (gp75) with catalase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 4809-4813.

Hamann,K., Grabbe,J., Welker,P., Haas,N., Algermissen,B., and Czarnetzki,B.M. (1994). Phenotypic evaluation of cultured human mast and basophilic cells and of normal human skin mast cells. *Arch. Dermatol. Res.* 286, 380-385.

Heinrich,M.C., Corless,C.L., Demetri,G.D., Blanke,C.D., von Mehren,M., Joensuu,H., McGreevey,L.S., Chen,C.J., Van den Abbeele,A.D., Druker,B.J., Kiese,B., Eisenberg,B., Roberts,P.J., Singer,S., Fletcher,C.D., Silberman,S., Dimitrijevic,S., and Fletcher,J.A. (2003). Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin. Oncol.* 21, 4342-4349.

Heinrich,M.C., Griffith,D.J., Druker,B.J., Wait,C.L., Ott,K.A., and Zigler,A.J. (2000). Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 96, 925-932.

Hemesath,T.J., Price,E.R., Takemoto,C., Badalian,T., and Fisher,D.E. (1998). MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 391, 298-301.

Hemler,M.E., Elices,M.J., Chan,B.M., Zetter,B., Matsuura,N., and Takada,Y. (1990). Multiple ligand binding functions for VLA-2 (alpha 2 beta 1) and VLA-3 (alpha 3 beta 1) in the integrin family. *Cell Differ. Dev.* 32, 229-238.

Henriet,P., Blavier,L., and Declerck,Y.A. (1999). Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* 107, 111-119.

Henry,H., Thomas,A., Shen,Y., and White,E. (2002). Regulation of the mitochondrial checkpoint in p53-mediated apoptosis confers resistance to cell death. *Oncogene* 21, 748-760.

Herlyn,M., Berking,C., Li,G., and Satyamoorthy,K. (2000). Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res.* 10, 303-312.

Herlyn,M., Clark,W.H., Rodeck,U., Mancianti,M.L., Jambrosic,J., and Koprowski,H. (1987a). Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 56, 461-474.

Herlyn,M., Rodeck,U., Mancianti,M., Cardillo,F.M., Lang,A., Ross,A.H., Jambrosic,J., and Koprowski,H. (1987b). Expression of melanoma-associated antigens in rapidly dividing human melanocytes in culture. *Cancer Res.* 47, 3057-3061.

- Herron, M.D., Vanderhooft, S.L., Smock, K., Zhou, H., Leachman, S.A., and Coffin, C. (2004). Proliferative nodules in congenital melanocytic nevi: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 1017-1025.
- Hines, S.J., Organ, C., Kornstein, M.J., and Krystal, G.W. (1995a). Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ.* 6, 769-779.
- Hines, S.J., Organ, C., Kornstein, M.J., and Krystal, G.W. (1995b). Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ.* 6, 769-779.
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad, T.G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., and Kitamura, Y. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279, 577-580.
- Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404.
- Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Van Kraats, A.A., Ruiter, D.J., and Van Muijen, G.N. (2000). Expression of integrin alpha(v)beta(3) correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* 87, 12-19.
- Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Waas, E.T., Zendman, A.J., Cornelissen, I.M., Ruiter, D.J., and Van Muijen, G.N. (1999). Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br. J. Cancer* 81, 774-782.
- Hori, Y., Toda, K., Pathak, M.A., Clark, W.H., Jr., and Fitzpatrick, T.B. (1968). A fine-structure study of the human epidermal melanosome complex and its acid phosphatase activity. *J. Ultrastruct. Res.* 25, 109-120.
- Hornick, J.L. and Fletcher, C.D. (2002). Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *Am. J. Clin. Pathol.* 117, 188-193.
- Hortsch, M. (1996). The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17, 587-593.
- Hosoda, K., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Baynash, A.G., Cheung, J.C., Giaid, A., and Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79, 1267-1276.
- Hsu, M.Y., Meier, F.E., Nesbit, M., Hsu, J.Y., Van Belle, P., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2000). E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am. J. Pathol.* 156, 1515-1525.
- Hsu, M.Y., Shih, D.T., Meier, F.E., Van Belle, P., Hsu, J.Y., Elder, D.E., Buck, C.A., and Herlyn, M. (1998). Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *Am. J. Pathol.* 153, 1435-1442.
- Huang, J., Asawa, T., Takato, T., and Sakai, R. (2003). Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *J. Biol. Chem.* 278, 48367-48376.
- Huang, S., Jean, D., Luca, M., Tainsky, M.A., and Bar-Eli, M. (1998). Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J.* 17, 4358-4369.
- Huang, S., Luca, M., Gutman, M., McConkey, D.J., Langley, K.E., Lyman, S.D., and Bar-Eli, M. (1996a). Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible

to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene* 13, 2339-2347.

Huang,S., Luca,M., Gutman,M., McConkey,D.J., Langley,K.E., Lyman,S.D., and Bar-Eli,M. (1996b). Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene* 13, 2339-2347.

Huizinga,J.D., Thuneberg,L., Kluppel,M., Malysz,J., Mikkelsen,H.B., and Bernstein,A. (1995). W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373, 347-349.

Hussein,M.R., Haemel,A.K., and Wood,G.S. (2003). Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J. Pathol.* 199, 275-288.

Hyder,S.M., Huang,J.C., Nawaz,Z., Boettger-Tong,H., Makela,S., Chiappetta,C., and Stancel,G.M. (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl 5, 785-790.

Hynes,R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

Imagawa,M., Chiu,R., and Karin,M. (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51, 251-260.

Imokawa,G., Kobayasi,T., and Miyagishi,M. (2000). Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 33321-33328.

Inoue,A., Yanagisawa,M., Kimura,S., Kasuya,Y., Miyauchi,T., Goto,K., and Masaki,T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 2863-2867.

Inoue,M., Kyo,S., Fujita,M., Enomoto,T., and Kondoh,G. (1994). Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. *Cancer Res.* 54, 3049-3053.

Isozaki,K., Hirota,S., Nakama,A., Miyagawa,J., Shinomura,Y., Xu,Z., Nomura,S., and Kitamura,Y. (1995). Disturbed intestinal movement, bile reflux to the stomach, and deficiency of c-kit-expressing cells in Ws/Ws mutant rats. *Gastroenterology* 109, 456-464.

Jacobson,M.D., Burne,J.F., King,M.P., Miyashita,T., Reed,J.C., and Raff,M.C. (1993). Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361, 365-369.

Janji,B., Melchior,C., Gouon,V., Vallar,L., and Kieffer,N. (1999). Autocrine TGF-beta-regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int. J. Cancer* 83, 255-262.

Jawhari,A.U., Farthing,M.J., and Pignatelli,M. (1999). The E-cadherin/epidermal growth factor receptor interaction: a hypothesis of reciprocal and reversible control of intercellular adhesion and cell proliferation. *J. Pathol.* 187, 155-157.

Jean,D. and Bar-Eli,M. (2000). Regulation of tumor growth and metastasis of human melanoma by the CREB transcription factor family. *Mol. Cell Biochem.* 212, 19-28.

Jean,D., Gershenwald,J.E., Huang,S., Luca,M., Hudson,M.J., Tainsky,M.A., and Bar-Eli,M. (1998b). Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 16501-16508.

Jean,D., Gershenwald,J.E., Huang,S., Luca,M., Hudson,M.J., Tainsky,M.A., and Bar-Eli,M. (1998a). Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 16501-16508.



