

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
LEHRSTUHL FÜR BIOFUNKTIONALITÄT DER LEBENSMITTEL

Die Rolle des Transkriptionsfaktors
c-Jun bei der Entstehung des malignen Melanoms

Barbara Martina Spangler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. Haller
2. Univ.-Prof. Dr. A. K. Bosserhoff
(Universität Regensburg)

Die Dissertation wurde am 13.10.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.02.2011 angenommen.

Für Tante Gerda

† 29.07.2009

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 DAS MALIGNEN MELANOM	4
1.1.1 DEFINITION DES MALIGNEN MELANOMS	4
1.1.1 INZIDENZ UND MORTALITÄT DES MALIGNEN MELANOMS	4
1.1.2 KLINISCHE EINTEILUNG DER VERSCHIEDENEN MELANOMTYPEN	5
1.2 MODELL DER MELANOMENTSTEHUNG UND PROGRESSION	8
1.3 MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER MELANOMENTSTEHUNG UND PROGRESSION	10
1.3.1 TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	11
1.3.2 DIE ROLLE DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS AP-1 UND SEINES MITGLIEDS C-JUN IN DER ENTSTEHUNG DES MALIGNEN MELANOMS	15
1.3.3 AP-1 UND JNK SIGNALWEG	17
1.3.4 RAS/RAF/MEK/ERK-SIGNALWEG	19
1.4 DIE ADHÄSIONSMOLEKÜLE	22
1.4.1 KLASSIFIZIERUNG DER CADHERIN FAMILIE	23
1.4.2 DIE ROLLE DES ADHÄSIONSMOLEKÜL E-CADHERIN IN DER HAUT	24
1.4.3 DIE ROLLE VON E-CADHERIN BEI DER ENTSTEHUNG DES MALIGNEN MELANOMS	26
1.4.4 E-CADHERIN ZELLADHÄSION UND ZYTOSKELETT	28
2 MATERIALIEN UND METHODEN	32
2.1 MATERIALIEN	32
2.1.1 ALLGEMEINE MATERIALIEN	32
2.1.2 GERÄTE	35
2.1.3 BAKTERIEN	37
2.1.4 VIREN	37
2.1.5 SÄUGERZELLINIEN	38
2.1.6 VEKTOREN	39
2.1.7 OLIGONUKLEOTIDE	41
2.1.8 SHORT INTERFERING RNA (SIRNA)	42

2.2 MEDIEN, ANTIBIOTIKA UND PUFFER	42
2.2.1 MEDIEN ZUR ANZUCHT VON E.COLI UND SÄUGERZELLKULTUREN	42
2.2.2 ANTIBIOTIKA	43
2.2.3 PUFFER UND LÖSUNGEN	43
2.3 METHODEN	46
2.3.1 ARBEITEN MIT E.COLI	47
2.3.1.1 Kultivierung	47
2.3.1.2 Transformation von E.coli	47
2.3.1.3 Isolierung von Plasmid DNA	47
2.3.1.4 Isolierung von Plasmid DNA im größeren Maßstab (Midi und Maxi Präparation)	48
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	48
2.4.1 DNA TECHNIKEN	48
2.4.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	48
2.4.1.2 Gelelektrophorese von DNA	49
2.4.1.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	49
2.4.1.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	49
2.4.1.5 Klonierung von DNA Fragmenten in Plasmide	49
2.4.1.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	50
2.4.1.7 RT- PCR	52
2.4.1.8 Quantitative RT- PCR	52
2.4.1.9 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	53
2.4.2 RNA TECHNIKEN	55
2.4.2.1 RNA Isolation aus Säugerzellen	55
2.4.3 PROTEINCHEMISCHE METHODEN	55
2.4.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten	55
2.4.3.2 Präparation von Kernproteinen	55
2.4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	56
2.4.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	56
2.4.3.5 Western Blot	56
2.4.3.6 Immunfluoreszenz	57
2.4.3.7 Immunhistochemie	57
2.5 ZELLKULTURMETHODEN	58
2.5.1 KULTIVIERUNG VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN	58
2.5.2 TRANSFEKTION VON ZELLKULTURZELLEN	58
2.5.3 LUCIFERASE-REPORTERGEN-ASSAY	59

2.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	60
3	ZIELSETZUNG	61
4	ERGEBNISSE	62
4.1	RELEVANZ VON C-JUN IN DER ENTSTEHUNG UND PROGRESSION DES MALIGNEN MELANOMS	62
4.1.1	EXPRESSIONSSTATUS VON C-JUN IM MALIGNEN MELANOM	62
4.1.2	ANALYSE DER AP-1 AKTIVITÄT IM MELANOM	64
4.1.2.1	Inhibierung von c-Jun verringert AP-1 Aktivität	65
4.1.2.2	c-Jun ist der Hauptregulator der AP-1 Aktivität	67
4.2	INTERAKTION ZWISCHEN E-CADHERIN VERMITTELNDER ZELL-ZELL-ADHÄSION UND DEM TRANSKRIPTIONSFAKTOR C-JUN	69
4.2.1	EFFEKT VON E-CADHERIN AUF DIE PROTEINEXPRESSION VON C-JUN	69
4.2.1.1	Untersuchung der c-Jun Protein Expression in E-cadherin re-exprimierenden Modellsystemen	70
4.2.1.2	Einfluss von E-cadherin auf die transkriptionelle Aktivität von AP-1	72
4.2.2	ROLLE DER ZELL-ADHÄSION IN DER E-CADHERIN VERMITTELNDEN REGULATION VON C-JUN	74
4.2.2.1	Aktive Zell-Zell-Kontakte über E-cadherin sind wichtig für die Regulation von c-Jun	74
4.2.2.2	Ko-Kulturexperimente mit Keratinozyten und Melanozyten	77
4.3	DIE REGULATION VON C-JUN ERFOLGT ÜBER PROTEIN STABILITÄT	81
4.3.1	POSTTRANSKRIPTIONELLE REGULATION VON C-JUN	81
4.3.2	ROLLE VERSCHIEDENER KINASEN IN DER REGULATION DER PROTEINSTABILITÄT VON C-JUN	82
4.3.2.1	Die Rolle der MAPKinasen ERK und JNK	82
4.3.2.2	Die Rolle der MAPKinase p38	84
4.3.2.3	Die Rolle des Transkriptionsfaktors NFκB	85
4.4	POSTTRANSKRIPTIONELLE REGULATION VON C-JUN DURCH DAS ZYTOSKELETT	86
4.4.1	ROLLE DES ZYTOSKLETTS IN DER REGULATION VON C-JUN	86
4.4.2	BETEILIGUNG DER RHO GTPASE RHOC	90
4.4.2.1	Expression von RhoC hat Einfluss auf die c-Jun Protein Expression	90
4.4.2.2	Zusammenhang zwischen E-cadherin und RhoC	92
4.4.3	BETEILIGUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS ETS-1	93
4.5	KOOPERATIONEN	98
5	DISKUSSION	99

5.1	C-JUN IM MALIGNEN MELANOM	99
5.2	E-CADHERIN-ABHÄNGIGE REGULATION VON C-JUN	102
5.3	POSTTRANSKRIPTIONELLE REGULATION VON C-JUN DURCH DAS ZYTOSKELETT	105
6	<u>EIGENE PUBLIKATIONEN</u>	<u>111</u>
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>112</u>
8	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>127</u>
	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>129</u>

Zusammenfassung

Das maligne Melanom zeichnet sich - bei drastisch angestiegener Inzidenz in den letzten Jahrzehnten - durch unverändert hohe Mortalität aus.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, herauszufinden, ob Veränderungen der c-Jun Proteinexpression und der damit verbundenen transkriptionellen AP-1 Aktivität einen Einfluss auf die Entwicklung und Progression des malignen Melanoms haben.

Zunächst konnte in EMSAs und AP-1 Reporterger Assays gezeigt werden, dass c-Jun im Melanom das wichtigste Mitglied der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie ist, die sich unter anderem aus c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, Fra-1 und Fra-2 zusammensetzt.

Weiterhin konnte geklärt werden, dass c-Jun posttranskriptionell in seiner Proteinstabilität reguliert wird. Darauf weisen die Ergebnisse einer quantitativen RT-PCR Analyse hin, bei der zehn Melanomzelllinien auf ihren c-Jun mRNA Status untersucht wurden. Im Vergleich zu den c-Jun Proteinmengen derselben Zelllinien konnten nur geringe mRNA Mengen detektiert werden. Experimente mit dem proteasomalen Inhibitor MG 132 in Melanozyten und Melanomzellen erhärten die Annahme der posttranskriptionellen Regulation von c-Jun in seiner Proteinstabilität.

Zudem konnte im Zuge dieser Arbeit das Zell-Adhäsionsmolekül E-cadherin als Regulator der c-Jun Proteinexpression im Melanom identifiziert werden. Da E-cadherin im Melanom verloren ist, wurde in zwei Zelllinien durch virale Transduktion und vektorielle Transfektion E-cadherin reexprimiert. Die Reexpression von E-cadherin führte zu einer Abnahme der c-Jun Expression, welches mittels Western Blot- und Immunfluoreszenz Analysen nachgewiesen wurde. Darüber hinaus nimmt die Expression von E-cadherin auch Einfluss auf die AP-1 Aktivität und Expression von Zielgenen von c-Jun, wie in Reporterger Assays und quantitative RT-PCR Analysen gezeigt werden konnte. In umgekehrter Weise konnte in Melanozyten, die E-cadherin exprimieren, durch Transfektion einer siRNA gegen E-cadherin oder durch Behandlung eines inhibitorischen E-cadherin-Antikörpers die Hochregulation von c-Jun induziert werden.

Bei der detaillierten Analyse des E-cadherin abhängigen Signalweges konnte eine Regulation von c-Jun über die klassischen MAPKinasen (JNK, ERK, p38) nach Behandlung mit Inhibitoren (SP600125; PD98059; SB202190; SB203580)

ausgeschlossen werden. Auch der Transkriptionsfaktor NFκB, der durch adenovirale Transduktion in Melanomzelllinien ausgeschaltet worden ist, ist an einer Regulation von c-Jun nicht beteiligt.

Desweiteren zeigte sich in Immunfluoreszenz-Analysen, dass der Verlust von E-cadherin und die damit verbundenen Zell-Zellkontakte in Melanomzellen mit zytoskelettalen Veränderungen einhergeht, die sich auf die Expression von c-Jun auswirken. Im Zuge dieser Analysen stellte sich heraus, dass sowohl die RhoGTPase RhoC als auch der Transkriptionsfaktor Ets-1 an der E-cadherin-abhängigen Regulation von c-Jun beteiligt sind. Die Transfektion mit einem dominant negativen RhoC Plasmid bzw. die Untersuchung von stabil transfizierten asEts-1 Klonen zeigen deutliche Veränderungen in der c-Jun Regulation, sowohl auf Protein- als auch auf transkriptioneller Ebene.

Damit konnte der molekulare Mechanismus, der der c-Jun Regulation im Melanom zugrunde liegt, aufgeklärt werden. Ausgehend von dem Verlust der E-cadherin Expression werden der Transkriptionsfaktor Ets-1 und die RhoGTPase RhoC aktiviert, das Zytoskelett wird daraufhin umstrukturiert und trägt so zur Stabilität von c-Jun und Aktivität von AP-1 bei.

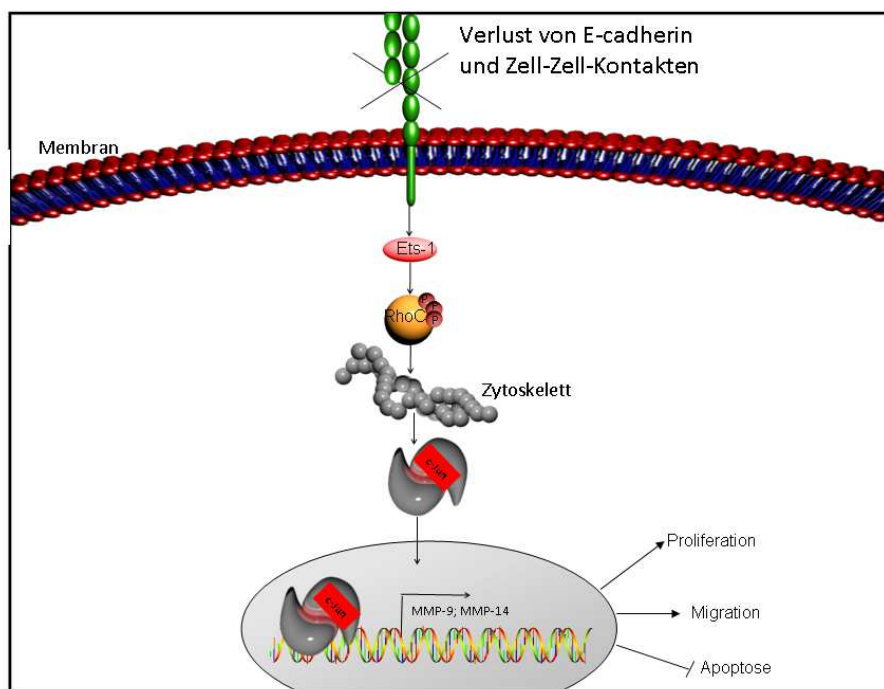


Abbildung 0-1: Darstellung des schematischen Signalweges, der im Melanom zur posttranslationalen Stabilität von c-Jun führt.

Zusammenfassend zeigt diese Dissertation, dass die Regulation von c-Jun wie bisher angenommen, nicht nur durch Phosphorylierung des Moleküls erfolgt, sondern die veränderte Expression von c-Jun durch den Verlust von E-cadherin von großer Bedeutung ist. Im Hinblick auf neue Therapieoptionen für das maligne Melanom sollte der in dieser Dissertation beschriebene Signalweg zukünftig berücksichtigt werden.

Ein Teil des in Abbildung 0-1 schematisch dargestellten Signalweges konnte in der Publikation „Posttranscriptional regulation controlled by E-cadherin is important for c-Jun activity in malignant melanoma“ (Spangler et al., 2010) experimentell belegt werden.

Desweiteren befindet sich die Veröffentlichung „Ets-1/RhoC signaling controls the activity of the transcription factor c-Jun“ in Bearbeitung.

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

1.1.1 Definition des malignen Melanoms

Das maligne Melanom wird auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnet. Es handelt sich hierbei um einen bösartigen Tumor, der sich ausgehend von Melanozyten (Pigmentzellen) überwiegend in der Haut manifestiert. In seltenen Fällen kommt das Melanom auch am Auge (Uvea und Retina), an den Hirnhäuten und an den Schleimhäuten verschiedener Lokalisation vor. Ein besonderes Kennzeichen des Melanoms ist, dass es stark pigmentiert auftritt, allerdings sind auch amelanotische Formen bekannt. Im Verhältnis zur Tumormasse besteht eine frühe Tendenz zur Metastasierung und damit eine ungünstige Prognose. Im Gegensatz zum Basaliom (Basalzellkarzinom), welches auch zu den malignen Hauterkrankungen zählt, aber nur selten zu Metastasierungen neigt, zählt das maligne Melanom zur Gruppe der hochmalignen Tumore und ist für etwa 90% der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich (Garbe et al., 2008).

1.1.1 Inzidenz und Mortalität des malignen Melanoms

Weltweit nimmt die Häufigkeit des malignen Melanoms vor allem bei der hellhäutigen, stark sonnenexponierten Bevölkerung zu (de Vries et al., 2003). Es wird davon ausgegangen, dass die Melanom-Inzidenz in den nächsten zehn Jahren noch weiter ansteigen wird (de Vries et al. 2003, Diffey et al., 2003). Verglichen mit allen malignen Tumoren liegt der prozentuale Anteil der Melanomerkkrankungen bei Männern bei 2% und bei Frauen bei 1,9%. Dabei übersteigt die Mortalität des malignen Melanoms die aller anderen Hauttumoren um ein Vielfaches.

Die höchsten Inzidenzraten werden aus Australien, Neuseeland, Südafrika, Europa und den USA berichtet. Hier kam es bereits zur Prägung des Begriffs „Melanom-Epidemie“ (Florez et al., 2004). Aktuell geht man in Australien von 50 Fällen/ 100.000 Einwohner und Jahr aus. Die niedrigsten Inzidenzraten weltweit finden sich in Nord- und Westafrika sowie in Asien. In Deutschland stieg die Inzidenzrate von 3 Fällen/100.000 Einwohner und Jahr zu Beginn der 70er Jahre auf circa 12 Fälle/100.000 Einwohner und Jahr. Die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr wird auf 10.000 Fälle geschätzt (Garbe et al., 2001).

Die alterspezifische Inzidenz für maligne Melanome zeigt, dass Männer in Altersklassen über 45 Jahre häufiger betroffen sind als Frauen. Es ergibt sich ein mittleres Erkrankungsalter für Männer von 59 Jahren und für Frauen von 60 Jahren.

Australien hat als erstes Land überhaupt mit breit angelegten Präventionskampagnen begonnen und kann heute eine Stabilisierung der Mortalitätsrate verzeichnen. Durch eine Verbesserung der Früherkennungsmaßnahmen konnte in allen Ländern erreicht werden, dass bei einer Erstdiagnose „Tumor“ die Tumordicke geringer ist und damit auch das Mortalitätsrisiko sinkt. Durch Fortsetzung der Kampagnen zur primären und sekundären Prävention und durch verbesserte Nachsorgeuntersuchungen wird es gelingen, die Inzidenz - und Mortalitätsraten für das maligne Melanom zu senken. Dies wird aber nach aktuellen Schätzungen erst im Laufe der nächsten Jahrzehnte erfolgen (aus *Epidemiologie des malignen Melanoms*, Pföhler und Tilgen).

1.1.2 Klinische Einteilung der verschiedenen Melanomtypen

Man unterscheidet in der Klinik vier verschiedenen Subtypen des malignen Melanoms: superfiziell spreitendes Melanom (SSM), noduläres Melanom (NM), lentigo-maligna Melanom (LM) und akral-lentiginöses Melanom (ALM). Der Subtyp **superfiziell spreitende Melanom (SSM)** tritt am häufigsten auf. 80 % des primären Melanoms, diagnostiziert in der kaukasischen Bevölkerung, gehen auf das SSM zurück. Patienten, die an SSM erkranken, sind im Durchschnitt 50 Jahre alt. Diese Art des Melanoms manifestiert sich bei Frauen vor allem an den Beinen, bei Männern tritt es überwiegend am Rücken auf. Eine mögliche Ursache, um ein SSM zu entwickeln, könnte eine immer wieder kehrende starke UV-Bestrahlung sein. Das SSM beginnt zunächst auf der Epidermis mit einer horizontalen Ausbreitungsphase als Fleck, entwickelt sich dann invasiv flach erhaben und zeigt sekundär knotige Anteile. Die Läsion expandiert sehr langsam über einen Zeitraum von mehreren Monaten bis hin zu mehreren Jahren. Charakteristisch ist das Vorkommen verschiedener Farbtöne in der Läsion, wobei schwarzbraune Farbtöne und rosa bis graue Farbtöne besonders typisch sind. Die Abgrenzung der Läsion zur normalen Haut ist häufig sehr unregelmäßig. Das **noduläre Melanom (NM)** ist mit einem prozentualen Anteil von 10-15% der zweit häufigste Melanom-Typ. Charakteristisch für das noduläre Melanom ist das schnelle Wachstum. Dabei wird häufig die radiale Phase

übergangen und geht direkt in die vertikale Phase und invasives Wachstum über. Diese Eigenschaft des nodulären Melanoms geht mit einer schlechteren Prognose einher. Der Subtyp **Lentigo maligna Melanom (LMM)** wird in 10% aller Melanomfälle diagnostiziert. Es tritt überwiegend im Gesicht bei älteren Patienten auf, da Sonnenexposition über lange Zeit ein Risikofaktor für diesen Typ ist. Das LMM entwickelt sich oft erst nach vielen Jahren aus der Vorläuferläsion *Lentigo maligna*. Aus braunen bis dunkelbraunen oder schwarzen Pigmentläsionen kann sich ein papulöser Anteil oder eine Ulzeration entwickeln. Da aber das LMM sehr langsam über einen langen Zeitraum entsteht, geht es oftmals mit einer guten Prognose einher. **Akral-lentiginöse Melanome (ALM)** treten überwiegend bei dunkelhäutigen Populationen auf. Das ALM findet man hauptsächlich an Fußsohlen, Handinnenflächen oder Fuß- und Fingernägeln und stellt 4-5% der gesamten Melanomfälle dar. Charakteristisch ist es dem SSM sehr ähnlich. Es ist durch braune bis schwarze unregelmäßige Hautläsionen gekennzeichnet, die ein primär radiales, horizontales Wachstum aufweisen, welches in einem späteren Stadium in eine invasive, vertikale Wachstumsphase übergeht. Desweiteren gibt es noch einige Typen, die nicht klassifizierbar sind, oder Mischformen darstellen.

Um nun Aussagen über den Verlauf der Krankheit machen zu können, nimmt man sich die Kenntnis von prognostischen Faktoren zur Hilfe. Auf Grundlage der prognostischen Faktoren wurden offizielle Schemata zur Stadieneinteilung geschaffen. Man unterscheidet im Wesentlichen klinische und histopathologische prognostische Faktoren, von denen einige im folgendem genauer erläutert werden. Sie sind in Tabelle 1-1 nach Stadien aufgelistet.