- Jean,D., Harbison,M., McConkey,D.J., Ronai,Z., and Bar-Eli,M. (1998c). CREB and its associated proteins act as survival factors for human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 24884-24890.
- Jemal,A., Devesa,S.S., Hartge,P., and Tucker,M.A. (2001). Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 678-683.
- Jiang,H., Lin,J., Su,Z.Z., Herlyn,M., Kerbel,R.S., Weissman,B.E., Welch,D.R., and Fisher,P.B. (1995). The melanoma differentiation-associated gene mda-6, which encodes the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, is differentially expressed during growth, differentiation and progression in human melanoma cells. *Oncogene* 10, 1855-1864.
- Jimbow,K., Lee,S.K., King,M.G., Hara,H., Chen,H., Dakour,J., and Marusyk,H. (1993). Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *J. Invest Dermatol.* 100, 259S-268S.
- Jimbow,K., Quevedo,W.C., Jr., Fitzpatrick,T.B., and Szabo,G. (1976). Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J. Invest Dermatol.* 67, 72-89.
- Jimbow,K., Takahashi,M., Sato,S., and Kukita,A. (1971). Ultrastructural and cytochemical studies of melanogenesis in melanocytes of normal human hair matrix. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* 20, 87-92.
- Joensuu,H., Roberts,P.J., Sarlomo-Rikala,M., Andersson,L.C., Tervahartiala,P., Tuveson,D., Silberman,S., Capdeville,R., Dimitrijevic,S., Druker,B., and Demetri,G.D. (2001). Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N. Engl. J. Med.* 344, 1052-1056.
- Johnson,J.P. (1992). Cell adhesion molecules in neoplastic disease. *Int. J. Clin. Lab Res.* 22, 69-72.
- Johnson,J.P., Lehmann,J.M., Stade,B.G., Rothbacher,U., Sers,C., and Riethmuller,G. (1989). Functional aspects of three molecules associated with metastasis development in human malignant melanoma. *Invasion Metastasis* 9, 338-350.
- Johnson,J.P., Rothbacher,U., and Sers,C. (1993). The progression associated antigen MUC18: a unique member of the immunoglobulin supergene family. *Melanoma Res.* 3, 337-340.
- Kahari,V.M. and Saarialho-Kere,U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6, 199-213.
- Kanakura,Y., Furitsu,T., Tsujimura,T., Butterfield,J.H., Ashman,L.K., Ikeda,H., Kitayama,H., Kanayama,Y., Matsuzawa,Y., and Kitamura,Y. (1994). Activating mutations of the c-kit proto-oncogene in a human mast cell leukemia cell line. *Leukemia* 8 *Suppl* 1, S18-S22.
- Karelina,T.V., Bannikov,G.A., and Eisen,A.Z. (2000). Basement membrane zone remodeling during appendageal development in human fetal skin. The absence of type VII collagen is associated with gelatinase-A (MMP2) activity. *J. Invest Dermatol.* 114, 371-375.
- Karjalainen,J.M., Kellokoski,J.K., Eskelinen,M.J., Alhava,E.M., and Kosma,V.M. (1998). Downregulation of transcription factor AP-2 predicts poor survival in stage I cutaneous malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 16, 3584-3591.
- Karlen,S. and Braathen,L.R. (1999). Regulation of the melanoma cell adhesion molecule gene in melanoma: modulation of mRNA synthesis by cyclic adenosine monophosphate, phorbol ester, and stem cell factor/c-kit signaling. *J. Invest Dermatol.* 113, 711-719.
- Katayama,M., Iwamatsu,A., Masutani,H., Furuke,K., Takeda,K., Wada,H., Masuda,T., and Ishii,K. (1997). Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct. Funct.* 22, 511-516.

- Kato,M., Takeda,K., Kawamoto,Y., Tsuzuki,T., Hossain,K., Tamakoshi,A., Kunisada,T., Kambayashi,Y., Ogino,K., Suzuki,H., Takahashi,M., and Nakashima,I. (2004). c-Kit-targeting immunotherapy for hereditary melanoma in a mouse model. *Cancer Res.* 64, 801-806.
- Kemler,R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9, 317-321.
- Kennedy,C., ter Huurne,J., Berkhout,M., Gruis,N., Bastiaens,M., Bergman,W., Willemze,R., and Bavinck,J.N. (2001b). Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J. Invest Dermatol.* 117, 294-300.
- Kennedy,C., ter Huurne,J., Berkhout,M., Gruis,N., Bastiaens,M., Bergman,W., Willemze,R., and Bavinck,J.N. (2001a). Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J. Invest Dermatol.* 117, 294-300.
- Kieser,A., Weich,H.A., Brandner,G., Marme,D., and Kolch,W. (1994). Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 9, 963-969.
- Kikuchi,K., Nakagawa,H., Kadono,T., Etoh,T., Byers,H.R., Mihm,M.C., and Tamaki,K. (1996). Decreased ET(B) receptor expression in human metastatic melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 734-739.
- Kim,S.G., Ravi,G., Hoffmann,C., Jung,Y.J., Kim,M., Chen,A., and Jacobson,K.A. (2002). p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, CI-IB-MECA. *Biochem. Pharmacol.* 63, 871-880.
- Kindblom,L.G., Remotti,H.E., Aldenborg,F., and Meis-Kindblom,J.M. (1998). Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am. J. Pathol.* 152, 1259-1269.
- Kitamura,Y., Hirota,S., and Nishida,T. (1998). Molecular pathology of c-kit proto-oncogene and development of gastrointestinal stromal tumors. *Ann. Chir Gynaecol.* 87, 282-286.
- Klaus,S.N. (1969). Post-transfer digestion of melanosome complexes and saltatory movement of melanin granules within mammalian epidermal cells. *J. Invest Dermatol.* 53, 440-444.
- Kobayashi,M., Miura,M., Asou,H., and Uyemura,K. (1991). Molecular cloning of cell adhesion molecule L1 from human nervous tissue: a comparison of the primary sequences of L1 molecules of different origin. *Biochim. Biophys. Acta* 1090, 238-240.
- Korinek,V., Barker,N., Morin,P.J., van Wichen,D., de Weger,R., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., and Clevers,H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787.
- Kortylewski,M., Heinrich,P.C., Kauffmann,M.E., Bohm,M., MacKiewicz,A., and Behrmann,I. (2001). Mitogen-activated protein kinases control p27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells. *Biochem. J.* 357, 297-303.
- Kowitz,A., Kadmon,G., Eckert,M., Schirmacher,V., Schachner,M., and Altevogt,P. (1992). Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur. J. Immunol.* 22, 1199-1205.
- Krystal,G.W. (2001). Mechanisms of resistance to imatinib (STI571) and prospects for combination with conventional chemotherapeutic agents. *Drug Resist. Updat.* 4, 16-21.
- Krystal,G.W., Hines,S.J., and Organ,C.P. (1996). Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res.* 56, 370-376.

- Krystal,G.W., Honsawek,S., Litz,J., and Buchdunger,E. (2000). The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin. Cancer Res.* 6, 3319-3326.
- Kujat,R., Miragall,F., Krause,D., Dermietzel,R., and Wrobel,K.H. (1995). Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in non-proliferating epithelial cells of the male urogenital tract. *Histochem. Cell Biol.* 103, 311-321.
- La Rosee,P., Johnson,K., O'Dwyer,M.E., and Druker,B.J. (2002). In vitro studies of the combination of imatinib mesylate (Gleevec) and arsenic trioxide (Trisenox) in chronic myelogenous leukemia. *Exp. Hematol.* 30, 729-737.
- Lahav,R., Dupin,E., Lecoin,L., Glavieux,C., Champeval,D., Ziller,C., and Le Douarin,N.M. (1998). Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14214-14219.
- Lahav,R., Lecoin,L., Ziller,C., Nataf,V., Carnahan,J.F., Martin,F.H., and Le Douarin,N.M. (1994). Effect of the Steel gene product on melanogenesis in avian neural crest cell cultures. *Differentiation* 58, 133-139.
- Lammie,A., Drobnjak,M., Gerald,W., Saad,A., Cote,R., and Cordon-Cardo,C. (1994). Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1417-1425.
- Landuzzi,L., De Giovanni,C., Nicoletti,G., Rossi,I., Ricci,C., Astolfi,A., Scopece,L., Scotlandi,K., Serra,M., Bagnara,G.P., Nanni,P., and Lollini,P.L. (2000). The metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *Am. J. Pathol.* 157, 2123-2131.
- Larson,R.S. and Springer,T.A. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114, 181-217.
- Larue,L., Dougherty,N., Porter,S., and MINTZ,B. (1992). Spontaneous malignant transformation of melanocytes explanted from Wf/Wf mice with a Kit kinase-domain mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 7816-7820.
- Lassam,N. and Bickford,S. (1992). Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene* 7, 51-56.
- Lee,J.M. (1998). Inhibition of p53-dependent apoptosis by the KIT tyrosine kinase: regulation of mitochondrial permeability transition and reactive oxygen species generation. *Oncogene* 17, 1653-1662.
- Lee,S.W., Ko,Y.G., Bang,S., Kim,K.S., and Kim,S. (2000). Death effector domain of a mammalian apoptosis mediator, FADD, induces bacterial cell death. *Mol. Microbiol.* 35, 1540-1549.
- Lefevre,G., Glotin,A.L., Calipel,A., Mouriaux,F., Tran,T., Kherrouche,Z., Maurage,C.A., Auclair,C., and Mascarelli,F. (2004). Roles of stem cell factor/c-Kit and effects of Glivec/STI571 in human uveal melanoma cell tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 31769-31779.
- Lemmon,M.A., Pinchasi,D., Zhou,M., Lax,I., and Schlessinger,J. (1997). Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J. Biol. Chem.* 272, 6311-6317.
- Lennartsson,J., Blume-Jensen,P., Hermanson,M., Ponten,E., Carlberg,M., and Ronnstrand,L. (1999). Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* 18, 5546-5553.
- Lev,S., Blechman,J., Nishikawa,S., Givol,D., and Yarden,Y. (1993). Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor. *Mol. Cell Biol.* 13, 2224-2234.
- Lev,S., Givol,D., and Yarden,Y. (1992a). Interkinase domain of kit contains the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 678-682.