Stadium I + II	Stadium III	Stadium IV
<ul style="list-style-type: none"> • Geschlecht • Alter • Lokalisation • Tumordicke • Invasionsstufe • Ulzeration 	<ul style="list-style-type: none"> • Ulzeration des Primärtumors • Lokalisation des Primärtumors • Alter • Anzahl befallener Lymphknoten • Mikro-vs. Makrometastasen • Extranodale Ausdehnung • In-transit-Metastasen/ Satellitenmetastasen 	<ul style="list-style-type: none"> • Art der befallenen Organe • Anzahl der Metastasen • Karnofsky-Index • LDH

Tabelle 1-1: Prognostische Faktoren beim malignen Melanom in Abhängigkeit der Stadien (Näher, Enk, 2006)

Die Dicke des Tumors wurde zuerst von Breslow 1970 als sogenannter Breslow-Index eingeführt (Breslow A 1970). Er wird bestimmt von der oberen Granularzellschicht der Epidermis zur tiefsten Tumorzelle. Die Bestimmung der Eindringtiefe nach Breslow ist der aussagekräftigste prognostische Faktor (Keefe et al., 1991; MacKie et al., 2000).

Ein weiterer prognostischer Faktor stellt die Einteilung in fünf Invasionsstufen nach Clark dar. Hierbei wird die Bedeutung der Mikroinvasion von Melanomzellen durch die Schichten der Dermis und des subkutanen Fettes klassifiziert (Clark et al., 1969). In Kapitel 1.2 wird auf das Modell der Melanomentstehung und Progression nach Clark et al (1987) genauer eingegangen. In mehreren Studien hat sich allerdings ergeben, dass die Tumordicke prognostisch wesentlich aussagekräftiger als die Invasionsstufe ist.

Weiterhin stellt die Ulzeration einen weiteren wichtigen prognostischen Faktor dar. Dieser ist definiert als eine teilweise oder vollständige Unterbrechung der Epidermis über dem Tumor. Die Ulzeration eines Melanoms wird als prognostisch ungünstig beschrieben. Der Anteil ulzerierter Tumoren nimmt mit steigender Tumordicke zu und beträgt 6% für dünne Melanome $\leq 1\text{mm}$ und 63 % für dicke Melanome $>4\text{mm}$. Das Auftreten von Fernmetastasen ist hoch signifikant mit der Ulzeration des Primärtumors korreliert.

Die Lokalisation des Tumors wird für Aussagen zum Verlauf der Krankheit ebenfalls mit einbezogen. Man unterscheidet dabei zwischen Melanomen der Extremitäten, die mit einer besseren Überlebensrate korreliert sind und Melanomen des Kopfes, des Nackens oder des Stamms, die mit einer ungünstigen Prognose korreliert sind.

Auch durch den Nachweis von Metastasen lassen sich Aussagen zum Krankheitsverlauf machen. Wichtig ist dabei die Anzahl der befallenen Lymphknoten. Man unterscheidet Mikrometastasen, die klinisch oder apparativ nicht festzustellen aber histopathologisch nachweisbar sind. Im Gegensatz dazu werden Makrometastasen bei der klinischen oder apparativen Untersuchung festgestellt und histopathologisch bestätigt. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Mikrometastasen 65 % und bei Makrometastasen 32 %. Desweiteren haben auch intralymphatische Metastasen eine Aussagekraft. Hierbei handelt es sich um Satelliten-Metastasen, die in einem Areal von 2 cm um den Primärtumor angeordnet sind. Intransit-Metastasen, sind zwischen Primärtumor und Lymphknoten angesiedelt. Die Kombination aus Satelliten-und/oder Intransit-Metastasen und Lymphknoten-Metastasen ist prognostisch ungünstiger, als eine Konstellation alleine.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass das Alter einen prognostischen Faktor für den Krankheitsverlauf darstellt. Das Alter in Abhängigkeit der Tumordicke hat einen negativen Effekt auf das Überleben. Es wird angenommen, dass der Zusammenhang zwischen höherem Alter und kürzerem Überleben auf eine Abnahme der Immunfunktion mit zunehmendem Alter zu erklären ist.

Die Beurteilung dieser histopathologischen prognostischen Faktoren werden inzwischen durch die Analyse molekularer Marker wie z.B. S100 oder HMB45 ergänzt, die unmittelbare Aussagen über das biologische Verhalten des Tumors zulassen (Näher, Enk, 2006).

1.2 Modell der Melanomentstehung und Progression

Das maligne Melanom ist unter den Hauttumoren dasjenige mit der höchsten Malignität. Man nimmt an, dass diese Entartung und Progression anlehnend an ein fünfstufiges Modell nach Dr. Wallace Clark und Kollegen abläuft (Clark et al., 1987; Clark, 1991) (Abb. 1-1). Bei der ersten Stufe des Modells handelt es sich um den gewöhnlichen, angeborenen (kongenitalen) Nävus bzw. um erworbene melanozytäre

Nävi (1). Bei normalen Nävi handelt es sich um benigne Läsionen, die durch Proliferation von Melanozyten entstehen. Diese müssen aber nicht zwangsläufig in ein malignes Stadium übergehen. Allerdings haben Personen, mit einer hohen Anzahl an normalen Nävi (100-150) ein siebenfach höheres Risiko am malignen Melanom zu erkranken, als Personen mit einer geringen Anzahl an gewöhnlichen Nävi (0-15). Dysplastische (fehlentwickelte) Nävi mit strukturellen Veränderungen stellen die Vörläuferform des Melanoms dar. Die Melanozyten dieser Nävi sind epithelartig und zeigen atypisches Wachstum, welches zur Bildung von Nestern führt. Morphologisch haben sie bereits ihre typischen dendritischen Ausläufer verloren (Hsu et al., 2002; Hsu et al., 2000a; 2000b). Die radiale Wachstumsphase (RGP) des Primärmelanoms stellt das erste maligne Stadium der Melanomentwicklung und Progression dar (3). Die Melanomzellen zeichnen sich durch Wachstum in der Epidermis, Proliferation und geringe Differenzierung aus. In der nächsten Stufe, die auch als vertikale Wachstumsphase (VGP) (4) bezeichnet wird, durchdringen die entarteten Melanozyten die Basalmembran, wandern in die Dermis ein und erlangen die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Das metastasierende Melanom (5) stellt die letzte Stufe des Progressionsmodells dar. Die Melanomzellen können sich über Blut – und Lymphgefäße ausbreiten und Fernmetastasen in Organen wie Leber, Milz oder Gehirn bilden. Die Melanomentstehung läuft aber nicht zwangsläufig nach dem fünfstufigen Modell ab. Einzelne Stufen der Melanomentwicklung können dabei übersprungen werden. Desweiteren ist beschrieben, dass ein Melanom direkt durch die maligne Transformation normaler Melanozyten entstehen kann (Miller und Mihm, Jr. 2006; Hsu et al. 2002; Clark, Jr. et al. 1984).

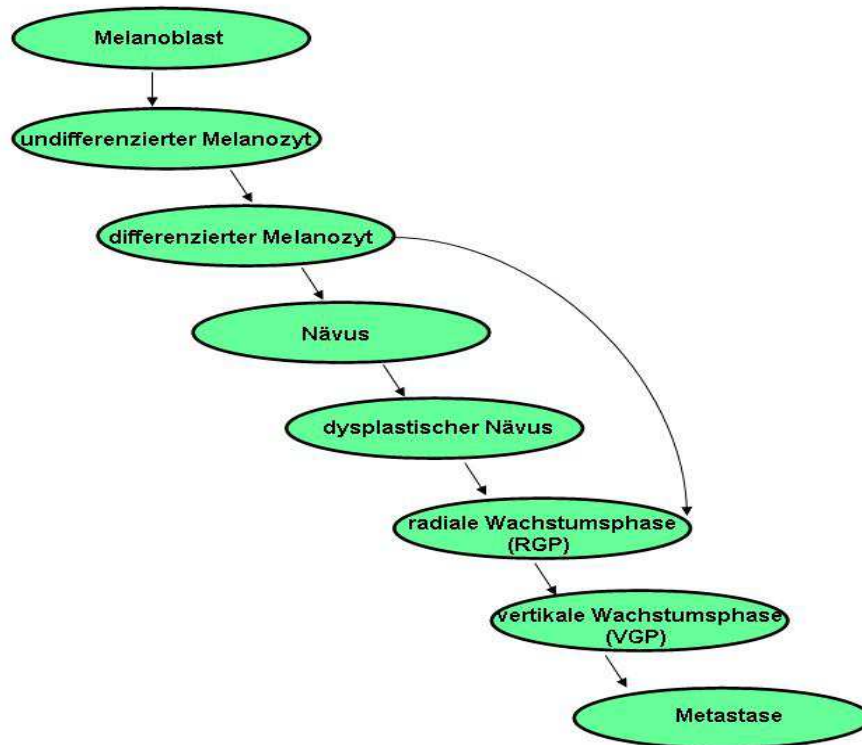


Abbildung 1-1: Fünfstufiges Modell der Tumorprogression bei Melanomen nach Clark et al (1987)

1.3 Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung und Progression

Das maligne Melanom ist für 80 % der Todesfälle von Hauttumoren verantwortlich. Nur 14 % der Patienten mit der Diagnose eines metastasierenden Melanoms überleben die nächsten fünf Jahre. Daher ist es besonders wichtig, molekulare Mechanismen, die in der Entwicklung und Progression des Melanoms beteiligt sind, aufzuklären. Dies ist sehr hilfreich, um molekulare Profile betreffend Aggressivität, klinischem Verhalten und Ansprechen auf Therapiemöglichkeiten zu identifizieren. Außerdem können Patienten so nach entsprechenden Prognosen unterteilt und behandelt werden. In normalen Melanozyten existiert eine komplexe molekulare Maschinerie, die Veränderungen, die zu Entartungen führen können, in Schach hält. Verschiedene Moleküle, die für unterschiedliche Signalwege wichtig sind, sind in ihrer Regulation so verändert worden, dass sich nun aus normalen Melanozyten metastasierte Zellen entwickeln. Obwohl noch viele Mechanismen, die zur Entstehung von malignen Melanomen führen, noch weitgehend unbekannt sind, weiß man inzwischen doch, dass einige Gene und Signalwege in der Pathogenese des malignen Melanoms eine wichtige Rolle spielen. Im Folgenden werden nun die

wichtigsten zellulären Veränderungen, die auch Relevanz für meine Arbeit haben und für die Entwicklung des Melanoms wichtig sind, beschrieben. Dabei wird ein Schwerpunkt auf Transkriptionsfaktoren gelegt, deren Fehlregulation für die Entstehung und Progression des Melanoms bedeutende Auswirkungen haben.

1.3.1 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren haben eine entscheidende Funktion in Wachstum, Differenzierung und Apoptose der Zellen. Für die Melanomprogression und das Tumorstadium ist ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Faktoren zuständig, bei dem auch Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Veränderungen in der transkriptionellen Regulation durch Mutationen oder Veränderung der Tumorumgebung stellen ein frühes Ereignis in der Tumorentwicklung dar. Damit können Veränderungen in der Expression oder Aktivität von Transkriptionsfaktoren viele schwerwiegende Modifikationen nach sich ziehen, die die Tumorentwicklung und Progression begünstigen.

Im folgenden Abschnitt werden nun einige Transkriptionsfaktoren vorgestellt, die für die Entwicklung und Progression des Melanoms von großer Bedeutung sind.

Die Familie der **Ets-1** Transkriptionsfaktoren besteht aus über 30 Mitgliedern, wie etwa Ets-1, Ets-2, ERG, Elk-1 und Elk-2. Sie sind hoch konserviert und tragen alle die sogenannte „Ets-Domain“ in der N-terminalen Region des Proteins. Ets Transkriptionsfaktoren induzieren die Transkription, indem sie mit Purin – reichen Sequenzen (GGAA/T) interagieren. Ets-1 ist 51 kDa groß und wird durch Phosphorylierung reguliert. Ets-1 wiederum kann Gene wie MMP-1, MMP-3, MMP-9, uPA und Integrin β 3 positiv regulieren. Diese Zielgene sind bekannte Moleküle in der Melanomprogression (Sato et al., 2001). Vor allem für MMP-1 ist bekannt, dass durch einen Polymorphismus im Promoter eine zusätzliche Ets-1 Bindestelle generiert wurde, was zu einer verstärkten Transkription von MMP-1 führt. Damit können Melanomzellen vermehrt Matrix abbauen und somit die Invasion erleichtern (Rutter et al., 1998) Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Ets-1 im Melanom stark überexprimiert und aktiviert wird, wohingegen in Melanozyten keine Ets-1 Expression vorliegt (Rothammer et al., 2007). Dabei kommt Ets-1 eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese zu. Die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF2, die von Melanomzellen sezerniert werden, induzieren die Ets-1 Expression in Endothelien,

was zu einer vermehrten Degradation der umgebenden extrazellulären Matrix durch MMPs und uPA führt und somit die Migration von Endothelzellen Richtung Tumor erleichtert (Oikawa, 2001). Der Transkriptionsfaktor Ets-1 wird in der Arbeit auf Seite 93 noch mal eine Rolle spielen.

Der Transkriptionsfaktor **NFκB** (**N**uclear **f**actor of **κ**appa light chain gene enhancer in **B**-cells) ist an vielen Prozessen wie Entzündungen, Apoptose und Zellwachstum beteiligt (Baeuerle and Henkel, 1994; Pahl et al., 1999). Er wird durch eine Vielzahl von Stimuli wie Zytokinen, freie Radikale, UV-Licht und bakterielle und virale Partikel aktiviert. Für NFκB existieren fünf Untereinheiten, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p150 und p52/p100. N-Terminal besitzen diese Untereinheiten eine Rel-Homologie Domäne, die für die DNA Bindung, die Bindung des NFκB Inhibitors IκappaB und die Dimerisierung der Untereinheiten zuständig ist. Der aktive Transkriptionsfaktor NFκB liegt normalerweise als Homo - oder Heterodimer vor, wobei die Kombination p50/p65 in Säugetieren am häufigsten vorkommt. Das aktive Heterodimer bindet mit hoher Affinität an die DNA-Bindesequenz 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' (Pu: Purin, Py: Pyrimidin). Damit kann eine Fülle von Zielgenen aktiviert werden. Diese gehören unter anderem zur Gruppe der immunregulatorischen/inflammatorischen Gene, anti-apoptotische Gene, Gene, die positiv die Zellproliferation beeinflussen oder Gene, die NFκB selbst negativ regulieren können (Karin et al., 2001). Im malignen Melanom liegt der Transkriptionsfaktor NFκB konstitutiv aktiv vor. NFκB kann z.B. die Expression von Cyclin D1 regulieren, ein wichtiges Molekül in der Regulation des Zellzyklus, was zu einer Steigerung der Proliferation führt. Auch Mediatoren der Invasivität und Metastasierung des Melanoms werden durch NFκB reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass N-cadherin, VCAM-1, ICAM, ELAM-1 und Matrixmetalloproteinasen Zielgene von NFκB sind (Amiri and Richmond, 2005; Kuphal and Bosserhoff, 2006).

SNAIL ist ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor im Melanom. Aus physiologischer Sicht ist er am epithelialen zum mesenchymalen Übergang in der Embryogenese beteiligt. Zur Familie der SNAIL Transkriptionsfaktoren zählen Slug, Escargot, Smug, Scratch, Worniu und Ces1. Alle Mitglieder der SNAIL Familie exprimieren 4-6 Zinkfinger Motive im konservierten C-Terminus. Der Transkriptionsfaktor bindet spezifisch an die DNA-Bindesequenz 5'-CANNTG-3', auch bekannt als „E-Box“ Motiv. Der Transkriptionsfaktor SNAIL maßgeblich an der

Erlangung der Invasivität von Melanomzellen beteiligt. SNAIL besitzt die Fähigkeit, die Transkription von E-cadherin, ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül (siehe Kapitel 1.4), zu reprimieren, indem der Transkriptionsfaktor an den E-cadherin - Promoter bindet (Poser et al., 2001; Cano et al., 2000). Der Verlust von E-cadherin wird im malignen Melanom häufig beobachtet und geht mit Tumorprogression einher (siehe Kapitel 1.4.3). Werden Melanozyten, die normalerweise keine Expression von SNAIL aufweisen, mit SNAIL überexprimiert, so kann man beobachten, dass die Expression von E-cadherin in Melanozyten verloren geht. Hingegen, wenn man Melanomzelllinien mit einem asSNAIL Konstrukt transfiziert, kommt es zur Re-expression von E-cadherin, was mit einem weniger invasiven Phänotyp einhergeht (Poser et al., 2001). Neben E-cadherin kann SNAIL noch weitere Gene wie die Matrixmetalloproteinase -2 (MMP-2) EMMPRIN (extracellulär matrix metalloproteinase inducer), SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteins), TIMP-1, Gewebetyp des Plasminogenaktivators, RhoA (RhoGTPase) und Notch-4, alles Gene, die am epithelialen zu mesenchymalen Übergang beteiligt sind, im Melanom regulieren (Kuphal et al., 2005).

Für das Melanom sind aber noch weitaus mehr Transkriptionsfaktoren bekannt, die an der Entwicklung und Progression des malignen Melanoms beteiligt sind. Ein prominenter Transkriptionsfaktor ist z. B. **Mitf** (microphthalmia-associated transcription factor), auch bekannt als „Master-Regulator der Melanozyten“, da er essentiell für die Entwicklung und Differenzierung von Melanozyten aus Neuralrohrvorläuferzellen (Melanoblasten) ist (Fuse et al., 1999). Mitf spielt außerdem eine wichtige Rolle bei Proliferation und Überleben von Melanozyten vor und während der Migration von Neuralleistenzellen (Opdecamp et al., 1997). Weiterhin besitzt Mitf DNA Konsensus-Bindestellen im Promoter von Genen, die an der Pigmentierung beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um Tyrosinase, Tyrp-1, DCT und pmel17 (Steingrimsson et al., 2004). Die Konzentration der Mitf-Protein Mengen sind entscheidend für die unterschiedlichen Funktionen von Mitf. Hohe Expressionsspiegel von Mitf lassen auf Differenzierungsvorgänge schließen. Tatsächlich führen hohe Mitf - Mengen in Melanomzellen zu Verringerung der Proliferation (Wellbrock et al., 2005). Deshalb liegt in invasiven Melanomzellen nur eine geringe Mitf Expression vor (Hoek et al., 2008). Es konnte auch gezeigt werden, dass Mitf im Melanom Zielgene mit ganz widersprüchlichen Verhalten aktiviert. So sind z.B. CDK2 und Bcl-2, welche für Zellzyklus-Progression und Überleben zuständig sind, als Zielgene von Mitf

beschrieben worden, genau wie p21 CIP1 und p16 INK4a, die, im Gegensatz dazu, zum Zellzyklusstopp führen (Carreira et al., 2005; Loercher et al., 2005., Du et al., 2004; McGill et al., 2002). Außerdem ist Mitf in den beiden anti - apoptotischen Signalwegen ERK und PI3K involviert (Goding et al., 2000). Aufgrund der gegensätzlichen Zielgene ist bislang jedoch noch unklar, ob Mitf eher zum Überleben oder zum Wachstumsstopp von Melanozyten und Melanomzellen führt (Palmieri et al., 2009). Wahrscheinlich ist die „Dosis“ des Transkriptionsfaktors ausschlaggebend.

Die Regulationsereignisse des Wnt - Signalweges werden durch die Transkriptionsfaktorfamilie **LEF/TCF** (**l**ymphoid **e**nhancer **f**actor/ **T**-**c**ell specific **f**actor) vermittelt. Vier Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorfamilie sind bekannt: LEF-1, TCF-1, TCF-3 und TCF-4. Diese besitzen die so genannte „HMG-Box“-DNA Bindedomäne und erkennen die DNA-Bindungssequenz 5'-AGATCAAAGGG-3' (van de Wetering et al., 1991). Mit Hilfe des Ko-Aktivators β -Catenin wird die Transkription diverser Zielgene, wie z.B. c-myc und cyclinD1 aktiviert. In Abwesenheit des Wnt-Signals wird β -Catenin im Zytoplasma durch den GSK3 β (**g**lycogen **s**ynthase **k**inase 3 beta)/ Axin/APC (**a**denomatous **p**olyposis **c**oli)- Komplex der Degradation zugänglich gemacht. Bei aktivem Wnt Signal ist der Komplex inhibiert, β -Catenin kann in den Zellkern translozieren und hier die transkriptionelle Aktivität von LEF/TCF positiv beeinflussen (Polakis, 2000). Das CREB Bindungsprotein CBP, CtBP (**C**-**t**erminal **b**inding **p**rotein) und Groucho können im Kern an TCF binden und verhindern damit die Transkription von Zielgenen. Die Transkriptionsfaktoren LEF/TCF gelten als Tumorinduktoren, allerdings wird die Aktivierung durch β -Catenin im malignen Melanom noch diskutiert, da in vielen Melanomzelllinien bislang kaum β -Catenin im Zellkern nachgewiesen werden konnte. Die beschriebenen Transkriptionsfaktoren Ets-1, NF κ B, SNAIL, Mitf, LEF/TCF haben in der Arbeit eine mehr oder weniger große Relevanz und sind daher genauer beschrieben.

Andere Transkriptionsfaktoren, die im Melanom wichtig sind, auf die aber hier nicht näher eingegangen wird, sind unter anderem **AP-2 alpha** und **Brn-2**. AP-2alpha ist im Melanom vor allem beim Übergang von RGP zu VGP transkriptionell aktiv. Generell kann man sagen, dass die Expression von AP-2 alpha die Metastasierung unterdrückt (Poser und Bosserhoff 2004). Der Transkriptionsfaktor Brn-2 wird durch B-RAF im MAPK Signalweg positiv reguliert. Wird Brn-2 in Melanozyten überexprimiert, die normalerweise kein Brn-2 exprimieren, kommt es zur Verstärkung

der Proliferation. Melanomzellen, die Brn-2 verloren haben, vermindern ihre Proliferation (Goodall et al., 2004).

Die Familie der **AP-1** Transkriptionsfaktoren, der im Melanom eine wichtige Rolle zugeordnet ist, wird im nächsten Kapitel (Kapitel 1.3.2) ausführlich behandelt, da sie Gegenstand der Forschungsarbeit sind.