- Lev, S., Yarden, Y., and Givol, D. (1992b). A recombinant ectodomain of the receptor for the stem cell factor (SCF) retains ligand-induced receptor dimerization and antagonizes SCF-stimulated cellular responses. *J. Biol. Chem.* *267*, 10866-10873.
- Lev, S., Yarden, Y., and Givol, D. (1992c). Dimerization and activation of the kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor. *J. Biol. Chem.* *267*, 15970-15977.
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S., and Ahn, N.G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* *74*, 49-139.
- Li, G. and Herlyn, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today* *6*, 163-169.
- Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* *61*, 3819-3825.
- Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2002). Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* *13*, 62-70.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479-489.
- Loetscher, H., Steinmetz, M., and Lesslauer, W. (1991). Tumor necrosis factor: receptors and inhibitors. *Cancer Cells* *3*, 221-226.
- Longley, B.J., Tyrrell, L., Ma, Y., Williams, D.A., Halaban, R., Langley, K., Lu, H.S., and Schechter, N.M. (1997). Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 9017-9021.
- Lopansri, S. and Mihm, M.C., Jr. (1979). Clinical and pathological correlation of malignant melanoma. *J. Cutan. Pathol.* *6*, 180-194.
- Luca, M., Hunt, B., Bucana, C.D., Johnson, J.P., Fidler, I.J., and Bar-Eli, M. (1993). Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells. *Melanoma Res.* *3*, 35-41.
- Luca, M.R. and Bar-Eli, M. (1998). Molecular changes in human melanoma metastasis. *Histol. Histopathol.* *13*, 1225-1231.
- Lucky, P.A. and Nordlund, J.J. (1985). The biology of the pigmentary system and its disorders. *Dermatol. Clin.* *3*, 197-216.
- Luo, D., Chen, H., Searles, G., and Jimbow, K. (1995). Coordinated mRNA expression of c-Kit with tyrosinase and TRP-1 in melanin pigmentation of normal and malignant human melanocytes and transient activation of tyrosinase by Kit/SCF-R. *Melanoma Res.* *5*, 303-309.
- Luo, R., Gao, J., Wehrle-Haller, B., and Henion, P.D. (2003). Molecular identification of distinct neurogenic and melanogenic neural crest sublineages. *Development* *130*, 321-330.
- Luscher, B., Mitchell, P.J., Williams, T., and Tjian, R. (1989a). Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev.* *3*, 1507-1517.
- Luscher, B., Mitchell, P.J., Williams, T., and Tjian, R. (1989b). Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev.* *3*, 1507-1517.
- Ma, Y., Zeng, S., Metcalfe, D.D., Akin, C., Dimitrijevic, S., Butterfield, J.H., McMahon, G., and Longley, B.J. (2002). The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood* *99*, 1741-1744.

- Maity,A., Pore,N., Lee,J., Solomon,D., and O'Rourke,D.M. (2000). Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res.* 60, 5879-5886.
- Majumdar,M.K., Feng,L., Medlock,E., Toksoz,D., and Williams,D.A. (1994). Identification and mutation of primary and secondary proteolytic cleavage sites in murine stem cell factor cDNA yields biologically active, cell-associated protein. *J. Biol. Chem.* 269, 1237-1242.
- Majumder,S., Brown,K., Qiu,F.H., and Besmer,P. (1988). c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Mol. Cell Biol.* 8, 4896-4903.
- Mansson-Brahme,E., Johansson,H., Larsson,O., Rutqvist,L.E., and Ringborg,U. (2002). Trends in incidence of cutaneous malignant melanoma in a Swedish population 1976-1994. *Acta Oncol.* 41, 138-146.
- Mao,L., Merlo,A., Bedi,G., Shapiro,G.I., Edwards,C.D., Rollins,B.J., and Sidransky,D. (1995). A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res.* 55, 2995-2997.
- Maragoudakis,M.E., Tsopanoglou,N.E., Andriopoulou,P., and Maragoudakis,M.M. (2000). Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression. *Matrix Biol.* 19, 345-351.
- Mareel,M., Boterberg,T., Noe,V., Van Hoorde,L., Vermeulen,S., Bruyneel,E., and Bracke,M. (1997). E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *J. Cell Physiol* 173, 271-274.
- Marrett,L.D., Nguyen,H.L., and Armstrong,B.K. (2001). Trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma in New South Wales, 1983-1996. *Int. J. Cancer* 92, 457-462.
- Martins,L.M., Iaccarino,I., Tenev,T., Gschmeissner,S., Totty,N.F., Lemoine,N.R., Savopoulos,J., Gray,C.W., Creasy,C.L., Dingwall,C., and Downward,J. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J. Biol. Chem.* 277, 439-444.
- Maulik,G., Madhiwala,P., Brooks,S., Ma,P.C., Kijima,T., Tibaldi,E.V., Schaefer,E., Parmar,K., and Salgia,R. (2002). Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. *J. Cell Mol. Med.* 6, 539-553.
- Mayer,T.C. and Green,M.C. (1968). An experimental analysis of the pigment defect caused by mutations at the W and S1 loci in mice. *Dev. Biol.* 18, 62-75.
- McGary,E.C., Lev,D.C., and Bar-Eli,M. (2002). Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol. Ther.* 1, 459-465.
- McGary,E.C., Onn,A., Mills,L., Heimberger,A., Eton,O., Thomas,G.W., Shtivelband,M., and Bar-Eli,M. (2004). Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor receptor phosphorylation of melanoma cells but does not affect tumorigenicity in vivo. *J. Invest Dermatol.* 122, 400-405.
- McGill,G.G., Horstmann,M., Widlund,H.R., Du,J., Motyckova,G., Nishimura,E.K., Lin,Y.L., Ramaswamy,S., Avery,W., Ding,H.F., Jordan,S.A., Jackson,I.J., Korsmeyer,S.J., Golub,T.R., and Fisher,D.E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 109, 707-718.
- Mecchia,M., Matarrese,P., Malorni,W., D'Agostino,G., Sestili,P., Santini,S.M., Gauzzi,M.C., Venditti,M., Mazzocchi,A., Parmiani,G., Belardelli,F., and Ferrantini,M. (2000). Type I consensus interferon (CIFN) gene transfer into human melanoma cells up-regulates p53 and enhances cisplatin-induced apoptosis: implications for new therapeutic strategies with IFN-alpha. *Gene Ther.* 7, 167-179.
- Meier,F., Caroli,U., Satyamoorthy,K., Schitteck,B., Bauer,J., Berking,C., Moller,H., Maczey,E., Rassner,G., Herlyn,M., and Garbe,C. (2003). Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or beta3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma. *Exp. Dermatol.* 12, 296-306.