1.3.2 Die Rolle des Transkriptionsfaktors AP-1 und seines Mitglieds c-Jun in der Entstehung des malignen Melanoms

AP-1 (activating protein-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der sich aus Proteinen verschiedener Sub - Familien zusammensetzt. Die Mitglieder dieser Untereinheiten besitzen alle eine basic leucine zipper Domäne (bZIP), die wichtig für die Dimerisierung zweier Proteine und für die Bindung an die DNA ist. Mitglieder der Jun Familie sind c-Jun, JunB und JunD, zur Fos Familie zählen c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2. Diese zwei Sub-Familien werden als die wichtigsten AP-1 Proteine bezeichnet. Daneben gibt es noch ATF Proteine (activating transcription factor), wie z. B. ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1 und JDP2. Diese zählen ebenfalls zu den AP-1 Proteinen (Eychene et al., 2008). Durch die vielen einzelnen Mitglieder der verschiedenen Untereinheiten ist eine hohe Anzahl an kombinatorischen Möglichkeiten gegeben. Je nach Kombination zweier Proteine ändert sich die Bindungsspezifität und das Spektrum regulierter Gene (Hess et al., 2004). Jun Proteine können sowohl Homo – als auch Heterodimere bilden, wohingegen Fos Proteine nur mit Mitgliedern der Jun Familie dimerisieren können. Jun – Fos Heterodimere binden bevorzugt an eine heptomere DNA - Konsensus Bindesequenz, bekannt als TPA responsive element (TRE) (5'-TGA(C/G)TCA-3') (Abb. 1-2). Jun – ATF Dimere hingegen binden mit höherer Affinität an das cyclic AMP responsive element (CRE) (5'-TGACGTCA-3') (Chinenov et al., 2001). Die einzelnen Jun und Fos Proteine besitzen ein ganz unterschiedliches Transaktivierungspotential. Während c-Jun, c-Fos und FosB starke Transaktivatoren sind, haben JunB, JunD, Fra-1 und Fra-2 nur ein geringes Potential zur Transaktivierung. Diese Gruppe kann überdies als Repressor dienen, indem sie mit den starken Transaktivatoren um die AP-1 Bindestelle kompetitiert oder „inaktive“ Heterodimere mit c-Jun, c-Fos oder FosB bildet (Hess et al., 2004).

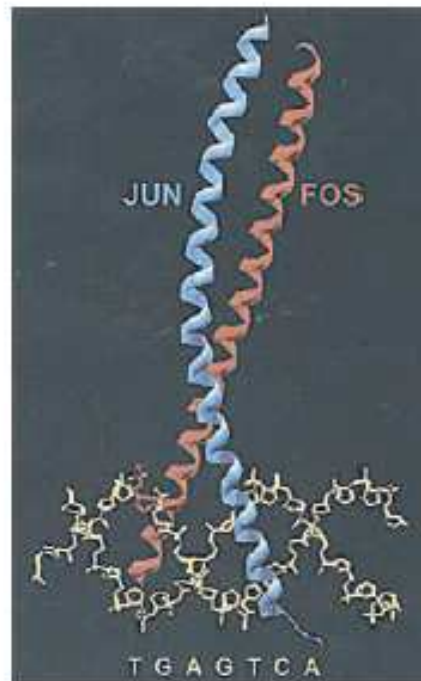


Abbildung 1-2: Jun-Fos Heterodimer. Die bZIP Domänen von Jun und Fos bilden eine X-geformte alpha helikale Struktur, die an die AP-1 Bindesequenz 5'-TGAGTCA-3' bindet. Die bZIP Domäne von Jun ist in blau, die von Fos in rot gezeigt. Die DNA ist in gelb gezeigt (Hess et al., 2004).

Die AP-1 Aktivität wird über eine ganze Reihe von physiologischen und pathologischen Stimuli reguliert. Dazu zählen Zytokine (TNFalpha, IL-1), Wachstumsfaktoren, Stress - Signale, Infektionen oder onkogene Stimuli (H-Ras, v-Src) (Shaulian et al., 2001). Die AP-1 Aktivität, die in der Zelle vorliegt wird auf unterschiedliche Weise reguliert. Verändert werden können entweder die Transkription der AP-1 Untereinheiten, die Kontrolle der Stabilität ihrer mRNA, posttranskriptionelle Prozesse oder Turnover bereits existierender AP-1 Untereinheiten oder die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und Ko-Faktoren. Der Mechanismus der posttranskriptionellen Kontrolle erfolgt vor allem durch die c-Jun N-terminale Kinase (JNK), die bevorzugt c-Jun phosphoryliert (Karin et al., 1997; Wagner et al., 2001). Dies wird aber in einem eigenen Kapitel (Kapitel 1.4.1) genauer erläutert. Liegt AP-1 aktiv in der Zelle vor, ist es an Prozessen wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Migration und Inflammation beteiligt (Hess et al., 2004; Shaulian et al., 2002; Wagner et al., 2005). Dabei agiert c-Jun als positiver Regulator der Proliferation, wohingegen JunB gegenteilige Effekte induziert und

Proliferation und Transformation eher inhibiert. Desweiteren können AP-1 Proteine die extrazelluläre Matrix modulieren und so Invasivität und metastatische Verhalten von Tumorzellen fördern, indem sie die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, MMP-7, MMP-9, uPA), die wichtig für den Abbau von Matrix sind, und somit Tumorzellen die Extravasation erleichtern, induzieren (Eferl et al., 2003). Desweiteren ist bekannt, dass AP-1 die Angiogenese fördern kann (Folkman et al., 2003). Außerdem ist es mit Proliferation und Angiogenese in invasiven Mamma- (Vleugel et al., 2006) und Lungen-Karzinomen (Maeno et al., 2006) assoziiert. Die verschiedenen Funktionen in der Tumorigenese des AP-1 Transkriptionsfaktors sind in Abbildung 1-3 zusammengefasst.

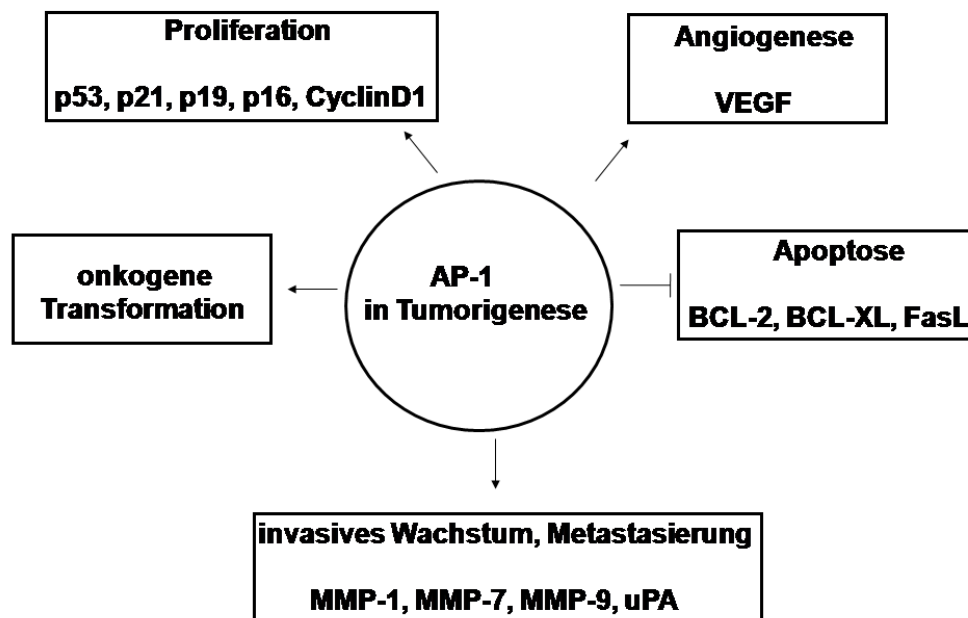


Abbildung 1-3: Funktion von AP-1 in der Tumorigenese. AP-1 Proteine regulieren onkogene Transformation, Proliferation, Apoptose, Angiogenese, invasives Wachstum und Metastasierung durch Veränderung der Expression kritischer Zielgene (verändert nach Jochum et al., 2001). Genannt sind die jeweiligen Zielgene.

1.3.3 AP-1 und JNK Signalweg

JNK (Jun-N-terminal Kinase) gehört zur Familie der MAPKinasen. Es wird überwiegend durch inflammatorische Zytokine und Stress induziert (Karin et al., 1995; Weston und Davis 2002). Diese Stimuli führen durch MEKK4 und MEKK7 zur Phosphorylierung von Threonin 183 und Tyrosin 185 des JNK Proteins (Davis et al., 2002), was eine Aktivierung von JNK nach sich zieht. Das wichtigste Substrat von

JNK ist der Transkriptionsfaktor c-Jun. Die Regulation von c-Jun erfolgt hauptsächlich über Phosphorylierung, welche seine Stabilität und Aktivität beeinflusst (Morton et al., 2003; Laine and Ronai, 2005). JNK phosphoryliert c-Jun Serin 63, Serin 73, Threonin 91 und Threonin 93, die wichtig für seine transkriptionelle Aktivität sind (Minden et al., 1994). Darüberhinaus wird phosphoryliertes c-Jun vor Ubiquitinierung und Degradation geschützt (Fuchs et al., 1996). Im Gegensatz dazu führt Phosphorylierung an Threonin 239 und Serin 234 zur Ubiquitinierung und Abbau des c-Jun Protein. Dafür ist überwiegend das Protein Fbw7 verantwortlich (Wei et al., 2005). Die Aktivität von JNK kann bis zum Maximum gesteigert werden, indem es zusätzlich durch PKC (Protein Kinase C) und seinem Koaktivator RACK phosphoryliert wird (Lopez-Bergami et al., 2005a; Liu et al., 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der JNK Signalweg zusammen mit konstitutiv aktiven ERK, das vor allem im Melanom über B-Raf bzw Ras Mutationen aktiviert wird, die c-Jun Stabilität im malignen Melanom beeinflusst (Lopez-Bergami et al., 2007). In Abbildung 1-4 dargestellt, führt aktives ERK zum einen zur Aktivierung von CREB, was die Transkription von c-Jun induziert, und zum anderen hemmt aktives ERK durch Phosphorylierung an Serin9/21 die Kinase GSK3. Somit kann c-Jun nicht abgebaut werden. Aktiviertes c-Jun induziert nun die Expression von Zielgenen induzieren wie z.B. CyclinD1. RACK1, auch ein Zielgen von c-Jun, kooperiert mit PKC, die zusammen JNK bis zum Maximum aktivieren. Damit ist in der Zelle gewährleistet, dass c-Jun weiter phosphoryliert und damit aktiviert wird.

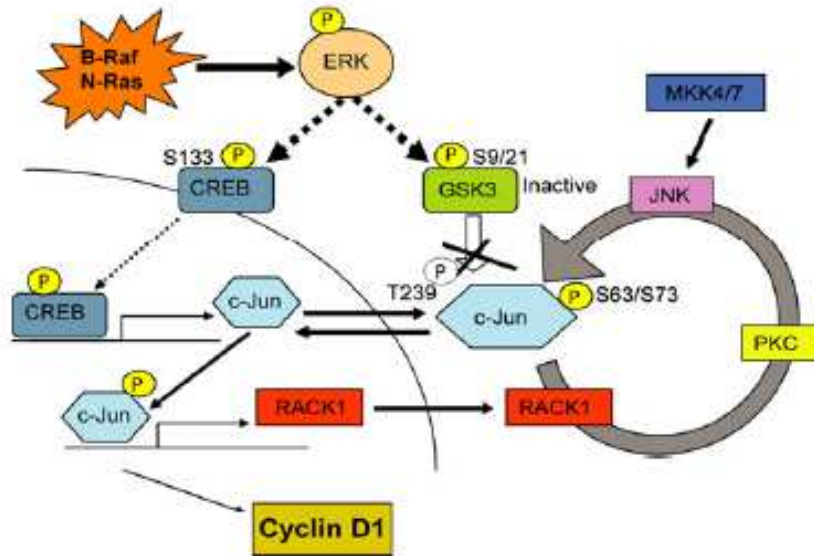


Abbildung 1-4: Modell des ERK Crosstalk mit JNK Signalling. Aktives ERK erhöht die Stabilität von c-Jun durch phosphorylierungsabhängige Inaktivierung von GSK3 und induziert c-Jun Transkription durch Aktivierung von CREB. C-Jun induziert daraufhin die Transkription von RACK1, welches zusammen mit PKC und MEKK4/7, die Aktivität von JNK maximiert, um die c-Jun Stabilität und Aktivität aufrechtzuerhalten (Lopez-Bergami et al., 2007).

Im folgenden Kapitel wird nun der bereits angesprochene Erk-Signalweg, dem im Melanom eine bedeutende Rolle, auch in Hinblick auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, zukommt, genauer beschrieben.

1.3.4 Ras/Raf/Mek/ERK-Signalweg

Der MAPK (**m**itogen-**a**ctivated **p**rotein **k**inase) Signalweg ist einer der bedeutendsten Signalwege in der Zelle und reguliert Prozesse wie Proliferation, Zellüberleben, Wachstum und Invasion. Die Signaltransduktion verläuft wie in Abbildung 1-5 dargestellt. Extrazelluläre Faktoren binden an Rezeptor Tyrosinkinasen, dabei werden die Tyrosinreste autophosphoryliert, was zu einer Konformationsänderung führt. Diese Phospho-Tyrosine werden von dem Adapterprotein Grb2 (Growth-factor-receptor-bound protein 2) erkannt und gebunden und der GDP/GTP Exchange Faktor SOS (Son of Sevenless) an die Zellmembran rekrutiert. SOS induziert den Switch von inaktiven Ras-GTPasen (H-Ras, K-Ras, N-Ras) zu aktivierten Ras-GTPasen, indem gebundenes GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Aktiviertes Ras bindet mit hoher Affinität an Raf Serine/Threonin Kinasen, induziert dessen

Translokation an die Zellmembran und aktiviert es durch Phosphorylierung. Die Raf-Familie besteht aus drei Mitgliedern: A-Raf, B-Raf und C-Raf/Raf-1. Um B-Raf zu aktivieren, reicht die Bindung an aktiviertes Ras aus, allerdings werden für die Aktivierung von A-Raf und C-Raf zusätzliche Signale benötigt. Alle drei Isoformen der Raf-Familie benötigen Ras als Upstream-Aktivator. MEK ist der einzige Downstream-Effektor. Aktiviertes Raf phosphoryliert und aktiviert nun die zwei Serin/Threonin Kinasen Mek1 und Mek2. Aktiviertes Mek wiederum phosphoryliert Erk1 und Erk2. Erk stellt den Endpunkt der Ras/Raf/Mek/Erk Signalkaskade dar und besitzt zum einen Substrate im Zytoplasma, wie RSK90, es ist aber auch in der Lage in den Zellkern zu translozieren, um dort eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (z.B. Elk, c-Myc) zu aktivieren und so die Genexpression von Integrinen, MMPs etc zu regulieren.

In ruhenden Melanozyten lässt sich keine aktive MAPK Signalkaskade nachweisen, sie kann jedoch durch extrazelluläre Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren) aktiviert werden und Prozesse der Differenzierung und des Wachstums in Gang setzen (Tada et al., 2002). Allerdings spielt die Dysregulation des MAPK-Signalweges durch konstitutive Aktivierung in der Pathogenese des Melanoms eine entscheidende Rolle (Fecher LA., 2008). Hier sind vor allem die Moleküle Ras und B-Raf nennenswert. Ras Mutationen treten im Melanom nur zu 9-15 % auf. Dabei ist N-Ras die am meisten mutierte Isoform im Melanom. Mutationen in N-Ras führen zur Stabilisierung des Proteins, da es immer als GTP gebundenes Protein (van Elsas et al., 1994; Carr et al., 1994) vorliegt und aktiviert so konstitutiv Raf-Proteine.

B-Raf somatische Missense Mutationen werden in 50-70 % aller malignen Melanome identifiziert. Für 80 % dieser Mutationen ist die Transition einer einzelnen Base (T→A) verantwortlich, was einen Aminosäureaustausch zur Folge hat (Glutamat statt Valin; V600E). V600E B-Raf besitzt eine 10 fach erhöhte Kinase Aktivität als Wildtyp B-Raf (Davies H et al., 2002). Erwähnenswert ist, dass bereits gutartige Nävi eine solche V600E Mutation im B-Raf Gen tragen. Damit reicht B-Raf V600E nicht aus, um eine maligne Entartung der Zellen herbeizuführen. Um ein malignes Melanom zu entwickeln, müssen noch zusätzliche molekulare Ereignisse stattfinden, die möglicherweise direkt mit einer B-Raf Mutation in Zusammenhang stehen (Kumar et al., 2007).

Aber auch andere Mechanismen als die Mutation von N-Ras und B-Raf können zur konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges in invasiven Melanomen beitragen. (1) Zum einen kann eine verstärkte Bindung von Ras an Rezeptor Tyrosin Kinasen, wie z.B. c-Kit, die eine gesteigerte Expression aufzeigen, vorliegen (Campbell et al., 2007; Curtin et al., 2005). (2) Weiterhin kann auch Wildtyp Ras Protein überexprimiert werden und sich an der Zellmembran akkumulieren (Campbell et al., 2007). (3) Die Überexpression von Wachstumsfaktoren wie z. B. HGF (hepatocytic growth factor) oder FGF (fibroblast growth factor) können auch zur konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges führen (Panka et al., 2006). (4) Schließlich ist noch bekannt, dass durch die verminderte Expression von Negativ-Regulatoren von ERK ein gesteigertes Signalling stattfinden kann (Panka et al., 2006).

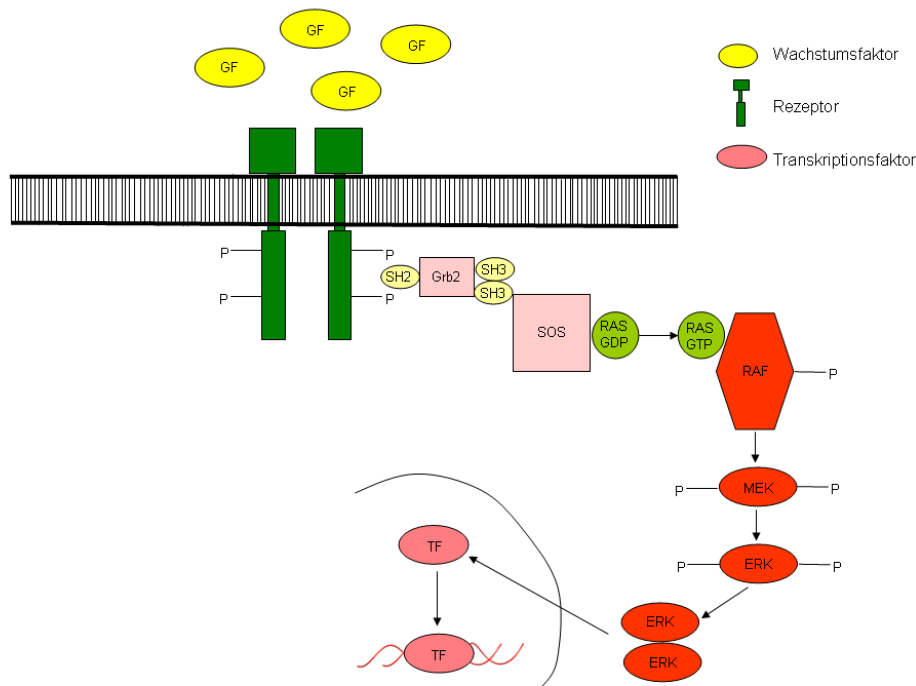


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des RAS/RAF/MEK/ERK Signalweges. Äussere Signale induzieren den Rezeptor, es kommt zur Dimerisierung der Rezeptortyrosinkinase und Autophosphorylierung der Tyrosine der Rezeptoren. An die Phosphotyrosine binden die Adaptorproteine Grb2 und SOS, die das G-Protein Ras aktivieren. Ras-Guanidindiphosphat (Ras-GDP) wird zu Ras-Guanidintriphosphat (Ras-GTP) aktiviert. Durch die Konformationsänderung kann aktiviertes Ras an RAF (A-Raf, B-Raf, C-Raf/Raf-1) binden, rekrutiert es an die Zellmembran und es kommt zur Aktivierung von Raf. Für die Aktivierung von B-Raf reicht allein die Bindung an RAS aus, wohingegen für die Aktivierung von A-Raf und Raf-1 zusätzliche Signale benötigt werden. Die Aktivierung von Raf-1 ist ein komplexer, mehrschrittiger Prozess, bei dem weitere Kinasen wie Src oder Protein Phosphatase 2 (PP2A) beteiligt sind. Aktiviertes Raf phosphoryliert und aktiviert Mek, welches wiederum Erk durch Phosphorylierung aktiviert. Erk hat zum einen Zielmoleküle im Zytoplasma, kann aber

auch im Zellkern die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren übernehmen, die dann an die DNA binden und so Zielgene anschalten. Abbildung verändert nach Meier F., (2005).

Man stellt sich nun die Frage, wie es zum Anschalten der eben beschriebenen Signalwege (JNK/Erk-Signalweg) im Melanom kommt. Wachstumsfaktoren haben hier eine wichtige Rolle, aber auch Adhäsionsmoleküle an der Zellmembran sind nicht nur „starre“ Verbindungen zwischen Zellen, sondern sind ebenso für die Induktion verschiedener Signalwege von Bedeutung. In dieser Arbeit wird ganz deutlich gezeigt, dass Zelladhäsionsmoleküle, wie E-cadherin, ein entscheidender Faktor in der Entwicklung des Melanoms sind. Deswegen wird im folgenden Kapitel näher auf das Adhäsionsmolekül E-cadherin eingegangen.

1.4 Die Adhäsionsmoleküle

Epitheliale Zellverbände grenzen eine Vielzahl von Organen und Geweben gegen die äußere Umgebung ab. Die Struktur epithelialer Gewebe beruht einerseits auf sehr engen Kontaktstellen zwischen zwei Epithelzellen unter Anlagerung der beiden Membranen und andererseits auf adhärenente Verbindungen (adherens junctions), die sich zwischen zwei Epithelzellen oder einer Epithelzelle und der extrazellulären Matrix ausbilden. Adhärenente Oberflächenmoleküle stellen einen Kontakt zwischen Aktinfilamenten in der Zelle und der Membran einer anderen Zelle her. Weiterhin bestimmen sie die Gewebe - und Organarchitektur multizellulärer Organismen. Außerdem regulieren Zelladhäsionsmoleküle dynamische Prozesse in der Morphogenese während der Embryonalentwicklung, der Regeneration von Organen und den generellen Ablauf des Zellverhaltens (Wagener et al., 1999). Generell gibt es vier verschiedene Gruppen von strukturellen Typen, die an Verbindungen zwischen den Zellen beteiligt sind. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um Cadherine. Klassische Cadherine vermitteln Zell-Zell-Adhäsionen zwischen zwei Zellen (Gumbiner et al., 2000). Desmosomale Cadherine sind in Desmosomen präsent und sind hier für Zell-Zell-Kontakte verantwortlich (Kowalczyk et al., 1999). Im nächsten Kapitel wird auf diese Gruppe genauer eingegangen. Zur zweiten Gruppe zählt man Proteine, die vier Transmembrandomänen mit intrazellulärem Amino - und Carboxy-Ende besitzen. Das Gap Junction Protein Connexin und die Tight Junction Proteine Occludine und Claudine zählen dazu (Goodenough et al., 2009; Stevenson et al, 1999; Morita et al., 2004). Die dritte Gruppe beinhaltet all die

Proteine, die Immunglobulin-like Repeats besitzen, wie z.B. Mel-Cam (MUC18, CD146) (Lehmann et al., 1989). Integrine bilden die vierte Gruppe. Obwohl Integrine vorrangig in Zell-Matrix-Interaktionen involviert sind, spielen sie auch eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion (Hynes et al., 1992). So interagiert z.B. Integrin $\alpha4\beta1$, exprimiert auf primären Tumorzellen mit VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) auf Endothelzellen (Johnson et al., 1999).

1.4.1 Klassifizierung der Cadherin Familie

In der Epidermis des Menschen wird die geordnete Struktur des Gewebes durch Ausbildung spezifischer Adhäsion zwischen zwei Zelltypen aufrechterhalten. Zwischen Keratinozyten und Melanozyten besteht eine Balance, die durch verschiedene Membranmoleküle aufrechterhalten wird. Die Superfamilie der Cadherine sind solche Membranmoleküle, die für die Adhäsion zwischen Zellen sorgt. Inzwischen zählt man mehr als 100 Mitglieder zur Superfamilie der Cadherine. Man teilt die Superfamilie in fünf Unterfamilien ein: (1) Klassische Cadherine, dazu zählen E-, N-, P und R-Cadherine. Sie sind in adhärenenten Verbindungen lokalisiert. (2) Die nächste Gruppe wird als klassische Cadherine des Typs 2 bezeichnet. VE-, K- und H-Cadherine sind hier gruppiert. (3) Desmosomale Cadherine formen desmosomale Verbindungen, dazu gehören Desmocollin und Desmoglein. (4) Protocadherine sind überwiegend an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt. (5) Das Protein Flamingo ist ein Cadherin –verwandtes Molekül, das siebenmal die Zellmembran passiert. Es existieren aber auch Cadherine, die man keiner speziellen Gruppe zuordnen kann, wie z.B. Fat oder Dachsous (Nollet et al., 2000, Peinado et al., 2004). Die Struktur der Cadherin-Superfamilie ist sehr konserviert, lediglich die extrazelluläre Domäne setzt sich bei den Unterfamilien aus einer unterschiedlichen Anzahl von Cadherindomänen zusammen (Takeichi, 1995).

Eine besondere Funktion übernimmt das VE-Cadherin. Es konnte gezeigt werden, dass aggressive Melanomzellen endothelähnliche Funktionen ausüben können, indem sie endothel-assoziierte Gene exprimieren. Somit sind sie in der Lage dreidimensionale Kanäle aus Laminin zu formen, um einen Flüssigkeitsstrom zu erzeugen. Dies wird als „vasculogenic mimicry“ bezeichnet. Das heißt, dass Krebszellen ihre Sauerstoff – und Nährstoffversorgung sicherstellen, indem sie gefäßartige Netzwerke ausbilden, obwohl keine Endothelzellen und Fibroblasten zur

Verfügung stehen. VE-Cadherin ist maßgeblich an der vaskulären Nachahmung beteiligt (Maniotis et al., 1999).

1.4.2 Die Rolle des Adhäsionsmolekül E-cadherin in der Haut

Die menschliche Haut ist ein komplexes Organ, das aus Epidermis und Dermis, getrennt durch eine Basalmembran, besteht. Beide Schichten haben eine einzigartige Architektur, die ganz fein auf die Funktionen ihrer zellulären Bestandteile abgestimmt ist. In der Epidermis stellen die Keratinozyten die erste Barriere gegen äußere Einflüsse dar. Die Melanozyten befinden sich an der epidermalen-dermalen Grenze und verteilen sich jeweils zwischen 5-10 Keratinozyten. Dies wird als „epidermal-melanin Unit“ bezeichnet. Die Basalmembran hindert dabei die Melanozyten in die Dermis vorzudringen (Jimbow et al., 1976). Innerhalb dieser Einheit, transportiert der Melanozyt über seine zahlreichen Dendriten Melanosomen, die mit Melanin gefüllt sind, zu ca. 36 Keratinozyten, um diese vor UV-Licht zu schützen. Unter normalen physiologischen Bedingungen liegen die Melanozyten in einem Verhältnis von 1:5-1:8 zu den Keratinozyten vor (Li und Herlyn, 2000). Die Dermis, mit ihren mesenchymalen Komponenten, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, versorgen die Haut mit Nährstoffen, bestimmen die Stabilität und die Dicke der Haut.

Es konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten durch die Wechselwirkung mit Melanozyten einen Einfluß auf Proliferation und Lokalisation der Melanozyten ausüben, sowie auf die Zahl der Dendriten (Hsu et al., 2000a; Hsu et al., 2000b). Keratinozyten benötigen einen Zell-Zell-Kontakt durch E-cadherin, um den Einfluss auf das Melanozytenwachstum nicht zu verlieren.

Das Zelladhäsionsmolekül E-cadherin (Uvomorulin, epitheliales Cadherin) ist für die Kommunikation zwischen den Melanozyten und Keratinozyten besonders wichtig. Es handelt sich dabei um ein 120 kDa transmembranes Glykoprotein, das die Adhäsion durch Kalziumbindung aufrecht erhält. Weiterhin gilt es als epithelialer Marker gesunder Melanozyten. Diese Zellen, die neuroektodermalen Ursprungs sind, wandern während der Embryogenese von der Neuralleiste in die Epidermis der Haut ein. Dort bauen sie über E-cadherin Kontakt zu den Keratinozyten auf (Silye et al., 1998). E-cadherin wird in der Embryonalentwicklung bereits im Blastomer-Stadium exprimiert und findet sich später in allen Epithelien. Der Verlust von E-cadherin ist

nicht mit dem Leben vereinbar, denn Embryonen von knock-out Mäusen sterben bereits im Stadium der Blastozyste ab (Larue et al., 1994; Marrs und Nelson, 1996).

E-cadherin besteht strukturell aus einer extrazellulären Domäne, die sich aus fünf homologen Einheiten zusammensetzt (EC1-EC5). Die Zelladhäsion und Konformation des Moleküls wird durch Bindung von Kalzium stabilisiert. Die extrazelluläre Domäne EC1 hat die wichtigste Funktion bei der homophilen Erkennung zweier Cadherin Moleküle. Die Aminosäuresequenz His-Ala-Val-, die am C-Terminus der Untereinheit EC1 lokalisiert ist, spielt eine wichtige Rolle in der spezifischen Erkennung zweier E-cadherin Moleküle. Diese spezifische Aminosäureabfolge ist bei den klassischen Cadherinen, wie E (epithelial), N (neural), P (placental), VE (vascular endothelial) oder R (retinal) Cadherinen homolog (Wheelock und Johnson, 2003). Der genaue Ablauf der Dimerisierung ist bislang noch wenig verstanden. Man geht davon aus, dass sich die Bausteine der Cadherine parallel aneinander lagern und Dimere bilden. Dabei werden die E-Cadherin Dimere durch Kalziumionen aufrechterhalten (Nagar et al., 1996). E-cadherin bildet damit eine homophile Interaktion mit einem weiteren E-cadherin Molekül einer anderen Zelle (Nose et al., 1988).

Der intrazelluläre Teil der Cadherine ist über Catenine mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Dabei bindet β -Catenin direkt an den zytoplasmatischen Teil von E-cadherin. Alpha - Catenin verbindet dann über β -Catenin E-cadherin mit dem Zytoskelett. Gamma Catenin weist auch starke Homologien zu β -Catenin auf. Es wurde erstmals in Desmosomen lokalisiert und Plakoblobin genannt, bis die eindeutige Struktur von gamma-Catenin ermittelt wurde. Es kann die Position von β -Catenin ersetzen, aber die physiologische Rolle von gamma-Catenin ist noch unbekannt (Hülken et al., 1994; Sanders et al., 1999). An Cadherine können noch Tyrosinphosphatasen und p120, welches regulatorische Fähigkeiten besitzt, binden (Reynolds et al., 2007; Shibamoto et al., 1995; Staddon et al., 1995) (Abb. 1-6).

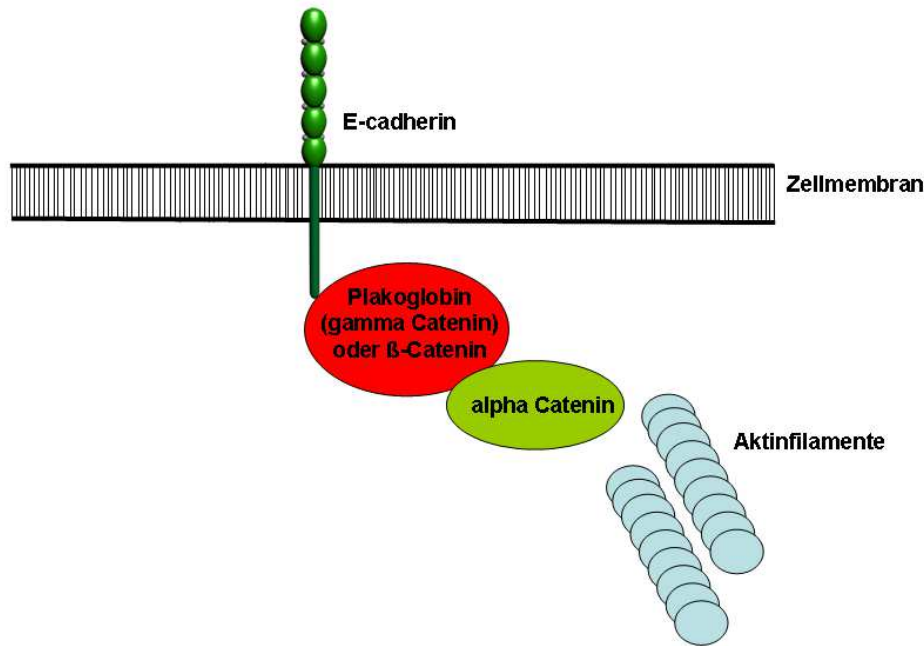


Abbildung 1-6: Der Cadherin-Catenin Komplex. An den zyttoplasmatischen Teil von E-cadherin bindet Plakoglobin (gamma Catenin) oder β -Catenin welches über alpha Catenin mit Aktinfilamenten verbunden ist (verändert nach Herlyn, 2004).

1.4.3 Die Rolle von E-cadherin bei der Entstehung des malignen Melanoms

Zelladhäsionsmoleküle sind nicht nur wichtig für Zell-Zell-Interaktionen während der Embryonalentwicklung, sondern sind auch an allen Schritten der malignen Progression beteiligt. Der Verlust und die Deregulation von Zelladhäsionsmolekülen gehen einher mit dem Auflösen des Gewebeverbandes, Zellen können sich lösen und abwandern (Behrens et al., 1999; Handschuh et al., 1999). Dieser Prozess wird epitheliale-mesenchymale Transition genannt (EMT).

In vielen Tumorarten (Kolon-, Mamma- und Prostatakarzinom) ist bereits beschrieben, dass das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-cadherin verloren ist. Auch für das maligne Melanom konnte in immunhistochemischen Studien gezeigt werden, dass E-cadherin im Melanomgewebe, verglichen mit Melanozyten oder benignen Nevi, stark vermindert exprimiert oder komplett verloren gegangen ist (Sanders et al., 1999; Silye et al., 1998). In der Epidermis der Haut ist E-cadherin an der Interaktion von Keratinozyten-Keratinozyten oder Keratinozyten-Melanozyten beteiligt. Ist nun die E-cadherin Expression verloren, so geht ein regulierender Einfluss der Keratinozyten verloren und die veränderten Melanozyten können unkontrolliert wachsen (Hsu et al., 2000; Poser et al., 2001; Silye et al., 1998). Wird E-cadherin in

Melanomzellen re-exprimiert, durch Transfektion eines E-cadherin Expressionsplasmides, so konnten Studien zeigen, dass die Tumorentwicklung gestoppt wurde und die Melanomzellen zu einem normalen melanozytären Phänotyp zurückkehren (Hsu et al., 2000a). Deswegen wird E-cadherin auch als Tumorsuppressor bezeichnet (Birchmeier und Behrens, 1994).

Zu dem Verlust von E-cadherin in Melanomzellen kommt es zur Neuexpression von N-cadherin, die das Adhäsionsverhalten der Melanomzellen verändert. Durch den Verlust von E-cadherin und der Neuexpression von N-cadherin sind die Melanomzellen in keinem stabilen Zell-Zell-Verband mehr mit den Keratinozyten und können sich so sehr viel leichter aus dem Primärtumor lösen und invasiver werden. Der Cadherin „Switch“ führt dazu, dass sich die Zellen nun an Fibroblasten, Endothelzellen und weiteren Zelltypen in der Dermis, die ebenfalls N-cadherin auf ihrer Oberfläche tragen, binden können (Li et al., 2001). N-cadherin sorgt weiterhin für die Aktivierung von antiapoptotischen Signalen und ermöglicht den Tumorzellen damit eine Vermeidung der Apoptose durch Inhibierung des proapoptotischen Proteins Bad (Sanders et al., 1999) (Abb. 1-7).

Auf molekularer Ebene ist für den Verlust von E-cadherin im malignen Melanom der Repressor Snail verantwortlich. Im Promoterbereich des E-cadherin Gens befindet sich nahe am Transkriptionsstart zweimal die sog. E-Box Sequenz (siehe Kapitel 1.3.3), an die Snail spezifisch bindet. Die Bedeutung bei der Repression der Promoteraktivität konnte bereits bei verschiedenen Tumorarten (Mamma- und Prostatakarzinom) nachgewiesen werden. Die Snail Expression ist in Melanomzellen deutlich höher als in normalen humanen epidermalen Melanozyten (Poser et al., 2001).

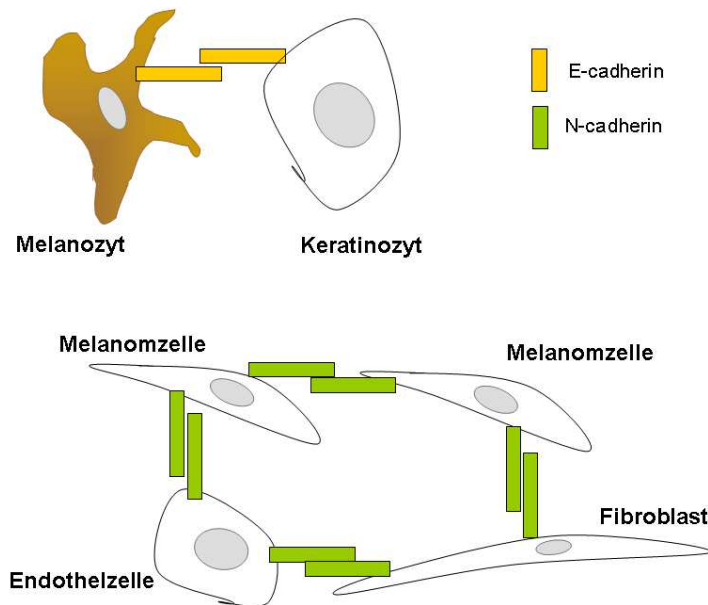


Abbildung 1-7: Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen der Epidermis und Dermis. Dargestellt sind die Adäsionsmoleküle E-cadherin (gelb) und N-cadherin (grün).

1.4.4 E-cadherin Zelladhäsion und Zytoskelett

Die Zell-Zell-Adhäsionsverbindung (adherens junction, AJ) ist eine spezielle Region auf der Plasmamembran, die intrazellulär mit zytoskelettalen Aktinfilamenten verbunden ist und der E-cadherin als Adhäsionsmolekül dient. Über die Catenine (siehe Kapitel 1.4.2) ist E-cadherin mit dem Aktinzytoskelett verbunden und stabilisiert so die Struktur der adhärenen Verbindungen. Studien zeigten, dass mutierte Cadherin Moleküle, die keine Bindung zu den Cateninen herstellen konnten, auch nicht in der Lage waren an das Aktinzytoskelett zu binden (Takeichi, 1988, 1991). Die Interaktion von E-cadherin- β -Catenin- α -Catenin-Aktinfilamenten bei Zell-Zell Kontakten ist ein dynamischer Vorgang (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). Die Interaktion von E-cadherin mit dem Aktinzytoskelett spielt in den ersten Schritten der interzellulären Interaktion nur eine untergeordnete Rolle, allerdings ist diese Interaktion bei der späteren Stabilisierung der Adherens Junction außerordentlich wichtig (Chu et al., 2004). Die Bildung stabiler Zell-Zell-Kontakte ist von strukturellen Veränderungen des Aktinzytoskeletts begleitet. Dabei spielt die Aktinpolymerisierung eine wichtige Rolle. G-Aktin (globular actin) akkumuliert in der Nähe der neugeformten Adherens Junction und ko-lokalisiert mit E-cadherin. Bei der Aktinpolymerisierung bindet G-Aktin das Nukleotid ATP. Damit ist es in der Lage sich mit weiteren G-Aktinen zu verbinden. Die entstehende Kette von

Aktinmonomeren bildet so die filamentöse Form der Aktinfilamente, bekannt als F-Aktin. Das Filament besteht aus zwei Ketten polymerisierter G-Aktine, die sich helixartig umeinanderwinden. In der Zelle liegen beide Formen im Gleichgewicht vor (Holmes et al., 1990). Jedes Aktinfilament besitzt ein (+) und (-) Ende. ATP-Aktin bindet bevorzugt am (+) Ende und das Filament wächst an diesem Ende. Am (-) Ende wird ATP schneller zu ADP hydrolysiert, sodass an diesem Ende weniger G-Aktin angelagert wird und sich das Filament von dieser Seite verkürzt. Aktinmonomere binden daraufhin wieder ATP und können so am (+) Ende angebaut werden. Dieser schnelle Kreislauf ist für Zellbewegungen enorm wichtig (Pollard et al., 2004). Studien zeigen, dass bei der Filamentbildung der Arp2/3 Komplex eine wichtige Rolle spielt und in die Bildung von Zell-Zell-Kontakten involviert ist (Verma et al., 2004; Kovacs et al., 2002). Die Arp2/3 Aktivatoren N-WASP, WAVE-2 und Cortactin ko-lokalisieren mit E-cadherin und sind so an der Bildung von stabilen Zell-Zell-Kontakten beteiligt (Ivanov et al., 2006; Yamazaki et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass durch Inhibierung dieser Moleküle keine neuen Adherens Junctions mehr gebildet werden konnten und darüberhinaus bereits bestehende Verbindungen abgebaut wurden (Ivanov et al., 2005; Yamazaki et al., 2007). Es gibt zahlreiche Daten, die belegen, dass auch GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, Cdc42) an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind. RhoGTPasen übertragen extrazelluläre Signale innerhalb der Zelle und führen so zu Umstrukturierung des Zytoskeletts und damit der Zellmorphologie. Sie sind aber auch an der Zellmotilität, Aggregation, Polarität und Kontraktion der Zelle verantwortlich (Bar-Sagi und Hall, 2000; Narumiya, 1996; Takai et al., 2001). Außerdem können sie Genexpression regulieren (Coso et al., 1995; Hill et al., 1995). RhoGTPasen sind Guanin Nukleotid bindende Proteine, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Status wechseln (Abb. 1-8). Die Aktivität der Rho-Proteine wird von Guanin Nukleotid Exchange Faktoren (GEFs) und GTPase-activating Proteinen (GAPs) kontrolliert. GEFs aktivieren die GTPasen, indem sie den Austausch von GDP zu GTP vermitteln, wohingegen GAPs die Hydrolyse von GTP zu GDP fördern und damit für den inaktiven Zustand der GTPasen verantwortlich sind. In Zellen liegen die GTPasen überwiegend im inaktiven Zustand vor, gebunden an GDI (GDP dissociation inhibitors).