- Meier,F., Nesbit,M., Hsu,M.Y., Martin,B., Van Belle,P., Elder,D.E., Schaumburg-Lever,G., Garbe,C., Walz,T.M., Donatien,P., Crombleholme,T.M., and Herlyn,M. (2000). Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF. *Am. J. Pathol.* 156, 193-200.
- Meier,F., Will,S., Ellwanger,U., Schlagenhauff,B., Schittek,B., Rassner,G., and Garbe,C. (2002). Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br. J. Dermatol.* 147, 62-70.
- Merchant,M.S., Woo,C.W., Mackall,C.L., and Thiele,C.J. (2002). Potential use of imatinib in Ewing's Sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1673-1679.
- Middelkamp Hup,M.A., Heide,R., Tank,B., Mulder,P.G., and Oranje,A.P. (2002). Comparison of mastocytosis with onset in children and adults. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 16, 115-120.
- Miettinen,M., Sobin,L.H., and Sarlomo-Rikala,M. (2000). Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod. Pathol.* 13, 1134-1142.
- Mills,L., Tellez,C., Huang,S., Baker,C., McCarty,M., Green,L., Gudas,J.M., Feng,X., and Bar-Eli,M. (2002). Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res.* 62, 5106-5114.
- MINTZ,B. and RUSSELL,E.S. (1957). Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J. Exp. Zool.* 134, 207-237.
- Mitchell,P.J., Timmons,P.M., Hebert,J.M., Rigby,P.W., and Tjian,R. (1991). Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5, 105-119.
- Miura,N. and Suda,T. (1992). [Stem cell factor/c-kit interaction in primordial germ cell, melanoblast and hematopoietic progenitors]. *Gan To Kagaku Ryoho* 19, 1777-1785.
- MIYAMOTO,M. and Fitzpatrick,T.B. (1957). On the nature of the pigment in retinal pigment epithelium. *Science* 126, 449-450.
- Mohler,T., Scheibenbogen,C., Hafele,J., Willhauck,M., and Keilholz,U. (1996). Regulation of interleukin-8 mRNA expression and protein secretion in a melanoma cell line by tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Melanoma Res.* 6, 307-311.
- Montone,K.T., Van Belle,P., Elenitsas,R., and Elder,D.E. (1997). Proto-oncogene c-kit expression in malignant melanoma: protein loss with tumor progression. *Mod. Pathol.* 10, 939-944.
- Morin,P.J., Sparks,A.B., Korinek,V., Barker,N., Clevers,H., Vogelstein,B., and Kinzler,K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.
- Mouriaux,F., Chahud,F., Maurage,C.A., Malecaze,F., and Labalette,P. (2001). Implication of stem cell factor in the proliferation of choroidal melanocytes. *Exp. Eye Res.* 73, 151-157.
- Mouriaux,F., Kherrouche,Z., Maurage,C.A., Demailly,F.X., Labalette,P., and Saule,S. (2003). Expression of the c-kit receptor in choroidal melanomas. *Melanoma Res.* 13, 161-166.
- Mueller,M.D., Vigne,J.L., Minchenko,A., Lebovic,D.I., Leitman,D.C., and Taylor,R.N. (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10972-10977.
- Murphy,G., Stanton,H., Cowell,S., Butler,G., Knauper,V., Atkinson,S., and Gavrilovic,J. (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 107, 38-44.
- Nagata,H., Worobec,A.S., Oh,C.K., Chowdhury,B.A., Tannenbaum,S., Suzuki,Y., and Metcalfe,D.D. (1995). Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene

c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10560-10564.

Nakahara,M., Isozaki,K., Hirota,S., Miyagawa,J., Hase-Sawada,N., Taniguchi,M., Nishida,T., Kanayama,S., Kitamura,Y., Shinomura,Y., and Matsuzawa,Y. (1998). A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 115, 1090-1095.

Natali,P.G., Nicotra,M.R., Digiesi,G., Cavaliere,R., Bigotti,A., Trizio,D., and Segatto,O. (1994). Expression of gp185HER-2 in human cutaneous melanoma: implications for experimental immunotherapeutics. *Int. J. Cancer* 56, 341-346.

Natali,P.G., Nicotra,M.R., Winkler,A.B., Cavaliere,R., Bigotti,A., and Ullrich,A. (1992). Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *Int. J. Cancer* 52, 197-201.

Nelson,W.J. and Nusse,R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487.

Nesbit,M., Nesbit,H.K., Bennett,J., Andl,T., Hsu,M.Y., Dejesus,E., McBrien,M., Gupta,A.R., Eck,S.L., and Herlyn,M. (1999). Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene* 18, 6469-6476.

Neufeld,G., Cohen,T., Gengrinovitch,S., and Poltorak,Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9-22.

NIGOGOSYAN,G., DELAPAVA,S., and PICKREN,J.W. (1964). MELANOBLASTS IN VAGINAL MUCOSA. ORIGIN FOR PRIMARY MALIGNANT MELANOMA. *Cancer* 17, 912-913.

Nishida,T., Hirota,S., Taniguchi,M., Hashimoto,K., Isozaki,K., Nakamura,H., Kanakura,Y., Tanaka,T., Takabayashi,A., Matsuda,H., and Kitamura,Y. (1998). Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat. Genet.* 19, 323-324.

Niu,G., Bowman,T., Huang,M., Shivers,S., Reintgen,D., Daud,A., Chang,A., Kraker,A., Jove,R., and Yu,H. (2002). Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21, 7001-7010.

Nocka,K., Majumder,S., Chabot,B., Ray,P., Cervone,M., Bernstein,A., and Besmer,P. (1989). Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev.* 3, 816-826.

Nolte,C., Moos,M., and Schachner,M. (1999). Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in epithelia of rodents. *Cell Tissue Res.* 298, 261-273.

Noonan,F.P., Dudek,J., Merlino,G., and De Fabo,E.C. (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.

Nordlund,J.J., Abdel-Malek,Z.A., Boissy,R.E., and Rheins,L.A. (1989). Pigment cell biology: an historical review. *J. Invest Dermatol.* 92, 53S-60S.

Nyormoi,O. and Bar-Eli,M. (2003b). Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma. *Clin. Exp. Metastasis* 20, 251-263.

Nyormoi,O. and Bar-Eli,M. (2003a). Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma. *Clin. Exp. Metastasis* 20, 251-263.

Ogretmen,B. and Safa,A.R. (1996). Down-regulation of apoptosis-related bcl-2 but not bcl-xL or bax proteins in multidrug-resistant MCF-7/Adr human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 67, 608-614.

- Ohashi,A., Funasaka,Y., Ueda,M., and Ichihashi,M. (1996b). c-KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanotic naevi. *Melanoma Res.* 6, 25-30.
- Ohashi,A., Funasaka,Y., Ueda,M., and Ichihashi,M. (1996a). c-KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanotic naevi. *Melanoma Res.* 6, 25-30.
- Okazawa,M., Shiraki,T., Ninomiya,H., Kobayashi,S., and Masaki,T. (1998). Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 12584-12592.
- Ono,H., Kawa,Y., Asano,M., Ito,M., Takano,A., Kubota,Y., Matsumoto,J., and Mizoguchi,M. (1998). Development of melanocyte progenitors in murine Steel mutant neural crest explants cultured with stem cell factor, endothelin-3, or TPA. *Pigment Cell Res.* 11, 291-298.
- Orfanos,C.E., Jung,E.G., Rassner,G., Wolff,H.H., and Garbe,C. (1994). [Position and recommendations of the Malignant Melanoma Committee of the German Society of Dermatology on diagnosis, treatment and after-care of malignant melanoma of the skin. *Status 1993/94*]. *Hautarzt* 45, 285-291.
- Pache,M., Glatz,K., Bosch,D., Dirnhofer,S., Mirlacher,M., Simon,R., Schraml,P., Ruffe,A., Flammer,J., Sauter,G., and Meyer,P. (2003). Sequence analysis and high-throughput immunohistochemical profiling of KIT (CD 117) expression in uveal melanoma using tissue microarrays. *Virchows Arch.* 443, 741-744.
- Palmer,J.S., Duffy,D.L., Box,N.F., Aitken,J.F., O'Gorman,L.E., Green,A.C., Hayward,N.K., Martin,N.G., and Sturm,R.A. (2000a). Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* 66, 176-186.
- Palmer,J.S., Duffy,D.L., Box,N.F., Aitken,J.F., O'Gorman,L.E., Green,A.C., Hayward,N.K., Martin,N.G., and Sturm,R.A. (2000b). Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* 66, 176-186.
- Pancook,J.D., Reisfeld,R.A., Varki,N., Vitiello,A., Fox,R.I., and Montgomery,A.M. (1997). Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J. Immunol.* 158, 4413-4421.
- Papp,T., Pemsel,H., Zimmermann,R., Bastrop,R., Weiss,D.G., and Schiffmann,D. (1999). Mutational analysis of the N-ras, p53, p16INK4a, CDK4, and MC1R genes in human congenital melanocytic naevi. *J. Med. Genet.* 36, 610-614.
- Pearson,G., Robinson,F., Beers,G.T., Xu,B.E., Karandikar,M., Berman,K., and Cobb,M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153-183.
- Philo,J.S., Wen,J., Wypych,J., Schwartz,M.G., Mendiaz,E.A., and Langley,K.E. (1996). Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor, Kit. *J. Biol. Chem.* 271, 6895-6902.
- Pickl,W.F., Majdic,O., Fischer,G.F., Petzelbauer,P., Fae,I., Waclavicek,M., Stockl,J., Scheinecker,C., Vidicki,T., Aschauer,H., Johnson,J.P., and Knapp,W. (1997). MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 158, 2107-2115.
- Pollock,P.M., Harper,U.L., Hansen,K.S., Yudt,L.M., Stark,M., Robbins,C.M., Moses,T.Y., Hostetter,G., Wagner,U., Kakareka,J., Salem,G., Pohida,T., Heenan,P., Duray,P., Kallioniemi,O., Hayward,N.K., Trent,J.M., and Meltzer,P.S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* 33, 19-20.
- Polsky,D. and Cordon-Cardo,C. (2003). Oncogenes in melanoma. *Oncogene* 22, 3087-3091.