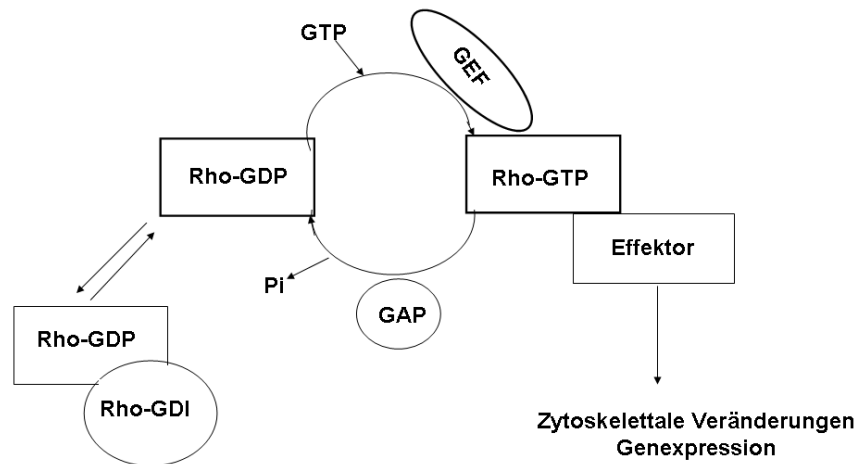


Abbildung 1-8: Der RhoGTPase Zyklus. Rho-Proteine wechseln zwischen einem inaktiven, an GDP-gebundenen und aktiven, an GTP-gebundenen Zustand. Der Wechsel zwischen den Zuständen wird von GEFs (Guanin Nukleotid Exchange Faktoren), GAPs (GTPase-activating Proteinen) und GDIs (GDP dissociation inhibitors) kontrolliert. *Pi*, *Phosphat* (nach Malliri und Collard, 2003).

Werden die GTPasen aktiviert, binden sie an verschiedene Effektor-Moleküle, wie Dia oder Rock und induzieren so ganz unterschiedliche Effekte (Abb. 1-9) (Malliri und Collard, 2003). Wird Dia von den GTPasen aktiviert, führt dies in der Zelle zu Aktinpolymerisation. Daraufhin werden E-cadherin und alpha-Catenin an der Zellperipherie lokalisiert und stabile Adherens Junctions können gebildet werden. Außerdem wird das Mikrotubuli Netzwerk organisiert. Dies führt zur zusätzlichen Stabilisierung der Zellverbindungen. Wird im Gegenzug Rock durch RhoGTPasen aktiviert, so kommt es zur Kontraktion von Acto-Myosin und Zell-Zell-Verbindungen werden zerstört (Sahai et al., 2002). Vor allem die Familie der Rho Proteine (RhoA, B, C) sind in die Aktivierung von Dia und Rock involviert.

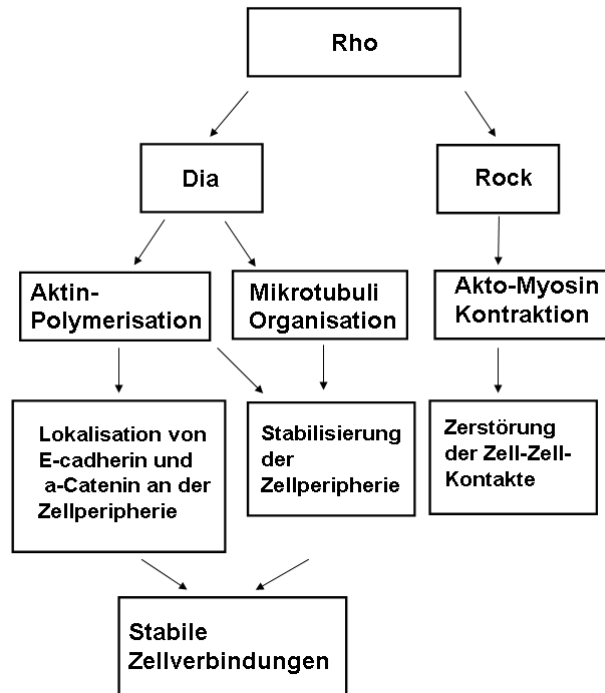


Abbildung 1-9: Rho aktiviert verschiedene Signalwege zur Regulation von Zellverbindungen. Rho kann zum einen Rock aktivieren und so Zell-Zell-Kontakte zerstören, wohingegen Aktivierung von Dia zur Stabilisierung der Zellverbindungen führt (verändert nach Sahai und Marshall, 2002).

Im Melanom ist hauptsächlich RhoC stark überexprimiert und an Metastasierungsprozessen beteiligt (Hakem et al., 2005; Ruth et al., 2006; Boone et al., 2009). Die GTPase Rac1 hingegen ist an der Arp2/3 vermittelnden Aktinpolymerisierung beteiligt. PIP3 (PI3K-phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat) aktiviert verschiedene GEFs (P-Rex-1, SWAP-70, Vav1, Sos1, Tiam1) und führt so zur Aktivierung von Rac1. Aktiviertes Rac1 wiederum führt zur Expression von WASP-Proteinen, die daraufhin die Arp2/3 vermittelnde Aktinfilamentbildung stimuliert. Obwohl bereits ein Vielzahl von Daten belegen, dass die Rho GTPasen eine entscheidende Rolle an der Bildung von Aktinfilamenten und Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten haben, sind die molekularen Grundlagen hierfür noch weitgehend unbekannt. Für das Melanom konnte anhand der Arbeit bereits aufgeklärt werden, dass die RhoGTPase RhoC über Umstrukturierungen des Zytoskeletts eine entscheidende Rolle bei der Regulation von c-Jun hat.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Materialien

Amaxa GmbH, Köln	Cell line Nucleofector Kit R
Amersham, Braunschweig, Deutschland	[γ - ³² P]-dATPs, 3000 Ci/mmol, NICK™- Columns
BD Biosciences, Bedford, USA	Anti E-cadherin Antikörper
BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene Round-Bottom Tube
Becton Dickinson Labware, NJ, USA	Chamber slides
Behrens, Hamburg	Agar
BioRad, Richmond, USA	Immun- Blot™ PVDF Membran
Biomol, Hamburg, Deutschland	Nocodazol
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA	SeaKem® LE agarose
Carl Zeiss, München-Hallbergmoos	AxioCam, MR Grab Software

Calbiochem, San Diego, USA	SP600125 (JNK-Inhibitor), Taxol, SB203580, SB202190, PD98059 (ERK-Inhibitor)
Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA	Anti ERK-Antikörper, Anti p-ERK-Antikörper, Anti JNK-Antikörper, Anti p-c-Jun-Antikörper
Corning Incorporated, New York, USA	Einmalartikel für Zellkultur
Cytoskeleton, Denver, USA	Actin Binding Protein Biochem Kit; F-actin Labeling Kit
Dako, Hamburg	DAKO-LSAB2-Kit
Invitrogen, Carlsbad, USA	Lipofectamine PLUS™ Reagent, Lipofectamine™ Reagent, HiPerfect Reagent, SuperScript™ II, RNase H-Reverse Transkriptase, SeeBlue® Plus2, Ready-Load™ 100 bp DNA Ladder, pcDNA3 Vektor, pcDNA3.1
Invitrogen Gibco, Carlsbad, USA	Trypsin
Millipore, Eschborn	alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität, Einmalsteril-Filter
New England Biolabs GmbH, Frankfurt	Restriktionsendonukleasen, NEBuffer für Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase
Nunc GmbH & Co., Wiesbaden	Lab-Tek™ Chambered Coverglass
Origene, Rockville, USA	sh c-Jun Plasmide

PAA, Pasching, Österreich	Dulbeccos Modified Eagle Medium
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fötales Kälberserum, PBS (phosphate buffered saline), Penicillin/Streptomycin
Pierce, München	BCA Protein Assay Kit
Promega, Heidelberg	Dual-Luciferase® Reporter Assay System, pRLTK Vektor, pGL3-basic Vektor, LacZ Vektor; AP-1 Oligonucleotide, AP-1 Luc-Plasmid
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium, Melanozyten
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi und Maxi Kit, RNeasy® Mini Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, siRNAs
Roche Diagnostics, Mannheim	Taq-Polymerase, RNase A, Primer 'random' (#1034731), Light Cycler Kapillaren
Roth, Karlsruhe	Roti® Load1 4x- Konz., Roti® Load 4x, nicht denaturierend
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Anti c-Jun-Antikörper, Anti p-JNK-Antikörper, Anti RhoC-Antikörper, Anti Snail-Antikörper
Sigma, St. Louis, USA	Acrylamid 30 % Lösung und 40% Trypsin, BSA (bovine serum albumin), TEMED, Monoklonaler Anti β- Aktin

Antikörper

Stratagene, Heidelberg	Epicurian Coli® XL2-Blue MRF' Ultra-kometent Cells
TaKaRa, Shiga, Japan	Anti E-cadherin-Antikörper, LightCycler DNA Master, SYBR Green
Upstate, Lake Placid, USA	Anti-c-Jun-Antikörper
Vector Laboratories, Burlingame, USA	Vectashield Mounting Medium with DAPI
Whatman International Ltd, Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier
Zymed Laboratories Inc, San Francisco, USA	BCIP/NBT Substrate Kit

2.1.2 Geräte

Autoklaven

Tuttnauer/Systec, Wetzlar	Tischautoklav Modell 2540EL, Autoklav 2540 EK
---------------------------	---

Blotapparaturen

Whatman Biometra, Göttingen	Minigel Twin, Fastblot B34
-----------------------------	----------------------------

Brutschränke

Heraeus, Hanau	Zellinkubator CO2-Auto-Zero, Begasungsbrutschrank BB6220, CO2-Inkubator HeraCell 240
----------------	--

Gelelektrophoreseapparaturen

BioRad, München

Wide Mini Sub® Cell GT

Heiz- und Kühlblöcke

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer 5436, Thermomixer comfort, Thermomixer compact

Mikroskope

Zeiss, Jena, Leica Microsystems CMS, GmbH, Bensheim

Axiovert 10, Axiovert S100, Axio Imager Z1 DM IL Type 090-135.001

Spannungsgeräte

Amersham Pharmacia Biotech, Chalfont, England

Little Electrophoresis Power Supply 1001, Electrophoresis Power Supply 301

BioRad, München

PowerPac Basic, PowerPac HC

Sterilwerkbänke

Heraeus, Hanau

LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18

Thermocycler

MJ Research, Waltham, USA;

Peltier Thermal Cycler PTC- 200;

Roche Diagnostics, Mannheim

Light Cycler II

Waagen

Sartorius, Göttingen

R160P, L2200S

Zentrifugen

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5810R, MiniSpin Plus

Heraeus, Hanau

Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0

Kisker, Steinfurt

Tischzentrifuge

Roche Diagnostics, Mannheim

LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte

Applied Biosystems, Foster City, Californien; USA	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser
Amaxa GmbH, Köln	Nucleofector I
Bachofer, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 350 K, 254nm
Bandelin, Berlin	SONOPULS Ultraschall- Homogenisator HD2070, MS 72 Mikrospritze aus Titan
Berthold, München	Lumat LB 9507
Bühler, Edmund, Tübingen	Schüttler SM 25
Heidolph, Kehlheim	M Vortexer REAX 2000agnetührer MR 2000, MR 2002,
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
MWG Biotech, Ebersberg	ELISA-Reader Emax, Geldokumentationssystem 2001i
Savant, New York, USA	Speedvac Concentrator SC 110
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522
Xenox, Niersbach	Stab-Homogenisator 40/E

2.1.3 Bakterien

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF' Ultracompetent *Escherichia Coli*

2.1.4 Viren

Replikationsdefiziente Adenoviren:

Ad-E-cadherin

Der Ad – E-cadherin wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Meenhard Herlyn, The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania.

Ad-IkB

Der rekombinante replikationsdefiziente Adenovirus Ad5IkB, der IkB S32A/S36A exprimiert, wurde von Prof. Claus Hellerbrand, Innere Medizin I, Uniklinikum Regensburg zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Säugerzelllinien

HMB2	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
HMB2 -5	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit antisense MIA
HMB2 -8	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit antisense MIA
HMB2 LacZ	Humane Melanomzelllinie, stabil transfiziert mit LacZ
HTZ 19d	Humane Melanomzelllinie aus Hirnmetastase eines Melanoms
Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	DSMZ Nr.: ACC62, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Juso	DSMZ Nr.: ACC74, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Melanozyten	Humane primäre Melanozyten aus normaler Haut
Sk Mel 3	ATCC Nr.: HTB-69, Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase eines Melanoms
Sk Mel 28	ATCC Nr.: HTB-72, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
HaCaT	immortalisierte Keratinozytenzelllinie
A375	ATCC Nr.: CRL-1619, humane Melanomzelllinie aus Metastase eines Melanoms

2.1.6 Vektoren

pcDNA3

Der pcDNA3 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) wird zur Expression von Genen unter Kontrolle des CMV-Promotors in Säugerzelllinien benutzt.

pGL3 basic

Der pGL3 basic Vektor (Promega, Heidelberg) enthält eine modifizierte kodierende Region für das Glühwürmchen Luciferase Gen (*Photinus pyralis*) nach einer multiplen Klonierungsstelle zur Analyse von putativen Promoterregionen.

pRL-TK

Für die Transfektionskontrolle bei der Durchführung des Luciferase Assays wird der kommerziell erhältliche pRL- TK Vektor (Promega), der das Renilla Luciferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält, benutzt.

AP-1 LUC

Für das AP-1 Luciferase Plasmid (Luciferase Assay) wurde die AP-1 konsensus Bindungssequenz 5'-TGACTAA-3' siebenmal in den pLuc-MCS Vektor, der das Luciferase- Gen enthält, einkloniert.

Ets-1 Luciferase (Ets-1 Luc)

Für das Ets-1 Luciferase Plasmid (Luciferase Assay) wurde drei mal die Sequenz 5'-GATCTCGAGGAAGTGACTAACTGAGCACAGTCGA-3', mit der Ets-1 Binding Site (unterstrichen) bei PvuII und HindIII in den PTKFLUC Vektor, der das Luciferase-Gen enthält, einkloniert.

Zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. F. Soncin, Institut de Biologie de Lille.

Antisense MIA (asMIA für stabil transfizierte asMIA Zelllinien HMB2-5 und HMB2-8)

Für das asMIA Plasmid wurde die gesamte kodierende Sequenz von MIA revers in den pCMX-PL1 Vektor einkloniert. Da der pCMX-PL1 Vektor keine eukariontischen Resistenzgene für Antibiotika enthält wurden die Zelllinien HMB2-5 und HMB2-8 mit pcDNA3 kotransfiziert.

Antisense Snail (asSnail für stabil transfizierte asSnail Melanomzelllinien)

Ein antisense Snail Expressionsplasmid (Poser et al, 2001) wurde unter der Kontrolle eines CMV Promoters kloniert.

Dieses Plasmid war bereits in unserer Arbeitsgruppe vorhanden und wurde von Poser et al. (2001) charakterisiert.

DNJun (TAM67; dominant negativ mutierte Form von c-Jun Protein)

Deletion der Transaktivierungsdomäne von c-Jun resultiert in der dominant negativen Form von c-Jun Protein, welches die AP-1 Aktivität blockiert. TAM67 besitzt eine bZIP-Domäne und kann mit anderen Mitgliedern der Jun und Fos Familie dimerisieren. Dimere, die TAM67 enthalten, können an die DNA binden, besitzen aber keine Transaktivierungsaktivität.

Zur Verfügung gestellt von Frau Dr. L. Vardimon, Department of Biochemistry, Tel Aviv University.

Sh c-Jun (short hairpin c-Jun)

Ein short hairpin c-Jun Konstrukt wurde in ein pRS Plasmid unter der Kontrolle eines U6 Promoters kloniert. Dieses Plasmid wurde von der Firma Origene, USA erworben.

Die sh c-Jun Sequenz lautet folgendermaßen:

GCAAAGATGGAAACGACCTTCTATGCGA

DNRhoA/B/C (RhoA/B/C T19N)

Die cDNA RhoGTPasen RhoA/B/C wurden in einen pCDNA3.1 (Invitrogen) bei EcoR1 und Xho1 kloniert. Die T19N Mutation in den jeweiligen cDNAs führt zu einem dominant negativen Phänotyp. Die Plasmide wurden vom Missouri S&T cDNA Resource Center käuflich erworben.

asEts-1/ sense Ets-1

Hierfür wurde ein pCDNA3 Expressionsvektor (Invitrogen NV, Leek, Niederlande) der für die antisense Ets-1 bzw. sense Ets-1 cDNA kodiert ist, verwendet.

2.1.7 Oligonukleotide

Primer für RT- PCR und quantitative PCR

Die Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA Genosys, Steinheim synthetisiert.

Es wurde eine 100µM Stammlösung der Oligonukleotide durch lösen in H₂O

hergestellt und bei –20°C gelagert.

c-Jun forward	AAGTAAGAGTGCGGGAGGCA
c-Jun reverse	GGGCATCGTCATAGAAGGTCTG
MMP9 forward	GAGGTGCCGGATGCCATTACAGT
MMP9 reverse	CCGAGCTGACTGGACGGTGATG
MMP14 forward	GGAACCCTGTAGCTTTGTGTCTGTC
MMP14 reverse	TCTCTACCCTCAACAAGATTAGATTCC
E-cadherin forward	ATCCTCCGATCTTCAATCCCACCAC
E-cadherin reverse	GTACCACATTCGTCACTGCTACGTG
Snail forward	AATCGGAGCCTAACTACAAG
Snail reverse	AGGAAGAGACTGAAGTAGAG
RhoC forward	CTGAGAAGTGGACCCCAGAG
RhC reverse	CAAGGTAGCCAAAGGCACTG
RhoA forward	GAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTG
RhoA reverse	TTTCACCGGCTCCTGCTTCATCTTGG
Ets-1 forward	CGATCTCAAGCCGACTCTCA
Ets-1 reverse	CGAGGTATAGCGGGATTCTG
β-Aktin forward	CTACGTGGCCCTGGACTTCGAGC
β-Aktin reverse	GATGGAGCCGCCGATCCACACGG

2.1.8 Short Interfering RNA (siRNA)

Die siRNA wurde von der Firma Qiagen, Hilden synthetisiert.

E-cadherin siRNA Sequenz: TCGGCCTGAAGTGAAGTCGTAA

2.2 Medien, Antibiotika und Puffer

2.2.1 Medien zur Anzucht von E.coli und Säugerzellkulturen

Alle Zutaten des LB Mediums wurden in H₂O gelöst und autoklaviert, für Agarplatten wurde noch zusätzlich Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

Luria Bertani Medium

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

Für Platten: + 15g/l Agar

Zur Selektion: + 100µg/ml Ampicillin bzw.
+ 25µg/ml Kanamycin

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) PAA™ Österreich

Zusätze:

10% (v/v) FKS

0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin

NHEM Medium

PromoCell, Heidelberg

Einfriermedium	Pro 100 ml: 50 ml DMEM (mit 10 % FKS)
	30 ml FKS
	20 ml DMSO

2.2.2 Antibiotika

Ampicilin-Stammlösung (500x)	50 mg/ml in dest. H ₂ O (-20°C)
Geneticin- Stammlösung	100 mg/ ml in dest. H ₂ O (-20°C)
Kanamycin-Stammlösung (100x)	10 µg/ml in dest. H ₂ O (-20°C)

2.2.3 Puffer und Lösungen

RNAse A Lösung	10 mM Tris/ HCl pH 7,0
	10 mg/ ml RNAse A

Lösungen für die Zellkultur	PBS (Phosphate buffered saline) PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
------------------------------------	---

Lösungen für die Plasmidisolierung aus *E.coli*

Lösung I	50 mM Glukose
	25 mM Tris/HCl pH 8,0
	10 mM EDTA
Lösung II	0,2 M NaOH
	1% SDS
Lösung III	60ml 5 M NaOAc
	11,5ml Eisessig
	28,5ml H ₂ O

Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung)

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1-2% (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (10x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 40% (v/v) Saccharose
Ethidiumbromidlösung	0,04% in H ₂ O bidest

Lösungen und Gele für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteinauftrennung)

SDS-Page-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
12,5%-Trenngel	31,25% (v/v) Acrylamid:Bis 40% 37,5% (v/v) 1 M Tris pH 8,8 0,1% (v/v) SDS 0,05% (v/v) APS 0,05% (v/v) TEMED
4%-Sammelgel	10% (v/v) Acrylamid:Bis 40% 12% (v/v) 1 M Tris pH 6,8 0,1% (v/v) SDS 0,05% (v/v) APS 0,05% (v/v) TEMED

Lösungen für Western Blot:

Western Blot-Transferpuffer	10% (v/v) Methanol
	25 mM Tris
	190 mM Glycin
PBS (10x)	80g/l NaCl
	2,0g/l KCl
	14,4g/l Na ₂ HPO ₄
	2,4g/l KH ₂ PO ₄
	mit HCl auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren
Blockierungslösung	3% BSA in PBS

Lösung zur Isolation von Gesamtprotein

RIPA Puffer	50 mM Tris- HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1% Nonidet® P40
	0,5% Natriumdesoxycholat
	0,1 % SDS
	Protease Inhibitoren

Gellösungen und Puffer für Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Natives Polyacrylamidgellösung (6%)	8ml Acrylamid (30%)
	1ml 10x TBE
	200 µl APS
	50 µl TEMED
	H ₂ O ad 40 ml
5x Bindepuffer	25 mM HEPES, pH 7,8

	25 mM MgCl ₂
	250 mM KCL
	1 mM EDTA
	25 mM DTT
	50% Glycerin
Ladepuffer	80% Formamid
	10 mM NaOH
	1 mM EDTA
	0,1 % Xylencyanol Blau
	0,1 % Bromphenolblau
Laufpuffer 1x TBE	10xTBE:
	900 mM Tris/HCl
	900 mM Borsäure
	20 mM EDTA

Lösung für Immunhistochemie

Citrat-Puffer (10mM) pH = 6,2	2,1g Citronensäuremonohydrat
	1L H ₂ O

2.3 Methoden

Experimente, bei denen keine anderen Reaktionstemperaturen angegeben werden, fanden bei Raumtemperatur statt. Alle molekularbiologischen Arbeiten, Arbeiten mit Bakterien und Säugerzellen wurden in sterilen Gefäßen und mit sterilen Lösungen durchgeführt.