- Potti,A., Hille,R.C., and Koch,M. (2003). Immunohistochemical determination of HER-2/neu overexpression in malignant melanoma reveals no prognostic value, while c-Kit (CD117) overexpression exhibits potential therapeutic implications. *J. Carcinog.* 2, 8.
- Potti,A., Moazzam,N., Langness,E., Sholes,K., Tendulkar,K., Koch,M., and Kargas,S. (2004). Immunohistochemical determination of HER-2/neu, c-Kit (CD117), and vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in malignant melanoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130, 80-86.
- Pugazhenthil,S., Miller,E., Sable,C., Young,P., Heidenreich,K.A., Boxer,L.M., and Reusch,J.E. (1999). Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274, 27529-27535.
- Pugazhenthil,S., Nesterova,A., Sable,C., Heidenreich,K.A., Boxer,L.M., Heasley,L.E., and Reusch,J.E. (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275, 10761-10766.
- Qin,H., Sun,Y., and Benveniste,E.N. (1999). The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J. Biol. Chem.* 274, 29130-29137.
- Qiu,F.H., Ray,P., Brown,K., Barker,P.E., Jhanwar,S., Ruddle,F.H., and Besmer,P. (1988). Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J.* 7, 1003-1011.
- Raanani,P., Goldman,J.M., and Ben Bassat,I. (2002). Challenges in oncology. Case 3. Depigmentation in a chronic myeloid leukemia patient treated with STI-571. *J. Clin. Oncol.* 20, 869-870.
- Raisova,M., Bektas,M., Wieder,T., Daniel,P., Eberle,J., Orfanos,C.E., and Geilen,C.C. (2000). Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett.* 473, 27-32.
- Ramenghi,U., Ruggieri,L., Dianzani,I., Rosso,C., Brizzi,M.F., Camaschella,C., Pietsch,T., and Saglio,G. (1994). Human peripheral blood granulocytes and myeloid leukemic cell lines express both transcripts encoding for stem cell factor. *Stem Cells* 12, 521-526.
- Ramsay,J.A., From,L., and Kahn,H.J. (1995). bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin. *Mod. Pathol.* 8, 150-154.
- Raza,S.L. and Cornelius,L.A. (2000). Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 47-54.
- Redondo,P., Bandres,E., Solano,T., Okroujnov,I., and Garcia-Foncillas,J. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and melanoma. N-acetylcysteine downregulates VEGF production in vitro. *Cytokine* 12, 374-378.
- Reed,J.A., McNutt,N.S., and Albino,A.P. (1994). Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression. *Am. J. Pathol.* 144, 329-336.
- Reed,J.C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236.
- Reith,A.D., Rottapel,R., Giddens,E., Brady,C., Forrester,L., and Bernstein,A. (1990). W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. *Genes Dev.* 4, 390-400.
- Reynolds,J.E., Yang,T., Qian,L., Jenkinson,J.D., Zhou,P., Eastman,A., and Craig,R.W. (1994). Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 54, 6348-6352.

- Ricotti,E., Fagioli,F., Garelli,E., Linari,C., Crescenzo,N., Horenstein,A.L., Pistamiglio,P., Vai,S., Berger,M., di Montezemolo,L.C., Madon,E., and Basso,G. (1998). c-kit is expressed in soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin and its ligand prevents apoptosis of neoplastic cells. *Blood* 91, 2397-2405.
- Rinchik,E.M., Bultman,S.J., Horsthemke,B., Lee,S.T., Strunk,K.M., Spritz,R.A., Avidano,K.M., Jong,M.T., and Nicholls,R.D. (1993). A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature* 361, 72-76.
- Rivoltini,L., Radrizzani,M., Accornero,P., Squarcina,P., Chiodoni,C., Mazzocchi,A., Castelli,C., Tarsini,P., Viggiano,V., Belli,F., Colombo,M.P., and Parmiani,G. (1998). Human melanoma-reactive CD4+ and CD8+ CTL clones resist Fas ligand-induced apoptosis and use Fas/Fas ligand-independent mechanisms for tumor killing. *J. Immunol.* 161, 1220-1230.
- Rofstad,E.K. and Danielsen,T. (1998). Hypoxia-induced angiogenesis and vascular endothelial growth factor secretion in human melanoma. *Br. J. Cancer* 77, 897-902.
- Rofstad,E.K. and Halsor,E.F. (2000). Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res.* 60, 4932-4938.
- Ropponen,K.M., Kellokoski,J.K., Lipponen,P.K., Pietilainen,T., Eskelinen,M.J., Alhava,E.M., and Kosma,V.M. (1999). p22/WAF1 expression in human colorectal carcinoma: association with p53, transcription factor AP-2 and prognosis. *Br. J. Cancer* 81, 133-140.
- Rubinfeld,B., Robbins,P., El Gamil,M., Albert,I., Porfiri,E., and Polakis,P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275, 1790-1792.
- Rummel,M.M., Sers,C., and Johnson,J.P. (1996). Phorbol ester and cyclic AMP-mediated regulation of the melanoma-associated cell adhesion molecule MUC18/MCAM. *Cancer Res.* 56, 2218-2223.
- Rygaard,K., Nakamura,T., and Spang-Thomsen,M. (1993). Expression of the proto-oncogenes c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor, in SCLC cell lines and xenografts. *Br. J. Cancer* 67, 37-46.
- Sakurai,T., Yanagisawa,M., Takawa,Y., Miyazaki,H., Kimura,S., Goto,K., and Masaki,T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348, 732-735.
- Sato,S., Roberts,K., Gambino,G., Cook,A., Kouzarides,T., and Goding,C.R. (1997). CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene* 14, 3083-3092.
- Sattler,M. and Salgia,R. (2004). Targeting c-Kit mutations: basic science to novel therapies. *Leuk. Res.* 28 Suppl 1, S11-S20.
- Satyamoorthy,K., Li,G., Gerrero,M.R., Brose,M.S., Volpe,P., Weber,B.L., Van Belle,P., Elder,D.E., and Herlyn,M. (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* 63, 756-759.
- Savin,C. (1965). The blood vessels and pigmentary cells of the inner ear. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 74, 611-622.
- Schaart,F.M., Garbe,C., and Orfanos,C.E. (1993). [Disappearance of the ozone layer and skin cancer: attempt at risk assessment]. *Hautarzt* 44, 63-68.
- Scheibenbogen,C., Mohler,T., Haefele,J., Hunstein,W., and Keilholz,U. (1995). Serum interleukin-8 (IL-8) is elevated in patients with metastatic melanoma and correlates with tumour load. *Melanoma Res.* 5, 179-181.