2.3.1 Arbeiten mit E.Coli

2.3.1.1 Kultivierung

E.coli Kulturen wurden auf festen Nährboden oder in flüssiger Schüttelkultur angezogen. Als Selektionsantibiotikum wurden Kanamycin oder Ampicillin zum Nährmedium zugesetzt. Die Antibiotikaresistenz wurde dabei vom eingeführten Plasmid codiert. Für Schüttelkulturen wurde eine Einzelkultur mit einer sterilen Spitze gepickt und in Bakterienröhrchen mit Nährmedium überführt, bei Agarplatten wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank, die der flüssigen Kulturen bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm.

2.3.1.2 Transformation von E.coli

Zur Transformation kompetenter *E.coli* wurden je 100ng Plasmid- DNA bzw. der gesamte Ligationsansatz einer Klonierung (siehe Kapitel 2.4.1.5) zu 100µl chemischkompetenten Zellen zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien eine Minute auf Eis abgekühlt, 500µl LB Medium zugesetzt und die Kultur 60 Minuten bei 37°C geschüttelt. Die transformierten *E.coli* wurden dann bei 4000 U/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Luria Bertani Agar Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und 16h bei 37°C inkubiert.

2.3.1.3 Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Kleinere Mengen Plasmid DNA bis 5µg (Mini Präparation) wurden nach der folgenden Methode präpariert. Es wurden 3ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und bei 37°C und 250 rpm 16h auf dem Schüttelinkubator herangezogen. 1,5ml der Schüttelkultur wurden pelletiert und das Bakterienpellet in 100µl der Lösung I (siehe Kapitel 2.2.3, Lösungen für Plasmidisolierung) resuspendiert. Nach einer

fünfminütigen Inkubation auf Eis werden 200µl der Lösung II zur Lyse der Bakterien zugegeben und zur Durchmischung das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Dieser Schritt ermöglichte die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA: Proteine wurden durch SDS denaturiert, DNA durch das alkalische Milieu. Um denaturierte Proteine zu entfernen, folgte die Zugabe von 150µl der Lösung III und eine 3-5 minütige Inkubation auf Eis. Die Sedimentation der dabei präzipitierten Proteine und Membranbestandteile mit der daran anhaftenden chromosomalen DNA erfolgte mittels Zentrifugation bei 13000 U/ min für 5 Minuten. Der Überstand der Zentrifugation wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 900µl 100%igem Ethanol gefällt. Dazu wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und 10 Minuten bei 13000 U/ min abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird verworfen und das Plasmid- DNA Pellet in der Speedvac Zentrifuge 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wird das Pellet in 10µl eines H₂O und RNase Mixes (120µl H₂O + 5µl RNase A) resuspendiert und bei 37°C etwa 20 Minuten geschüttelt, um störende RNA aus dem Präparat zu entfernen.

2.3.1.4 Isolierung von Plasmid DNA im größeren Maßstab (Midi und Maxi Präparation)

Für die Midi bzw. Maxi Präparation wurden 50ml bzw. 200ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum mit 50µl bzw. 200µl Bakteriensuspension aus der Minipräparation angeimpft und 16h bei 37°C auf dem Schüttelinkubator herangezogen. Die eigentliche Plasmidisolierung erfolgte mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit bzw. dem Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach der beiliegenden Isolationsanleitung. Die Plasmid-DNA wurde mit 500µl H₂O eluiert und bei -20 °C gelagert. Die Ausbeuten lagen etwa bei 150 bis 250µg Plasmid DNA pro 50ml Bakterienkultur.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 DNA Techniken

2.4.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen zu analytischen Zwecken erfolgte in einem Volumen von 10µl mit etwa 0,5µg Plasmid-DNA, 5U des

entsprechenden Enzyms und 1µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden für 1-2h bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.4.1.2 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,8-2% Agarose in TAE). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 10V/cm durchgeführt. Das Anfärben der DNA erfolgte mit Ethidiumbromidlösung (0,04%) für 10-30 min. Die aufgetrennt DNA wurde durch UV-Licht visualisiert und die Größe der Fragmente wurde durch einen ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA-Längenstandards abgeschätzt.

2.4.1.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden in 1,5 %igen Agarosegelen aufgetrennt und nach der Färbung in Ethidiumbromidlösung unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten. Die eigentliche Gelextraktion wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach dem beliegenden Protokoll durchgeführt.

2.4.1.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde mittels UV-Absorption in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für optische Dichten < 1 gilt näherungsweise folgender linearer Zusammenhang:

1 OD_{260nm} Einheit = 50µg/ ml dsDNA, Plasmide

40µg/ ml RNA

2.4.1.5 Klonierung von DNA Fragmenten in Plasmide

Zur Herstellung von antisense Plasmiden, Expressionsplasmiden und Reportergenkonstrukten wurde das jeweilige DNA-Fragment (Insert) mittels PCR aus cDNA bzw. genomischer DNA amplifiziert. Die Primer für die PCR enthielten dabei zusätzlich die Sequenz für verschiedene Restriktionsschnittstellen. Der Ziel-Vektor und die Insert-DNA wurden jeweils mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, mittels QIAquick® Gel Extraction Kit der

Firma Qiagen aufgereinigt und anschließend miteinander ligiert. Die Ligationsreaktion wurde 16 h bei 16 °C in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

2µl 10x Ligase Puffer

0,3- 0,5µg Ziel-Vektor

3-5 facher Überschuss der Insert DNA

400 U T4 DNA Ligase

xµl H₂O für einen 20µl Ansatz

Die Ligationsreaktion wurde für 10 min bei 65 °C inaktiviert und anschließend in Epicurian Coli® XL2- Blue MRF' Ultracompetent *Escherichia Coli* nach der in 2.3.1.2 beschriebenen Methode transformiert.

2.4.1.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerasekettenreaktion genutzt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50µl.

Reaktionsansatz:

5µl 10x PCR-Puffer

0,5µl dNTPs (je 10 mM)

je 1,0µl der Primer (20 mM)

10ng Template-DNA

0,5µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)

Um Verdunstung zu vermeiden, wurde die Reaktion in einem PCR Gerät mit beheizbarem Deckel durchgeführt und nach einem ersten Denaturierungsschritt für 5 min bei 94 °C folgendem Protokoll unterzogen:

Denaturierung bei 94°C, 45 s

Annealing bei x°C, 45 s (x°C: optimierte Temperatur für jedes Primerpaar)

Extension bei 72°C, 45 s

35 Zyklen gefolgt von einem abschließenden Extension Schritt bei 72°C für 5 min.

2.4.1.7 RT- PCR

Reverse Transkription

Pro Reaktionsansatz wurde 1µg Gesamt- RNA, die aus Zelllinien bzw. Gewebe mit dem Total RNA Kit I der Firma Omega Bio-Tek extrahiert wurde, eingesetzt.

Die Reaktion wurde in einem 20µl Ansatz durchgeführt:

4µl First Strand buffer (5x)

2µl DTT (0,1M)

1µl dNTPs (10mM)

1µl dN₆ Primer (random, 2mg/ ml)

11µl RNA + H₂O

Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Nach der Denaturierung wurden 200U Superscript II zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 60 Minuten, gefolgt von einer zehnmütigen Denaturierung des Enzyms bei 70°C. Eine anschließende Inkubation mit RNase (1µl RNase A Mix) für 30 Minuten bei 37°C entfernte die störende RNA. Die fertige cDNA wurde bei -20°C weggefroren.

PCR

Die an die Reverse Transkription anschließende PCR wurde wie unter 2.4.1.7 beschrieben durchgeführt.

2.4.1.8 Quantitative RT- PCR

Die Quantifizierung der Expressionsstärke von mRNA wurde in einer quantitativen RT- PCR Reaktion, mit Hilfe des LightCycler II Systems, von Roche Diagnostics, Mannheim durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem, in 2.4.1.7 beschriebenen Protokoll.

Die quantitative RT- PCR Reaktion wurde in einem 20µl Ansatz durchgeführt:

10ng cDNA Template

2µl LightCycler DNA Master SYBR Green I (10x)

1,5µl MgCl₂ (25mM)

je 0,5µl der Primer (20mM)

H₂O

Der Versuchsansatz wurde dabei folgenden Programmen je nach Gen im LightCycler II unterzogen:

Genname	Snail	E-Cadherin	c-Jun	MMP 9	MMP 14
Denaturierung	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
Primer-Annealing	60°C	67°C	61°C	69°C	65°C
Amplifikation	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
Messtemperatur	87°C	84°C	88°C	89°C	85°C
Zyklenanzahl	40	40	40	45	45

Als Standard zur Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde das Haushaltsgen β -Aktin benutzt. Die Analyse der LightCycler Ergebnisse, das heißt die Quantifizierung der mRNA Expression, erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers.

2.4.1.9 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Herstellung radioaktiv markierter EMSA Matrize

Die radioaktive Markierung des doppelsträngigen (ds) DNA Oligonukleotides erfolgte durch blunt-end Reaktion. Das doppelsträngige AP-1 DNA-Fragment wurde von der Firma Promega, Heidelberg kommerziell erworben. Werden doppelsträngige DANN Fragmente selber generiert, so werden die forward und reverse Oligonukleotide im Verhältnis 1:1 mit H₂O gemischt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Beim langsamen Abkühlen des Heizblocks auf Raumtemperatur kam es zur Zusammenlagerung der Oligonukleotide zu einem Doppelstrang. Die so entstandene blunt-end dsDNA wurde dann radioaktiv markiert. Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt 3 µl dsOligonukleotid, 2 µl Polynukleotidkinase Puffer (10x), 11 µl H₂O, 1 µl Polynukleotidkinase und 3 µl [γ -³²P] ATP. Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert, wobei eine radioaktiv markierte Phosphatgruppe durch die Polynukleotidkinase auf die dsDNA übertragen wurde.

Reinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente

Zur Trennung radioaktiv markierter DNA-Fragmente von freien, nicht eingebauten Nukleotiden wurden NICKTM- Columns der Firma Amersham verwendet. Der Reaktionsansatz der radioaktiven Markierung mit ³²P wurde auf die Säule gebracht und anschließend mit 200 µl TE- Puffer (pH 7,5) gespült. Die erste Fraktion, die man erhielt, wurde aufgefangen und verworfen, da sie hauptsächlich aus Puffer mit nur sehr geringen Anteilen an radioaktiv markierter DNA-Matrize bestand. Durch dreimaliges Spülen der Säule mit je 200 µl TE-Puffer konnten noch drei Fraktionen gewonnen werden, wobei die markierte dsDNA Matrize mit der dritten und vierten Fraktion von der Säule gespült wurde. Freie Nukleotide wurden in der Säule zurückgehalten. Für die Gelshift Assays wurde jeweils diejenige Fraktion genutzt, die die höchste Effizienz der Markierung aufwies.

EMSA (Electrophoretic Mobility shift Assay)

Um DNA-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* analysieren zu können, wurden Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) durchgeführt. Diese Methode beruht auf einem veränderten Laufverhalten von DNA-Fragmenten mit gebundenen Proteinen im Gegensatz zu freier DNA in nativer Gelelektrophorese. Der Nachweis der DNA-Proteinkomplexe erfolgt über die radioaktive Markierung der DNA-Matrize. Ein Reaktionsansatz für den EMSA enthielt 5-10 µg Kernprotein, 4 µl 5x EMSA Binding Puffer, 1 µl poly dIdC (1 mg/ml), 2 µl radioaktiv markiertes Oligonukleotid (20000 cpm/µl) und H₂O_{bidest} ad 20 µl. Der Ansatz wurde zunächst für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die, im Kernextrakt enthaltenen, nachzuweisenden Proteine an die DNA-Matrize binden können. Zum Nachweis der spezifischen Bindung des Proteins an die DNA-Matrize wurde in Kontrollansätzen unmarkiertes Oligonukleotid in 400-fachem Überschuss als Kompetitor zugegeben. Die Ansätze wurden vor dem Auftragen auf ein natives 4,5% Polyacrylamidgel mit 4 µl Ladepuffer beschwert. Das Gel lief bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm in 1/x TBE für ca. 2,5h. nach dem Trocknen auf Whatman-Filterpapier auf einem Vakuumgeltrockner konnte das Gel autoradiographisch analysiert werden. Hierfür wurde ein Röntgenfilm (Kodak Biomax MR, Scientific Imaging Film) für etwa 24h aufgelegt und entwickelt.

2.4.2 RNA Techniken

2.4.2.1 RNA Isolation aus Säugerzellen

Die Isolation von RNA wurde mit dem Total RNA Kit I der Firma Omega Bio-Tek durchgeführt. Konfluent wachsende Zellen wurden einmal mit PBS gespült und anschließend mit einem Zellschaber von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst. Die Zellen werden bei 3000 U/min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 350µl RNA Lysispuffer resuspendiert, lysiert und über eine QIAshredder Säule aufgereinigt. Aus dem Eluat der QIAshredder Säule wurde nach Protokoll des Herstellers die RNA Isolation durchgeführt. Die in 30µl H₂O eluierte, extrahierte RNA wurde bei –20°C weggefroren.

2.4.3 Proteinchemische Methoden

2.4.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurden konfluent wachsende Säugerzellen mit PBS gewaschen, geerntet und bei 3000 U/ min für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200µl RIPA Puffer (siehe Kapitel 2.2.3) lysiert. Gewebe wurden mit einem Stab-Homogenisator (Xenox, Niersbach) in RIPA Lysispuffer aufgeschlossen. Die Präparationen wurden jeweils 15 min bei 4°C geschüttelt und die lysierten Zellbestandteile durch eine zehnmütige Zentrifugation bei 13000 U/ min bei 4°C von den Proteinen abgetrennt. Der Proteinextrakt wurde in neue Gefäße überführt und bei –20°C weggefroren.

2.4.3.2 Präparation von Kernproteinen

Alle Schritte der Präparation wurden auf Eis, die Zentrifugationsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die Melanomzellen wurden zu mindestens 90% Zelldichte in einer T75 Kulturflasche hochgezogen, um ausreichend Kernprotein isolieren zu können. Vor Beginn der Präparation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in 1 ml PBS abgekratzt und bei 3000 U/ min für 5 Minuten pelletiert. Zur Lyse der Zellmembran wurden 400µl Puffer I (siehe 2.2.3) zugegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation gab man 10%iges Nonylphenylpolyethylene Glykol NP- 40 zu, ein nichtionisches Tensid, um die Lyse zu verbessern. Die Kerne wurden bei 10000 U/ min für 1 Minute abzentrifugiert und der Überstand mit dem Zytoplasma verworfen. Das Kernpellet wurde durch Zugabe

von 50µl Puffer II (siehe 2.2.3) lysiert, indem es 15 Minuten bei 4°C geschüttelt wurde. Um die Kerndebris zu entfernen, wurde 10 Minuten bei 13000 U/ min zentrifugiert; die Kernproteine befanden sich danach im Überstand, die Debris im Pellet. Die Kernproteine wurden bei –80 °C gelagert und können nach dem Auftauen nicht wieder eingefroren werden, da es dabei zu einer Degradation der Proteine kommt.

2.4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach der Methode von Smith et al. (Smith et al. 1985) unter Verwendung des BCA-Protein-Assay Kits der Firma Pierce, München durchgeführt. Diese basiert auf der alkalischen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine (Biuret Reaktion), welches mit Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet, der durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann. Zu 5µl Proteinlösung wurden 200µl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in eine 96-Well Platte gegeben und 20 min bis zur Entwicklung der violetten Färbung bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messung bei 562nm in einem ELISA-Reader konnte die Absorption bestimmt werden, die durch parallele Quantifizierung von BSA (bovine serum albumin) Standards über 3 Zehnerpotenzen in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden konnte.

2.4.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

9 Proteinproben/Gel (Zelllysate siehe Kapitel 2.4.3.1) wurden jeweils in 1x Roti-Load 10min bei 70°C denaturiert und anschließend bei 0,8 mA/cm² durch SDS-PAGE auf PAA Gelen aufgetrennt.

2.4.3.5 Western Blot

Um durch SDS-Page aufgetrennte Proteine durch Antikörper nachzuweisen, wurden diese auf eine PVDF-Membran geblottet. Hierzu wurden die SDS-PAGE Gele nach dem Gellauf zusammen mit der PVDF-Membran 10 min in 1x Western-Blot Puffer getränkt und danach die Proteine mittels elektrophoretischem Transfer (Whatman Biometra, Fastblot B34 Unit, 1h bei 1,5mA/cm²) auf die Membran übertragen. Die Western Blot-Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h in PBS mit 3% BSA inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:1000-1:10000) geschwenkt. Nach dem

Waschen (3x5 min mit PBS) wurde die Membran mit einem gegen den konstanten Teil des Primär- Antikörpers gerichteten (speziesspezifischen) Sekundär- Antikörper (1:4000) für 1h bei RT inkubiert. Die Sekundär-Antikörper sind mit einer Alkalischen Phosphatase zur Detektion einer Farbreaktion konjugiert. Nach dreimaligem Waschen (3x10 min. mit PBS) wurde das Substrat für die alkalische Phosphatase (BCIP/ NBT Substrate Kit) zugegeben und die Membran darin inkubiert bis sich eine Farbreaktion zeigte.

2.4.3.6 Immunfluoreszenz

In dieser Methode wurden Fluorophor-gekoppelte Antikörper verwendet. Dies diente dazu, Proteine oder Zellbestandteile durch Immunmarkierung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

2×10^3 - 2×10^5 Zellen wurden pro Kammer auf einen Four-chamber-cover-slide ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Methanol (250 μ l/ Kammer) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach weiteren 5 Minuten der Fixierung mit frischem Methanol, wurden die Zellen mit einer 0,1 %-igen Triton-X-100-Lösung permeabilisiert. Dem sorgfältigen Waschen mit PBS folgte das Blockieren des Präparats für 1 Stunde mit 1 % BSA/PBS. Anschließend kam die Inkubation mit dem primären c-Jun Antikörper (1:40 Verdünnung). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach drei Waschschritten mit PBS kam die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Verdünnung 1:40) für 1 Stunde bei 4 °C. Dabei war es wichtig, die feuchte Kammer, in der der Objektträger lagert, dunkel abzudecken. Nach der Inkubationszeit folgte nochmals ein dreimaliger Waschschritt mit PBS, um den überflüssigen Antikörper zu entfernen. Die Kernfärbung erfolgte mit einer DAPI-Lösung und direkt im Anschluss wurden die Kammern mit einem Deckglas eingedeckelt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop konnten die fluoreszenzmarkierten Zellen analysiert werden.

2.4.3.7 Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um das Paraffin zu schmelzen und die Schnitte zu fixieren. Am nächsten Tag wurden die Schnitte bei 72 °C für 30 Minuten getrocknet, für 15 Minuten in Xylol gegeben und anschließend in die absteigende Alkoholreihe gegeben, um die Gewebeschnitte zu entparaffinieren. Für die c-Jun-spezifische Immunhistochemie wurden die Schnitte für

30 Minuten in Tris/EDTA Puffer (pH 8,5) gekocht und dann noch mal 30 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach einem Spülschritt in PBS mit Pufferwechsel wurden die Schnitte mit Wasserstoffperoxid 3 % inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt wurden die Schnitte mit 20% Ziegenerum/PBS für 20 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert, um unspezifische Proteine zu blocken. Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (1:500) über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Gewebeschnitte nach der Inkubation des 1. Antikörper mit PBS gespült wurden, erfolgte die Inkubation mit einem speziesspezifischen Brückenantikörper für 20 Minuten. Dabei handelt es sich um Biotin markierte Immunglobuline. Anschließend wurde Streptavidin HRP, eine Meerrettichperoxidase, die an Streptavidin konjugiert ist, zu den Schnitten gegeben. Nach 30 Minuten wurden die Gewebeschnitte mit PBS gewaschen. Danach gab man AEC Substrat Chromogenlösung solange dazu, bis eine spezifische Rotfärbung einsetzte. Abschließend wurde die Färbung gestoppt und mit Hämalaun kurz gegengefärbt, um die Zellkerne anzufärben. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

2.5 Zellkulturmethoden

2.5.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese nach Waschen mit PBS für 5min mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei 37 °C inkubiert, in DMEM mit 10 % FKS aufgenommen und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

2.5.2 Transfektion von Zellkulturzellen

Zur Transfektion von Melanomzellen mit Plasmiden wurde die Lipofektamin Methode mit Lipofektamin™ Reagent und LipofektaminPlus Reagent (Invitrogen) verwendet. Für transiente Transfektionen wurden Zellen in 6-Well Platten mit 50-80 %iger Konfluenz benutzt, die Zellen mit frischem Medium versorgt und der Transfektionsansatz nach Angaben des Herstellers zugegeben. Dabei wurden 0,02 bis 0,5 µg an Plasmid- DNA pro Versuchsansatz eingesetzt. Das

Transfektionsgemisch wurde nach 4 h durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur Ernte weitere 24-48 h inkubiert. Transfizierte Zellen wurden entweder durch Luciferase-Reporter-Gen-Analysen (siehe Kapitel 2.5.3) analysiert oder zu Gesamtzellprotein (siehe Kapitel 2.4.3.1) bzw. RNA (siehe Kapitel 2.4.2.1) weiterverarbeitet. Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde der Vektor mittels der Lipofektaminmethode in die Zellen eingebracht und durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums zum Kulturmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. Das Selektionsantibiotikum wurde anhand des Resistenzgens im Vektor, der in die Zellen eingebracht wurde, ausgewählt. Short-interfering RNAs (siRNA) wurden mittels der HiPerfect Reagenz in die Melanomzellen eingebracht. Dabei wird der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die flottierenden Zellen gegeben. Nach 4h Inkubationszeit, wird FKS dazugegeben, damit sich die Zellen absetzen können.

Für die Transfektion von Melanozyten wurde die Nucleofector® Technology von Amaxa (Nucleofector Kit R, Programm T-20) verwendet. Dazu wird das Prinzip der Elektroporation genutzt.