- Schmid,P., Itin,P., and Ruffli,T. (1995). In situ analysis of transforming growth factor-beta s (TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3), and TGF-beta type II receptor expression in malignant melanoma. *Carcinogenesis* 16, 1499-1503.
- Schuch,U., Lohse,M.J., and Schachner,M. (1989). Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 3, 13-20.
- Scott,G., Ewing,J., Ryan,D., and Abboud,C. (1994). Stem cell factor regulates human melanocyte-matrix interactions. *Pigment Cell Res.* 7, 44-51.
- Sekido,Y., Obata,Y., Ueda,R., Hida,T., Suyama,M., Shimokata,K., Ariyoshi,Y., and Takahashi,T. (1991). Preferential expression of c-kit protooncogene transcripts in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 51, 2416-2419.
- Selzer,E., Schlagbauer-Wadl,H., Okamoto,I., Pehamberger,H., Potter,R., and Jansen,B. (1998). Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 8, 197-203.
- Sers,C., Riethmuller,G., and Johnson,J.P. (1994). MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread. *Cancer Res.* 54, 5689-5694.
- Shah,N.P. and Sawyers,C.L. (2003). Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 22, 7389-7395.
- Shahbazi,M., Pravica,V., Nasreen,N., Fakhoury,H., Fryer,A.A., Strange,R.C., Hutchinson,P.E., Osborne,J.E., Lear,J.T., Smith,A.G., and Hutchinson,I.V. (2002). Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet* 359, 397-401.
- Shen,S.S., Zhang,P.S., Eton,O., and Prieto,V.G. (2003). Analysis of protein tyrosine kinase expression in melanocytic lesions by tissue array. *J. Cutan. Pathol.* 30, 539-547.
- Shih,I.M., Elder,D.E., Hsu,M.Y., and Herlyn,M. (1994). Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes. *Am. J. Pathol.* 145, 837-845.
- Shih,I.M. and Herlyn,M. (1994). Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma. *In Vivo* 8, 113-123.
- Shih,I.M., Speicher,D., Hsu,M.Y., Levine,E., and Herlyn,M. (1997). Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic Mel-CAM/ligand adhesion. *Cancer Res.* 57, 3835-3840.
- Shiojima,I. and Walsh,K. (2002). Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ. Res.* 90, 1243-1250.
- Silins,G., Grimmond,S., Egerton,M., and Hayward,N. (1997). Analysis of the promoter region of the human VEGF-related factor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 413-418.
- Silletti,S., Mei,F., Sheppard,D., and Montgomery,A.M. (2000). Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J. Cell Biol.* 149, 1485-1502.
- Simonetti,O., Lucarini,G., Brancorsini,D., Nita,P., Bernardini,M.L., Biagini,G., and Offidani,A. (2002). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *Cancer* 95, 1963-1970.
- Simpson,J.K. and Metcalfe,D.D. (2002). Mastocytosis and disorders of mast cell proliferation. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 22, 175-188.

- Singh,R.K., Gutman,M., Reich,R., and Bar-Eli,M. (1995). Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8. *Cancer Res.* 55, 3669-3674.
- Smalley,K.S. (2003). A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int. J. Cancer* 104, 527-532.
- Smith,L.L. and Giachelli,C.M. (1998). Structural requirements for alpha 9 beta 1-mediated adhesion and migration to thrombin-cleaved osteopontin. *Exp. Cell Res.* 242, 351-360.
- Smolich,B.D., Yuen,H.A., West,K.A., Giles,F.J., Albitar,M., and Cherrington,J.M. (2001). The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibit the SCF receptor (c-kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts. *Blood* 97, 1413-1421.
- Soengas,M.S., Capodici,P., Polsky,D., Mora,J., Esteller,M., Opitz-Araya,X., McCombie,R., Herman,J.G., Gerald,W.L., Lazebnik,Y.A., Cordon-Cardo,C., and Lowe,S.W. (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-211.
- Somasundaram,K., Jayaraman,G., Williams,T., Moran,E., Frisch,S., and Thimmapaya,B. (1996). Repression of a matrix metalloprotease gene by E1A correlates with its ability to bind to cell type-specific transcription factor AP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3088-3093.
- Sparrow,L.E., Eldon,M.J., English,D.R., and Heenan,P.J. (1998). p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am. J. Dermatopathol.* 20, 255-261.
- Springer,T.A. (1990a). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.
- Springer,T.A. (1990b). Leucocyte adhesion to cells. *Scand. J. Immunol.* 32, 211-216.
- Spritz,R.A. (1994). Molecular basis of human piebaldism. *J. Invest Dermatol.* 103, 137S-140S.
- Spritz,R.A., Holmes,S.A., Berg,S.Z., Nordlund,J.J., and Fukai,K. (1993a). A recurrent deletion in the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene is a frequent cause of human piebaldism. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1499-1500.
- Spritz,R.A., Holmes,S.A., Itin,P., and Kuster,W. (1993b). Novel mutations of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene in human piebaldism. *J. Invest Dermatol.* 101, 22-25.
- Stanulla,M., Welte,K., Hadam,M.R., and Pietsch,T. (1995). Coexpression of stem cell factor and its receptor c-Kit in human malignant glioma cell lines. *Acta Neuropathol. (Berl)* 89, 158-165.
- STARICCO,R.J. and PINKUS,H. (1957). Quantitative and qualitative data on the pigment cells of adult human epidermis. *J. Invest Dermatol.* 28, 33-45.
- Steel,K.P. and Smith,R.J. (1992). Normal hearing in Splotch (Sp/+), the mouse homologue of Waardenburg syndrome type 1. *Nat. Genet.* 2, 75-79.
- Stefanou,D., Batistatou,A., Zioga,A., Arkoumani,E., Papachristou,D.J., and Agnantis,N.J. (2004). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and C-KIT in cutaneous melanocytic lesions. *Int. J. Surg. Pathol.* 12, 133-138.
- Stott,F.J., Bates,S., James,M.C., McConnell,B.B., Starborg,M., Brookes,S., Palmero,I., Ryan,K., Hara,E., Vousden,K.H., and Peters,G. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* 17, 5001-5014.
- Streit,M. and Detmar,M. (2003). Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* 22, 3172-3179.

- Strohmeier,T., Reese,D., Press,M., Ackermann,R., Hartmann,M., and Slamon,D. (1995). Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J. Urol.* 153, 511-515.
- Sturm,R.A., Satyamoorthy,K., Meier,F., Gardiner,B.B., Smit,D.J., Vaidya,B., and Herlyn,M. (2002). Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Res.* 62, 226-232.
- Suda,T., Takahashi,T., Golstein,P., and Nagata,S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
- Sugawara,F., Ninomiya,H., Okamoto,Y., Miwa,S., Mazda,O., Katsura,Y., and Masaki,T. (1996). Endothelin-1-induced mitogenic responses of Chinese hamster ovary cells expressing human endothelinA: the role of a wortmannin-sensitive signaling pathway. *Mol. Pharmacol.* 49, 447-457.
- Sviderskaya,E.V., Easty,D.J., and Bennett,D.C. (1998). Impaired growth and differentiation of diploid but not immortal melanoblasts from endothelin receptor B mutant (piebald) mice. *Dev. Dyn.* 213, 452-463.
- Sviderskaya,E.V., Wakeling,W.F., and Bennett,D.C. (1995). A cloned, immortal line of murine melanoblasts inducible to differentiate to melanocytes. *Development* 121, 1547-1557.
- Szabo,G., Gerald,A.B., Pathak,M.A., and Fitzpatrick,T.B. (1969). Racial differences in the fate of melanosomes in human epidermis. *Nature* 222, 1081-1082.
- Tachibana,M., Perez-Jurado,L.A., Nakayama,A., Hodgkinson,C.A., Li,X., Schneider,M., Miki,T., Fex,J., Francke,U., and Arnheiter,H. (1994). Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Hum. Mol. Genet.* 3, 553-557.
- Tada,A., Suzuki,I., Im,S., Davis,M.B., Cornelius,J., Babcock,G., Nordlund,J.J., and Abdel-Malek,Z.A. (1998). Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ.* 9, 575-584.
- Takahashi,H., Saitoh,K., Kishi,H., and Parsons,P.G. (1995). Immunohistochemical localisation of stem cell factor (SCF) with comparison of its receptor c-Kit proto-oncogene product (c-KIT) in melanocytic tumours. *Virchows Arch.* 427, 283-288.
- Tamura,S. (1997). The E-cadherin-mediated cell-cell adhesion system in human cancers. *Br. J. Surg.* 84, 899-900.
- Tang,L., Tron,V.A., Reed,J.C., Mah,K.J., Krajewska,M., Li,G., Zhou,X., Ho,V.C., and Trotter,M.J. (1998). Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 4, 1865-1871.
- Tassabehji,M., Read,A.P., Newton,V.E., Patton,M., Gruss,P., Harris,R., and Strachan,T. (1993). Mutations in the PAX3 gene causing Waardenburg syndrome type 1 and type 2. *Nat. Genet.* 3, 26-30.
- Te,K.G., Timeus,F., Rinaldi,A., Crescenzo,N., Spinelli,M., Rosolen,A., Ricotti,E., and Basso,G. (2004). Imatinib mesylate (STI571) interference with growth of neuroectodermal tumour cell lines does not critically involve c-Kit inhibition. *Int. J. Mol. Med.* 14, 373-382.
- Tellez,C. and Bar-Eli,M. (2003). Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene* 22, 3130-3137.
- Tellez,C., McCarty,M., Ruiz,M., and Bar-Eli,M. (2003). Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma. *J. Biol. Chem.* 278, 46632-46642.
- Tharp,M.D. and Longley,B.J., Jr. (2001). Mastocytosis. *Dermatol. Clin.* 19, 679-6ix.

- Thies,A., Schachner,M., Moll,I., Berger,J., Schulze,H.J., Brunner,G., and Schumacher,U. (2002). Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* 38, 1708-1716.
- Thomas,W.D. and Hersey,P. (1998). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J. Immunol.* 161, 2195-2200.
- Thomas,W.D., Zhang,X.D., Franco,A.V., Nguyen,T., and Hersey,P. (2000). TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria. *J. Immunol.* 165, 5612-5620.
- Thor,G., Probstmeier,R., and Schachner,M. (1987). Characterization of the cell adhesion molecules L1, N-CAM and J1 in the mouse intestine. *EMBO J.* 6, 2581-2586.
- Tobin,D. and Thody,A.J. (1994). The superoxide anion may mediate short- but not long-term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis. *Exp. Dermatol.* 3, 99-105.
- Trotter,M.J., Tang,L., and Tron,V.A. (1997). Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 24, 265-271.
- Tsao,H., Benoit,E., Sober,A.J., Thiele,C., and Haluska,F.G. (1998). Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the cyclin-dependent kinase-4 gene. *Cancer Res.* 58, 109-113.
- Tsuura,Y., Hiraki,H., Watanabe,K., Igarashi,S., Shimamura,K., Fukuda,T., Suzuki,T., and Seito,T. (1994b). Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch.* 424, 135-141.
- Tsuura,Y., Hiraki,H., Watanabe,K., Igarashi,S., Shimamura,K., Fukuda,T., Suzuki,T., and Seito,T. (1994a). Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch.* 424, 135-141.
- Tuveson,D.A., Willis,N.A., Jacks,T., Griffin,J.D., Singer,S., Fletcher,C.D., Fletcher,J.A., and Demetri,G.D. (2001). STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* 20, 5054-5058.
- Ugurel,S., Seiter,S., Rappl,G., Stark,A., Tilgen,W., and Reinhold,U. (1999). Heterogenous susceptibility to CD95-induced apoptosis in melanoma cells correlates with bcl-2 and bcl-x expression and is sensitive to modulation by interferon-gamma. *Int. J. Cancer* 82, 727-736.
- Ulivi,P., Zoli,W., Medri,L., Amadori,D., Saragoni,L., Barbanti,F., Calistri,D., and Silvestrini,R. (2004). c-kit and SCF expression in normal and tumor breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 83, 33-42.
- Urabe,K., Aroca,P., and Hearing,V.J. (1993). From gene to protein: determination of melanin synthesis. *Pigment Cell Res.* 6, 186-192.
- Vaisanen,A., Kallioinen,M., Taskinen,P.J., and Turpeenniemi-Hujanen,T. (1998). Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J. Pathol.* 186, 51-58.
- Vaisanen,A., Kallioinen,M., von Dickhoff,K., Laatikainen,L., Hoyhtya,M., and Turpeenniemi-Hujanen,T. (1999). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) immunoreactive protein--a new prognostic marker in uveal melanoma? *J. Pathol.* 188, 56-62.

- Valverde,P., Healy,E., Jackson,I., Rees,J.L., and Thody,A.J. (1995b). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* 11, 328-330.
- Valverde,P., Healy,E., Jackson,I., Rees,J.L., and Thody,A.J. (1995a). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* 11, 328-330.
- Valyi-Nagy,I.T., Hirka,G., Jensen,P.J., Shih,I.M., Juhasz,I., and Herlyn,M. (1993). Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. *Lab Invest* 69, 152-159.
- Van Belle,P., Rodeck,U., Nuamah,I., Halpern,A.C., and Elder,D.E. (1996). Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms. *Am. J. Pathol.* 148, 1887-1894.
- van den Oord,J.J., Vandeghinste,N., De Ley,M., and Wolf-Peeters,C. (1994). Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *Am. J. Pathol.* 145, 294-300.
- van Kempen,L.C., Meier,F., Egeblad,M., Kersten-Niessen,M.J., Garbe,C., Weidle,U.H., Van Muijen,G.N., Herlyn,M., Bloemers,H.P., and Swart,G.W. (2004). Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis. *J. Invest Dermatol.* 122, 1293-1301.
- van Kempen,L.C., van den Oord,J.J., Van Muijen,G.N., Weidle,U.H., Bloemers,H.P., and Swart,G.W. (2000). Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am. J. Pathol.* 156, 769-774.
- Vander Heiden,M.G. and Thompson,C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.* 1, E209-E216.
- Velasco,P. and Lange-Asschenfeldt,B. (2002). Dermatological aspects of angiogenesis. *Br. J. Dermatol.* 147, 841-852.
- Vidal,M.J., Loganzo,F., Jr., de Oliveira,A.R., Hayward,N.K., and Albino,A.P. (1995). Mutations and defective expression of the WAF1 p21 tumour-suppressor gene in malignant melanomas. *Melanoma Res.* 5, 243-250.
- Vitali,R., Cesi,V., Nicotra,M.R., McDowell,H.P., Donfrancesco,A., Mannarino,O., Natali,P.G., Raschella,G., and Dominici,C. (2003). c-Kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited in vitro by STI-571. *Int. J. Cancer* 106, 147-152.
- Vivanco,I. and Sawyers,C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489-501.
- Walker,G.J., Flores,J.F., Glendening,J.M., Lin,A.H., Markl,I.D., and Fountain,J.W. (1998). Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes. Cancer* 22, 157-163.
- Wang,W.L., Healy,M.E., Sattler,M., Verma,S., Lin,J., Maulik,G., Stiles,C.D., Griffin,J.D., Johnson,B.E., and Salgia,R. (2000). Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571. *Oncogene* 19, 3521-3528.
- Wang,Y. and Becker,D. (1996). Differential expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p16 and p21 in the human melanocytic system. *Oncogene* 12, 1069-1075.
- Wang,Y. and Becker,D. (1997). Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat. Med.* 3, 887-893.
- Weber,C.H. and Vincenz,C. (2001). The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem. Sci.* 26, 475-481.