2.5.3 Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Regulatorische DNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe von Reporter-Gen-Analysen untersuchen. Um die Aktivität eines Promotors zu untersuchen, wird ein DNA-Fragment, das den Promotorbereich enthält, vor das Luciferase-Gen des Reporterplasmids pGL3-basic (siehe Kapitel 2.1.6) kloniert. Die Expression des Reportergens verhält sich im eukaryontischen Testsystem proportional zum Aktivierungspotential des klonierten DNA-Fragments. Durch Zugabe eines Substrats (Luciferin) für das Enzym Luciferase kommt es zur Chemilumineszenz, welche an einem Luminometer gemessen wird. Um die unterschiedliche Transfektionseffizienz der einzelnen Versuchsansätze anzugleichen, wurden die Zellen mit einem Kontrollvektor (pRL-TK, Promega, Heidelberg), der das Renilla Luciferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält, kotransfiziert. Die Chemilumineszenz der Renilla Luciferase wurde ebenfalls im Luminometer erfasst. Zur Durchführung des Luciferase Assays wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System der Firma Promega verwendet. Hierfür wurden je 200.000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und nach der Lipofektamin Methode (siehe Kapitel 2.5.2) transfiziert. Zur Ernte wurde das Kulturmedium der transfizierten Zellen abgegossen und die Zellkultur zweimal mit

normalem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden pro Well der 6- Well Kulturplatte 300 µl Lysispuffer (1:5 verdünnt, Promega, Heidelberg) zugegeben und die Zellen 20 Minuten bis zu zwei Stunden auf einem Schüttler lysiert. Nach der Lyse wurden je 50 µl eines Versuchsansatzes, mit den im Kit bereitgestellten Chemikalien im Luminometer vermessen.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der GraphPad Prism Software (GraphPad software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit dem ungepaartem t-Test ermittelt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Mechanismen der Entstehung und Progression des malignen Melanoms aufzuklären, um zu einem besseren Verständnis dieser Erkrankung beizutragen. Dabei stand die Analyse des c-Jun und AP-1 Signalweges mit Vernetzung zu anderen im Melanom wichtigen Signalwegen im Vordergrund. Die Arbeit kann in dieser Hinsicht in vier Hauptpunkte untergliedert werden:

- (1) Im ersten Teil der Arbeit wird die Relevanz von c-Jun in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms untersucht. Dazu wird zunächst der Expressionsstatus von c-Jun im Melanom charakterisiert. Außerdem wird seine Rolle als ein Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktors genauer definiert.
- (2) Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Interaktion zwischen E-cadherin vermittelnder Zell-Zell-Adhäsion und dem Transkriptionsfaktor c-Jun. Dabei wird der Effekt des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-cadherin auf die c-Jun Protein Expression untersucht und weiter der Einfluss von aktiven Zell-Zell-Kontakten auf die Regulation von c-Jun.
- (3) Im dritten Teil der Arbeit wird geklärt, wie c-Jun über E-cadherin reguliert wird. Dabei werden sowohl Möglichkeiten der posttranskriptionellen Regulation wie Proteinstabilität untersucht, als auch die Vernetzung zu MAPKinase Signalwegen, die eine Rolle in der Regulation von c-Jun spielen.
- (4) Der vierte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des Zytoskeletts in der E-cadherin abhängigen Regulation von c-Jun. Dabei werden Rho-Proteine, die bekanntermaßen an der Signalweiterleitung nach Zytoskelettveränderung beteiligt sind, untersucht. Andere Transkriptionsfaktoren, wie Ets-1, die auch Rho-Proteine regulieren können, werden im Zusammenhang mit der Regulation von c-Jun untersucht.

4 Ergebnisse

Bislang wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors AP-1 in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms nicht detailliert untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Molekül c-Jun als wichtigster Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktors im malignen Melanom fungiert. Im Rahmen der Analyse gelang es ebenso einen neuen adhäsionsabhängigen Signalweg zu identifizieren, der an der Regulation von c-Jun beteiligt ist.

4.1 Relevanz von c-Jun in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms

4.1.1 Expressionsstatus von c-Jun im malignen Melanom

Zehn Melanomzelllinien (Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho, HMB2, SK Mel 3, SK Mel 28, HTZ19d, Mel Ju, Mel Juso und Mel Im) wurden auf die Expression von c-Jun mittels quantitativer RT-PCR untersucht und mit normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) verglichen (Abbildung 4-1). Dabei zeigte sich, dass die c-Jun mRNA Mengen der Melanomzelllinien sehr niedrig waren. Als Positivkontrolle wurden NHEM mit dem Wachstumsfaktor bFGF stimuliert. Es ist bekannt, dass dieser Wachstumsfaktor die AP-1 Expression in Zellen stark stimuliert.

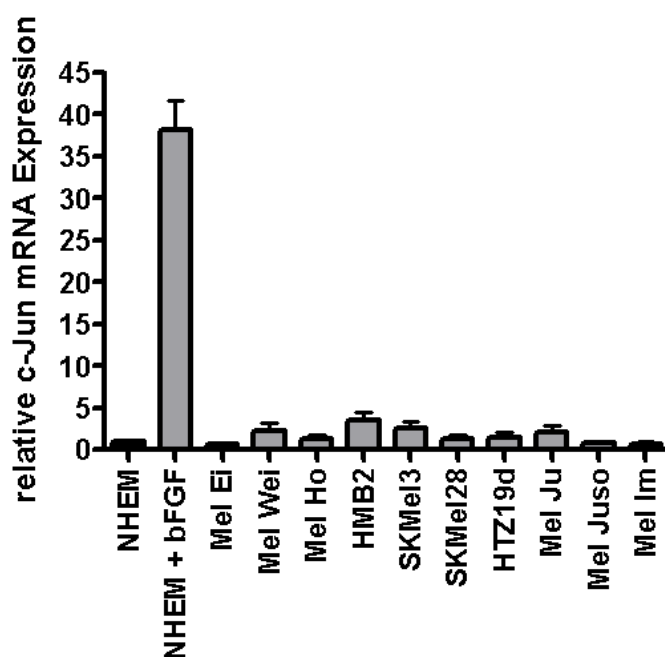


Abbildung 4-1: Expression von c-Jun im Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten. Stimulierung von NHEM mit dem Wachstumsfaktor bFGF stellte die Positivkontrolle dar. Der Versuch wurde mit drei Replikaten durchgeführt.

Um diese geringe Expression auf Proteinebene zu bestätigen, wurden drei Zelllinien, die von Patienten mit primären, kutanen Melanomen stammen (Mel Ei, Mel Wei und Mel Juso), drei Zelllinien von Patienten mit Melanometastasen (Mel Im, SK Mel 3 und Mel Ju) und zwei Zelllinien (MM1, MM2), die frisch aus Patienten Material isoliert wurden, im Vergleich zu NHEM mittels Western Blot Analyse untersucht (

Abbildung 4-2). Im Gegensatz zu den mRNA Daten, konnte in allen acht Melanomzelllinien eine starke c-Jun Protein Expression im Vergleich zu NHEM nachgewiesen werden (Abbildung 4-2). Dabei konnten keine Unterschiede in der c-Jun Expression zwischen Melanomzelllinien aus Primärtumoren und Melanomzelllinien aus Metastasen festgestellt werden. Damit lassen sich erste Rückschlüsse auf eine mögliche posttranskriptionelle Regulation von c-Jun ziehen.

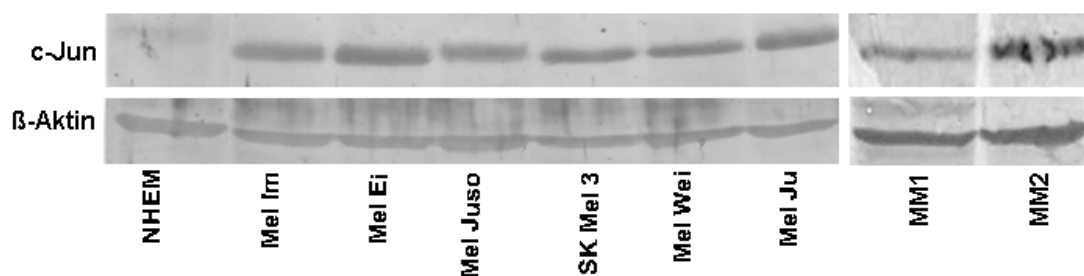


Abbildung 4-2: Expression von c-Jun in Melanomzelllinien auf Proteinebene. MM1 und MM2 sind Zelllinien, die frisch aus Patientenmaterial isoliert wurden.

Um die Expressionsergebnisse von c-Jun *in vivo* zu bestätigen, wurde Melanomgewebe verschiedener Patienten immunhistochemisch auf ihre c-Jun Expression analysiert. Dabei zeigte sich eine spezifische Expression von c-Jun in den Zellkernen der Melanomzellen (Abbildung 4-3).

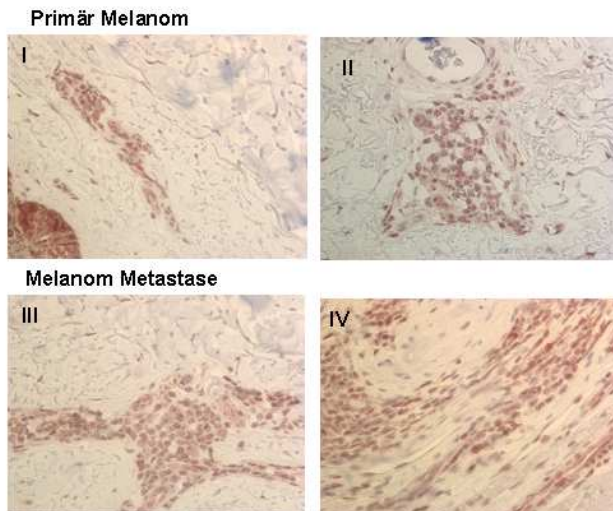


Abbildung 4-3:

Immunhistochemie zeigt die Lokalisation von c-Jun im Zellkern von Melanomzellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl alle untersuchten Melanomzelllinien als auch Melanomgewebe im Vergleich zu NHEM und gesunder Haut eine starke c-Jun Protein Expression aufzeigten, wohingegen c-Jun mRNA Expression generell nur in geringen Mengen detektiert werden konnte. Eine Expressionszunahme von c-Jun im Verlauf der Progression vom Primärtumor zur Metastasierung konnte nicht detektiert werden.

4.1.2 Analyse der AP-1 Aktivität im Melanom

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass c-Jun in der Entwicklung des Melanoms wichtig ist. Da c-Jun zur Familie des AP-1 Transkriptionsfaktors gehört, wurde nun spekuliert, ob dieser auch im Melanom aktiv ist. Dafür wurde die AP-1 Aktivität in einem Reporter Gen Assay mittels Transfektion eines AP-1 Luc Plasmides in zwei verschiedenen Melanomzelllinien (Mel Im, Mel Juso) untersucht. In beiden Linien konnte eine signifikant hohe AP-1 Aktivität gemessen werden, wohingegen in NHEM keine AP-1 Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Transfektion mit pGL3 basic Leervektor diente in den jeweiligen Zelllinien als negative Kontrolle (Abbildung 4-4).

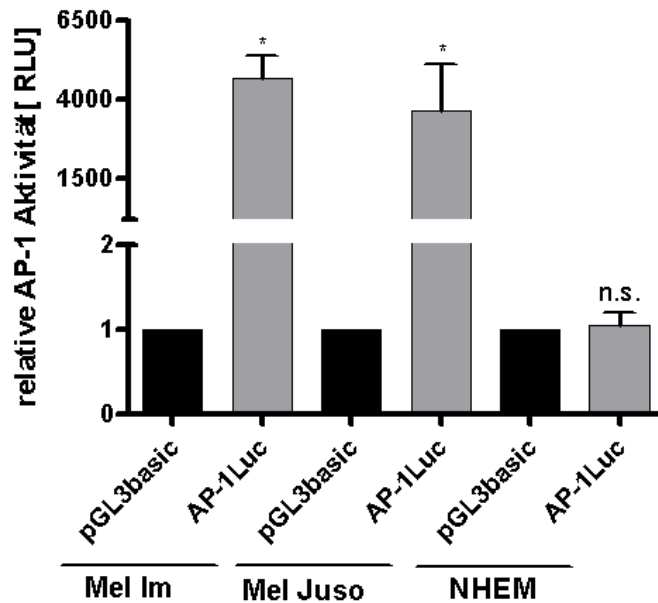


Abbildung 4-4: Luciferase Aktivitätsmessung.

In den Melanomzelllinien Mel Im und Mel Juso war im Vergleich zu NHEM eine signifikant hohe AP-1 Aktivität messbar. Als Negativkontrolle wurde der pGL3 basic Leervektor verwendet. Der Versuch wurde viermal wiederholt.

4.1.2.1 Inhibierung von c-Jun verringert AP-1 Aktivität

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass im Melanom eine verstärkte AP-1 Aktivität vorliegt. Gleichzeitig konnte eine starke Expression von c-Jun in diesen Melanomzelllinien nachgewiesen werden. Es wurde nun spekuliert, ob die Expression von c-Jun einen Einfluss auf die AP-1 Aktivität im Melanom hat. Um dies zu analysieren, wurde zunächst durch zwei verschiedene Ansätze die c-Jun Expression reduziert und dann die AP-1 Aktivität gemessen. Im ersten Ansatz wurden die Zelllinien Mel Im und Mel Juso mit einem dominant negativen c-Jun Konstrukt (DNc-Jun; Tam67) transfiziert. Wird das dominant negative c-Jun Konstrukt exprimiert, kann der Transkriptionsfaktor AP-1 zwar noch an die DNA binden kann, besitzt aber keine Möglichkeit mehr zur Transaktivierung (Brown et al., 1993), da die Transaktivierungsdomäne (AS 3-122) im Konstrukt deletiert worden ist (Abbildung 4-5). Es konnte eine deutliche Verringerung der AP-1 Aktivität nach Ko-Transfektion von DNc-Jun in beiden Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 4-6 (A)). Als Kontrolle wurde der Leervektor pcDNA 3.1 verwendet.

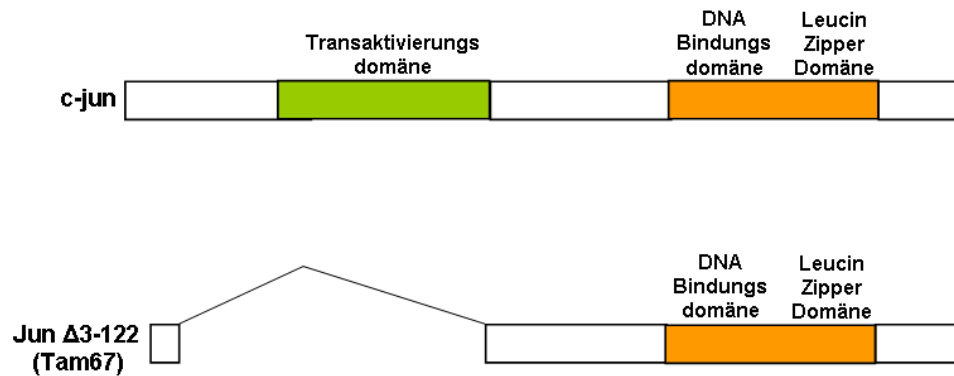


Abbildung 4-5: Schematische Darstellung der dominant negativen c-Jun Mutante. Die Transaktivierungsdomäne (AS 3-122) des c-jun Gens wurde deletiert, dadurch kann keine Aktivierung von Zielgenen zustande kommen (verändert nach Brown et al., 1993).

Im zweiten Ansatz wurde sh RNA gegen c-Jun in die Zelllinien transfiziert. Dadurch wird die endogene c-Jun mRNA enzymatisch abgebaut. Mittels Western Blot Analyse wurde die Abnahme der c-Jun Protein Expression nach Transfektion von sh c-Jun in die Zelllinie Mel Im überprüft (Abbildung 4-6 (B)). In Übereinstimmung mit den DNC-Jun Daten konnte auch hier eine Abnahme der AP-1 Aktivität verglichen mit der Negativkontrolle (sh Kontrolle) beobachtet werden (Abbildung 4-6 (C)).

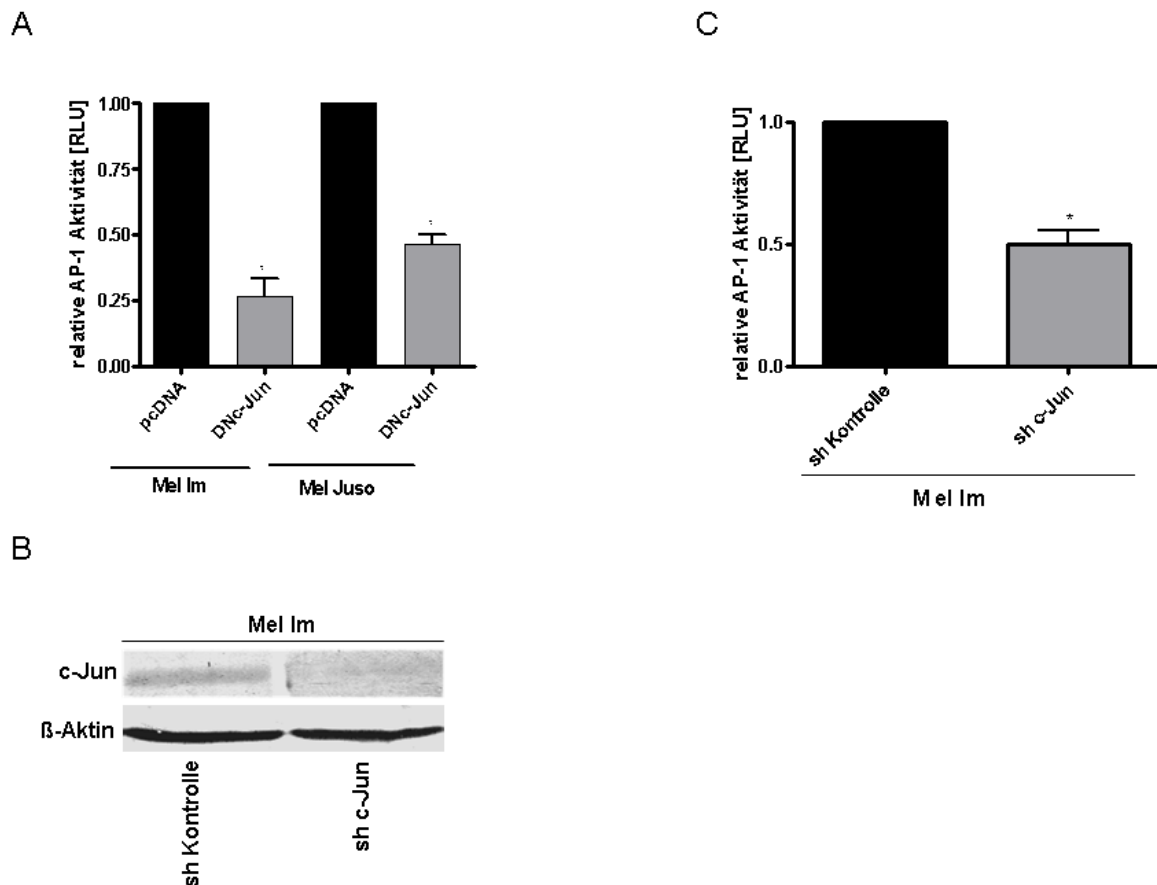


Abbildung 4-6: Luciferase Aktivitätsmessung.

(A) Messung der AP-1 Aktivität nach Transfektion eines dominant negativen c-Jun Konstruktes (Tam67;DNc-Jun). Der Versuch wurde dreimal wiederholt. (B) Western Blot Analyse der c-Jun Protein Expression nach Transfektion eines sh c-Jun Konstruktes. (C) Messung der AP-1 Aktivität nach Transfektion des sh c-Jun Konstruktes. Die Luciferase Aktivitätsmessung wurde dreimal wiederholt.

4.1.2.2 *c-Jun ist der Hauptregulator der AP-1 Aktivität*

Die AP-1 Aktivitätsmessungen weisen darauf hin, dass c-Jun für die Aktivität des Transkriptionsfaktors eine entscheidende Rolle spielt. Es ist bekannt, dass sich der Transkriptionsfaktor AP-1 aus Homo- oder Heterodimeren seiner Familienmitglieder zusammensetzt. Je nach Zusammensetzung werden unterschiedliche Zielgene aktiviert. Um nun zu beweisen, dass c-Jun im Melanom die wichtigste Untereinheit im AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplex ist, wurden EMSAs (electrophoretic mobility shift assay) durchgeführt. Durch radioaktivmarkierte AP-1 Oligonukleotide kann die Bindung von Kernproteinen an die AP-1 Konsensus Sequenz 5'-TGACTAA-3' „sichtbar“ gemacht werden. In Analogie zu den Luciferase Aktivitätsmessungen

konnte nach Ko-Transfektion des shc-Jun Konstruktes eine verringerte Bindung an die AP-1 Konsensus Sequenz beobachtet werden (Abbildung 4-7 (A)). Durch die Zugabe eines spezifischen Antikörpers gegen c-Jun konnte bewiesen werden, dass die Kernproteine der Zelllinie Mel Im sich hauptsächlich aus c-Jun Homodimeren zusammensetzt, da die radioaktivmarkierte Bande komplett geshiftet wurde (Abbildung 4-7 (B)).