- Weeraratna,A.T., Jiang,Y., Hostetter,G., Rosenblatt,K., Duray,P., Bittner,M., and Trent,J.M. (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1, 279-288.
- Wehrle-Haller,B. (2003). The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res.* 16, 287-296.
- Wehrle-Haller,B. and Weston,J.A. (1995). Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. *Development* 121, 731-742.
- Welker,P., Grabbe,J., Gibbs,B., Zuberbier,T., and Henz,B.M. (1999). Human mast cells produce and differentially express both soluble and membrane-bound stem cell factor. *Scand. J. Immunol.* 49, 495-500.
- Welker,P., Schadendorf,D., Artuc,M., Grabbe,J., and Henz,B.M. (2000). Expression of SCF splice variants in human melanocytes and melanoma cell lines: potential prognostic implications. *Br. J. Cancer* 82, 1453-1458.
- Wellbrock,C., Gomez,A., and Scharl,M. (2002a). Melanoma development and pigment cell transformation in xiphophorus. *Microsc. Res. Tech.* 58, 456-463.
- Wellbrock,C., Ogilvie,L., Hedley,D., Karasarides,M., Martin,J., Niculescu-Duvaz,D., Springer,C.J., and Marais,R. (2004). V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res.* 64, 2338-2342.
- Wellbrock,C., Weisser,C., Geissinger,E., Troppmair,J., and Scharl,M. (2002b). Activation of p59(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 6443-6454.
- Westermarck,J. and Kahari,V.M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 13, 781-792.
- Weston,J.A. (1970). The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv. Morphog.* 8, 41-114.
- Wiecker,T.S., Luther,H., Buettner,P., Bauer,J., and Garbe,C. (2003). Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* 97, 628-638.
- Williams,T., Admon,A., Luscher,B., and Tjian,R. (1988). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.* 2, 1557-1569.
- Woenckhaus,C., Giebel,J., Failing,K., Fenic,I., Dittberner,T., and Poetsch,M. (2003). Expression of AP-2alpha, c-kit, and cleaved caspase-6 and -3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression? *J. Pathol.* 201, 278-287.
- Wolfel,T., Hauer,M., Schneider,J., Serrano,M., Wolfel,C., Klehmann-Hieb,E., De Plaen,E., Hankeln,T., Meyer zum Buschenfelde,K.H., and Beach,D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-1284.
- Wolff,K. and Konrad,K. (1971). Melanin pigmentation: an in vivo model for studies of melanosome kinetics within keratinocytes. *Science* 174, 1034-1035.
- Woods,D., Cherwinski,H., Venetsanakos,E., Bhat,A., Gysin,S., Humbert,M., Bray,P.F., Saylor,V.L., and McMahon,M. (2001). Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 21, 3192-3205.
- Worm,J., Christensen,C., Gronbaek,K., Tulchinsky,E., and Guldborg,P. (2004). Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene* 23, 5215-5226.



- Wu,X. and Deng,Y. (2002). Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci.* 7, d151-d156.
- Wu,X. and Hammer,J.A., III (2000). Making sense of melanosome dynamics in mouse melanocytes. *Pigment Cell Res.* 13, 241-247.
- Wyllie,A.H. (1997). Apoptosis and carcinogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 189-197.
- Xie,K., Huang,S., Wang,Y., Beltran,P.J., Juang,S.H., Dong,Z., Reed,J.C., McDonnell,T.J., McConkey,D.J., and Fidler,I.J. (1996). Bcl-2 protects cells from cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 43, 109-115.
- Xie,S., Price,J.E., Luca,M., Jean,D., Ronai,Z., and Bar-Eli,M. (1997b). Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Oncogene* 15, 2069-2075.
- Xie,S., Price,J.E., Luca,M., Jean,D., Ronai,Z., and Bar-Eli,M. (1997a). Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Oncogene* 15, 2069-2075.
- Xiong,S., Grijalva,R., Zhang,L., Nguyen,N.T., Pisters,P.W., Pollock,R.E., and Yu,D. (2001). Up-regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells by the heregulin-beta1-activated p38 signaling pathway enhances endothelial cell migration. *Cancer Res.* 61, 1727-1732.
- Xu,W., Gong,L., Haddad,M.M., Bischof,O., Campisi,J., Yeh,E.T., and Medrano,E.E. (2000). Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp. Cell Res.* 255, 135-143.
- Yamada,H., Tada-Oikawa,S., Uchida,A., and Kawanishi,S. (1999). TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 130-133.
- Yamamoto,K., Tojo,A., Aoki,N., and Shibuya,M. (1993). Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene. *Jpn. J. Cancer Res.* 84, 1136-1144.
- Yap,A.S., Brieher,W.M., and Gumbiner,B.M. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 119-146.
- Yarden,Y., Kuang,W.J., Yang-Feng,T., Coussens,L., Munemitsu,S., Dull,T.J., Chen,E., Schlessinger,J., Francke,U., and Ullrich,A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 6, 3341-3351.
- Yazdi,A.S., Palmedo,G., Flaig,M.J., Puchta,U., Reckwerth,A., Rutten,A., Mentzel,T., Hugel,H., Hantschke,M., Schmid-Wendtner,M.H., Kutzner,H., and Sander,C.A. (2003). Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J. Invest Dermatol.* 121, 1160-1162.
- Yin,X.M., Oltvai,Z.N., and Korsmeyer,S.J. (1994b). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321-323.
- Yin,X.M., Oltvai,Z.N., and Korsmeyer,S.J. (1994a). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321-323.
- Yin,X.M., Oltvai,Z.N., Veis-Novack,D.J., Linette,G.P., and Korsmeyer,S.J. (1994c). Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59, 387-393.
- Yoshida,H., Kunisada,T., Grimm,T., Nishimura,E.K., Nishioka,E., and Nishikawa,S.I. (2001). Review: melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 6, 1-5.
- Yu,J.L., Rak,J.W., Klement,G., and Kerbel,R.S. (2002). Vascular endothelial growth factor isoform expression as a determinant of blood vessel patterning in human melanoma xenografts. *Cancer Res.* 62, 1838-1846.

Zak,F.G. and Lawson,W. (1974). The presence of melanocytes in the nasal cavity. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 83, 515-519.

Zakut,R., Perlis,R., Eliyahu,S., Yarden,Y., Givol,D., Lyman,S.D., and Halaban,R. (1993a). KIT ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of KIT-expressing melanoma cells. *Oncogene* 8, 2221-2229.

Zakut,R., Perlis,R., Eliyahu,S., Yarden,Y., Givol,D., Lyman,S.D., and Halaban,R. (1993b). KIT ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of KIT-expressing melanoma cells. *Oncogene* 8, 2221-2229.

Zhang,X.D., Franco,A., Myers,K., Gray,C., Nguyen,T., and Hersey,P. (1999). Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* 59, 2747-2753.

Zsebo,K.M., Williams,D.A., Geissler,E.N., Broudy,V.C., Martin,F.H., Atkins,H.L., Hsu,R.Y., Birkett,N.C., Okino,K.H., Murdock,D.C., and . (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63, 213-224.

## Lebenslauf

Name: Maksimovic  
Vorname: Olga  
Geburtsdatum: 18.03.1976  
Geburtsort: Marbach am Neckar

Schulbildung: 1995: Abitur an der Oscar-Paret-Schule, Freiberg  
am Neckar

Studium:

10/1995 – 03/1997: Studium der Psychologie an der Universität Koblenz-  
Landau, Abt. Landau in der Pfalz

04/1997 – 09/2004: Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-  
Universität, Tübingen

1997: Vordiplom im Studienfach Psychologie

31.03.1999: Ärztliche Vorprüfung

23.03.2000: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

13.09.2002: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2003 – 2004: Praktisches Jahr:

1. Tertial: Universitätshautklinik Tübingen
2. Tertial: University of Cape Town, Südafrika
3. Tertial: Medizinische Klinik der Universitätsklinik  
Tübingen

24.11.2004: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2000 – 2004: Promotionsarbeit bei PD Dr. rer. nat. Birgit Schitteck und  
Prof. Dr. med. Claus Garbe an der Universitätshautklinik  
Tübingen, Sektion Dermatologische Onkologie

## **Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen bedanken, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Danken möchte ich an erster Stelle Prof. Dr. med. Claus Garbe für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

PD Dr. rer. nat. Birgit Schittek danke ich für die gute Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie die konstruktive Kritik, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Sektion für Dermatologische Onkologie:

Dr. rer. nat. Silke Busch, Cornelia Feike, Evelyn Maczey, PD Dr. med. Friedegund Meier, Helga Möller, Birgit Sauer, Dr. rer. nat. Isabel Lopes, Dr. rer. nat. Karin Psenner, Dr. rer. nat. Heiko Steffen, Tobias Sinnberg, die mir allesamt über fachliche Unterstützung und regen wissenschaftlichen Austausch hinaus oft, auch durch humorvolle Aufmunterungen, über so manch eine Durststrecke hinweggeholfen haben.

Betonen möchte ich meinen Dank an Dr. rer. nat. Silke Busch sowie PD Dr. rer. nat. Birgit Schittek für das intensive Korrekturlesen.

Ein ganz besonderer und spezieller Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Tanja (Nana) für ihre bedingungslose Unterstützung in allen Bereichen und ihren unermüdlichen Zuspruch.