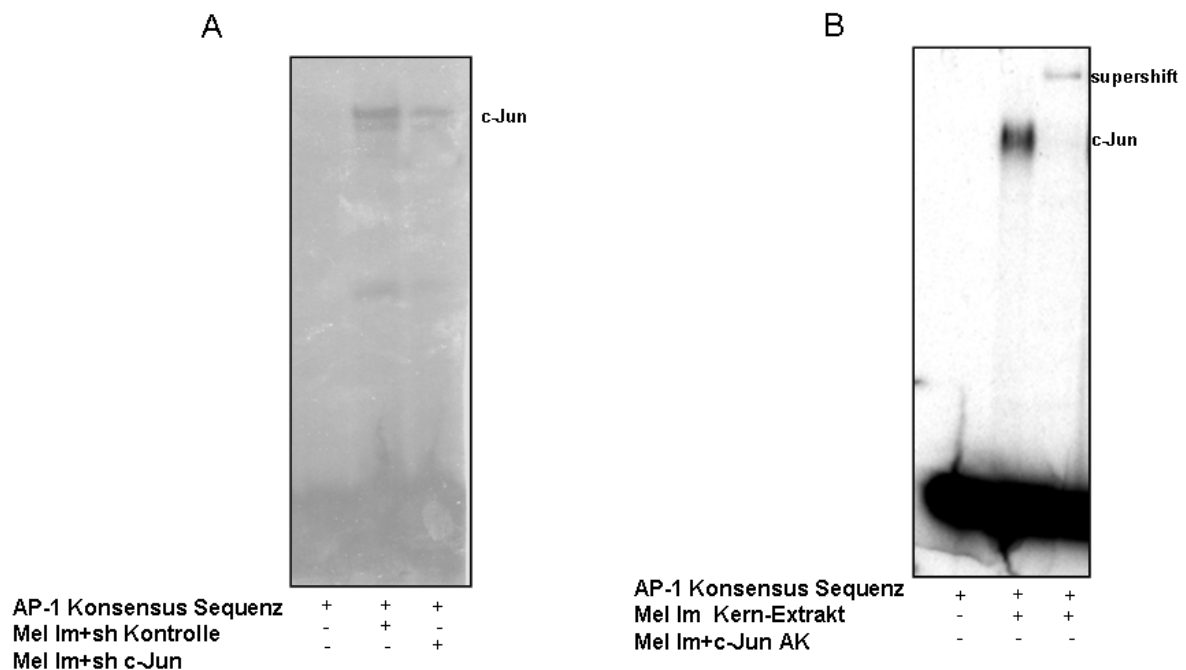


Abbildung 4-7: (A) Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).

(A) Nach Transfektion von sh c-Jun zeigt sich verglichen zur sh Kontrolle eine verringerte Bindung an die AP-1 DNA Konsensus Sequenz. (B) Zugabe eines c-Jun Antikörpers führt zur Bildung eines Supershiftes. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass c-Jun der wichtigste Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktors und hauptverantwortlich für die hohe AP-1 Aktivität im Melanom ist.

4.2 Interaktion zwischen E-cadherin vermittelnder Zell-Zell-Adhäsion und dem Transkriptionsfaktor c-Jun

Veränderung der Zell-Zell-Adhäsion ist ein wichtiger Prozess während der Melanomentwicklung. Der Verlust der Expression des Adhäsionsmoleküls E-cadherin durch seinen Repressor Snail und die damit verbundene Hochregulation des Adhäsionsmolekül N-cadherin sind bereits für die Entwicklung des Melanoms gut charakterisiert worden (Poser et al, 2001). Allerdings gibt es noch kaum Untersuchungen, welche Auswirkungen dieser E-cadherin N-cadherin „Switch“ hat. Es ist bereits bekannt, dass die Regulation von Transkriptionsfaktoren mit dem Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-cadherin korreliert ist. So konnte in unserer Gruppe bereits gezeigt werden, dass die hohe konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors NFkB mit dem Verlust von E-cadherin einhergeht. Zudem konnte gezeigt werden, dass das zytoplasmatische Molekül β -Catenin und die MAPKinase p38 in diesen Prozess involviert sind (Kuphal et al., 2004).

4.2.1 Effekt von E-cadherin auf die Proteinexpression von c-Jun

In ausgedehnten Expressionsanalysen konnte E-cadherin sehr spezifisch in normalen humanen epidermalen Melanozyten und in der Melanomzelllinie A375 nachgewiesen werden, wohingegen keine Expression in Mel Im und Mel Juso Zellen zu finden war (Abbildung 4-8). Dies ließ vermuten, dass der Verlust der E-cadherin Expression in Zusammenhang mit der Regulation von c-Jun stehen könnte. Die Melanomzelllinie A375 wurde für alle nachfolgenden Versuche mit analysiert, da in dieser Zelllinie der klassische AP-1 Signalweg über die MAPKinase JNK bereits charakterisiert und publiziert wurde (Lopez-Bergami et al., 2007).

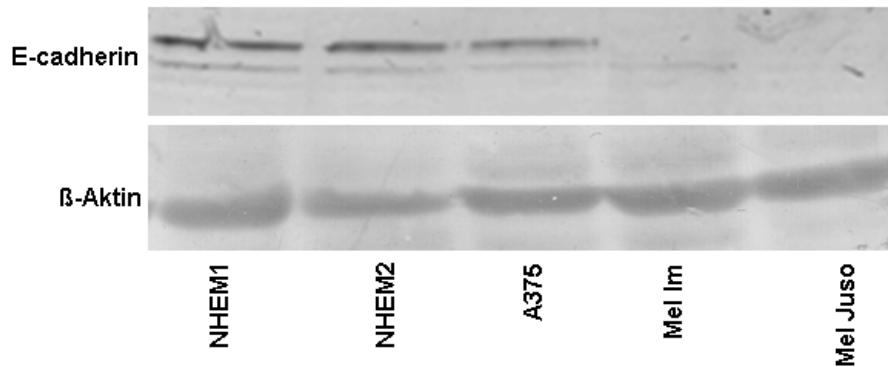


Abbildung 4-8: Western Blot Analyse verschiedener Melanomzelllinien im Vergleich zu NHEM.

4.2.1.1 Untersuchung der c-Jun Protein Expression in E-cadherin re-exprimierenden Modellsystemen

Um herauszufinden, ob E-cadherin einen Einfluss auf die c-Jun Expression hat, wurden Modellsysteme etabliert, bei denen es zur Re-expression von E-cadherin kommt, um dadurch den Einfluss von E-cadherin auf die Regulation von c-Jun zu untersuchen. Diese Modellsysteme werden im folgendem kurz erläutert. (1) Beim ersten Modellsystem handelt es sich um antisense (as) Snail Zellklone. Die Expression von Snail führt im Melanom zur Repression von E-cadherin. Durch stabile Transfektion eines asSnail cDNA Konstruktes in der Melanomzelllinie Mel Im kommt es zum Verlust von Snail. Dies führt wiederum zur Re-expression von E-cadherin. (2) Die adenovirale Transduktion von E-cadherin in die Zelllinie Mel Im ist das zweite Modellsystem. Dadurch kommt es zur Re-expression von E-cadherin in der Zelllinie Mel Im. (3) Ein drittes Modellsystem stellen die HMB2-MIA Zellklone dar. Durch antisense Strategie wurde in dieser Zelllinie das Protein MIA (Melanoma Inhibitory Activity) herunterreguliert. MIA wird ausschließlich in malignen Melanomen exprimiert, Melanozyten zeigen keine Expression. *In vivo* trägt MIA wesentlich zur Migration des Tumors bei (Bossert et al., 2001; Guba et al., 2000). Man stellte fest, dass nach Ausschalten von MIA die Zellklone einen melanozytären Charakter erlangten, da in diesen Zellklonen die Pigment-Synthese durch Re-expression von Tyrosinase-related Protein 1 (Trp-1) und Tyrosinase re-induziert wurde (Tatzel et al., 2005).

Als Kontrolle diente die Ursprungszelllinie HMB2 und ein HMB2LacZ Kontrollklon (Poser et al., 2004). Western Blot Analysen zeigten, dass E-cadherin in den MIA defizienten Zellklonen HMB2-5 und HMB2-8 re-exprimiert wird (Poser et al, 2004).

Es konnte nun in allen drei Modellsystemen gezeigt werden, dass nach Re-expression von E-cadherin c-Jun verringert exprimiert wurde. Im Modellsystem der asSnail Zellklone (Abbildung 4-9) kam es zu einer Reduktion der c-Jun Protein Expression um ca. 37%. Die Analyse mittels eines spezifischen Snail Antikörpers zeigte einen deutlichen Verlust der Snail Expression im asSnail Zellklon.

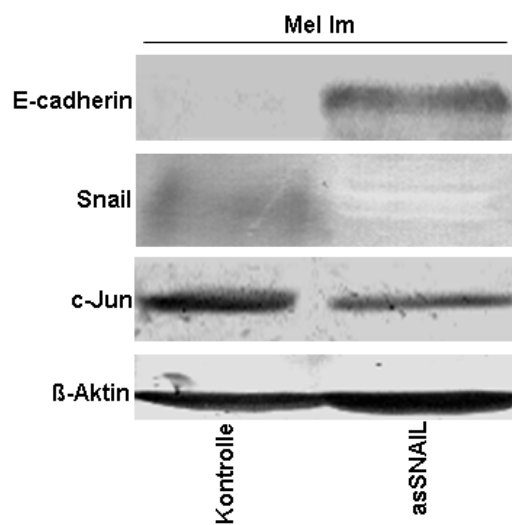


Abbildung 4-9: Western Blot Analyse der c-Jun Protein Expression in asSnail Zellklonen.

Im zweiten Modellsystem, der adenoviralen Transduktion von E-cadherin, konnte eine Abnahme der c-Jun Protein Menge um ca. 50% nach E-cadherin Re-expression beobachtet werden (Abbildung 4-10).

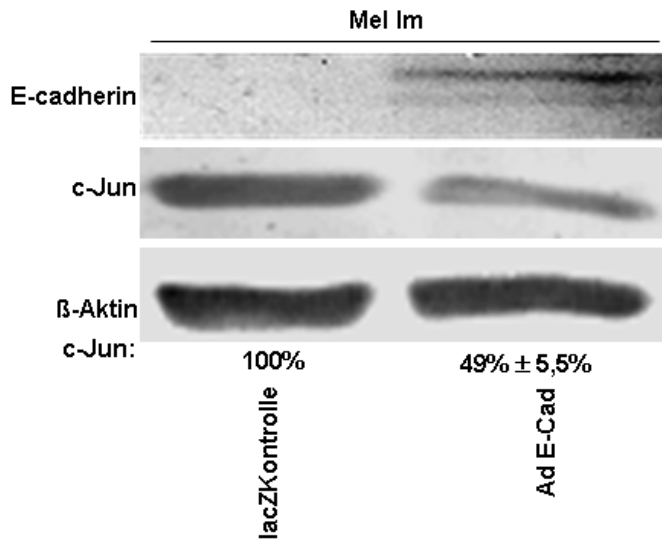


Abbildung 4-10: Western Blot Analyse der c-Jun Protein Expression nach adenoviraler Transduktion von E-cadherin.

In den HMB2-MIA Zellklonen konnte ein nahezu kompletter Verlust der c-Jun Protein Expression nach E-cadherin Re-expression beobachtet werden (Abbildung 4-11).

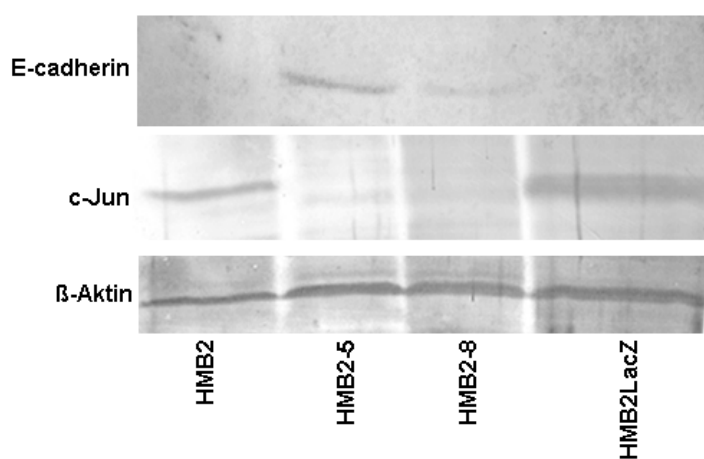


Abbildung 4-11: Western Blot Analyse der c-Jun Protein Expression in HMB2-MIA Zellklonen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein regulatorischer Zusammenhang zwischen dem Verlust von E-cadherin und der Induktion von c-Jun besteht.

4.2.1.2 Einfluss von E-cadherin auf die transkriptionelle Aktivität von AP-1

Es konnte bereits gezeigt werden, dass c-Jun hauptverantwortlich für die AP-1 Aktivität im Melanom ist. Deshalb war es nun von Bedeutung, ob E-cadherin auch einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 hat. Dafür wurde in den Zelllinien Mel Im und Mel Juso eine adenovirale Transduktion

durchgeführt und anschließend mittels Reportergen Assay die AP-1 Aktivität gemessen. Es zeigte sich, dass die Re-expression von E-cadherin einen hemmenden Effekt auf die AP-1 Aktivität hat. Es wurde mit der AP-1 Aktivität, die in den beiden Zelllinien Mel Im und Mel Juso nach Transduktion eines LacZ-Vektors gemessen wurde, verglichen. Transfektion des Leervektors pGL3basic wurde in beiden Zelllinien als negative Kontrolle verwendet (Abbildung 4-12).

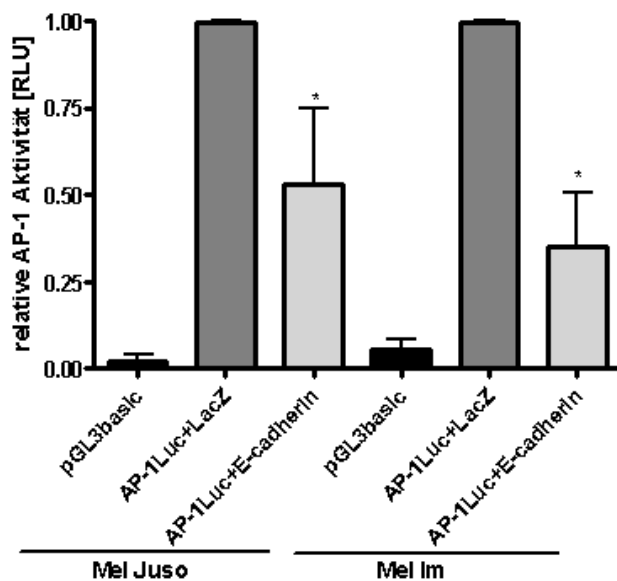


Abbildung 4-12: Luciferase Aktivitätsmessung.

Die AP-1 Aktivität nimmt nach Re-expression von E-cadherin signifikant ab. Verglichen wurde mit der verglichen zur AP-1 Aktivität nach Transduktion des Kontrollvirus LacZ. Der Leervektor pGL3 basic wurde als Negativkontrolle verwendet. Der Versuch wurde viermal wiederholt.

In Analogie dazu konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass E-cadherin die Expression bekannter Zielgene des AP-1 Transkriptionsfaktors hemmt. Mittels qRT-PCR Analysen konnte eine Reduktion der mRNA Expression von MMP-9 und MMP-14 nach E-cadherin Re-expression beobachtet werden (Abbildung 4-13).

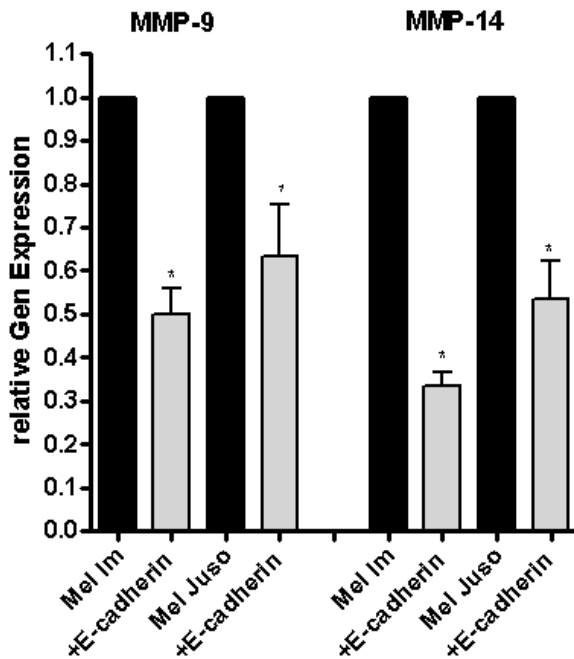


Abbildung 4-13: qRT-PCR Analysen bekannter Zielgene von AP-1 nach Re-expression von E-cadherin. Die Expression der Zielgene wurde in je drei Replikaten nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass E-cadherin nicht nur einen Einfluss auf die c-Jun Protein Expression hat, sondern auch die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 verändert und damit die Transkription der Zielgene MMP-9 und MMP-14 beeinflusst.

4.2.2 Rolle der Zell-Adhäsion in der E-cadherin vermittelnden Regulation von c-Jun

4.2.2.1 Aktive Zell-Zell-Kontakte über E-cadherin sind wichtig für die Regulation von c-Jun

In dem bereits analysiertem Modellsystem der MIA defizienten Zellklone konnte nachgewiesen werden, dass durch die Re-expression von E-cadherin aktive Zell-Zell-Kontakte zustande kommen (Tatzel et al., 2005). In diesem Modell konnte ein kompletter Verlust der c-Jun Expression beobachtet werden, ganz im Gegensatz zu den beiden anderen Modellsystemen. Dies ließ spekulieren, ob aktive Zell-Zell-Kontakte an der Regulation von c-Jun beteiligt sein könnten. Dafür wurden verschiedene Versuche mit NHEMs durchgeführt, da dieser Zelltyp E-cadherin exprimiert und dadurch Zell-Zell-Kontakte bilden kann. Für die Analysen wurden die NHEMs in verschiedenen Wachstumsdichten ausgesät. Melanozyten, die sehr dicht gewachsen sind, können über E-cadherin Zell-Zell-Kontakte aufbauen, wohingegen

die wenig dicht gewachsenen Zellen keine Möglichkeit zum Aufbau von Zellkontakten hatten. Zunächst wurden NHEMs beider Wachstumsdichten mit einem inhibitorischen E-cadherin Antikörper behandelt. Die Funktionsweise des Antikörpers besteht darin, dass dieser E-cadherin abhängige Zell-Zell-Kontakte inhibiert. Western Blot Analysen zeigten, dass NHEMs, ausgesät in hoher Wachstumsdichte, nach Inhibition von E-cadherin, im Vergleich zu unbehandelten NHEM, eine Induktion der c-Jun Protein Expression aufwiesen (Abbildung 4-14). Man geht davon aus, dass der Verlust der aktiven Zell-Zell-Kontakte über E-cadherin verantwortlich für die Induktion von c-Jun ist. NHEM, die in geringer Wachstumsdichte ausgesät worden sind, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten NHEM keine Veränderung der c-Jun Expression. Man vermutet, dass durch fehlende Zell-Zell-Kontakte keine Regulation von c-Jun stattfinden kann (Abbildung 4-14).

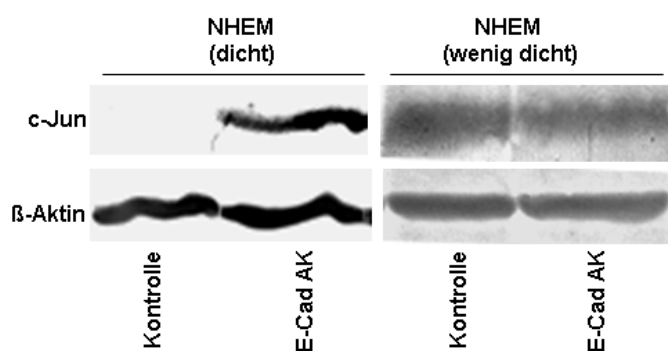


Abbildung 4-14: Western Blot Analysen der c-Jun Protein Expression in normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) in unterschiedlichen Wachstumsdichten behandelt mit einem inhibitorischen E-cadherin Antikörper.

In Analogie dazu wurden die NHEM mit siRNA gegen E-cadherin behandelt. Es konnte bestätigt werden, dass die c-Jun Protein Expression in NHEM, ausgesät in hoher Wachstumsdichte, nach E-cadherin siRNA Behandlung induziert wurde. In wenig dicht gewachsenen Zellen hingegen zeigte die siRNA Transfektion keinen Effekt auf die c-Jun Protein Expression (Abbildung 4-15).

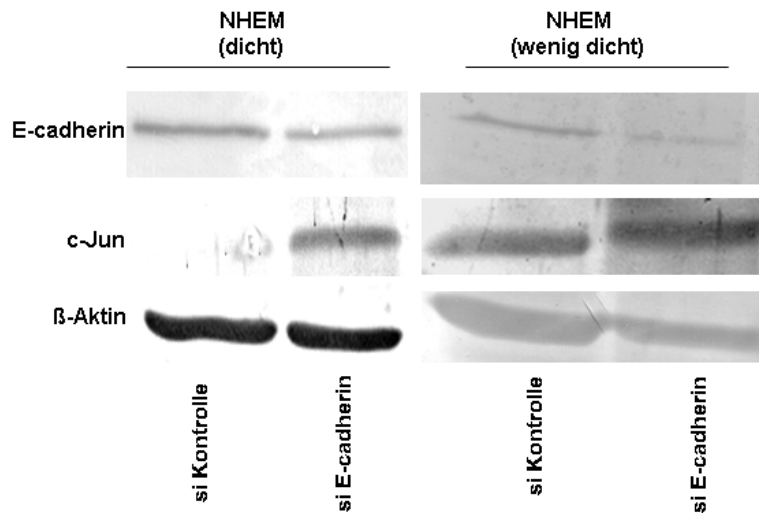


Abbildung 4-15: Western Blot Analysen der c-Jun Expression in NHEM behandelt mit siRNA gegen E-cadherin.

Als nächstes war von Bedeutung, ob die Zell-adhäsionsabhängige Regulation von c-Jun, die man für NHEM gezeigt hat, auch im Melanom zu beobachten ist. Es wurde zunächst untersucht wie sich der Verlust der extrazellulären Domäne von E-cadherin auf die Regulation von c-Jun auswirkt, denn die extrazelluläre Domäne ist für den Aufbau von aktiven Zell-Zell-Kontakten entscheidend. Für diese Analysen wurde die Zelllinie Mel Im mit zwei verschiedenen E-cadherin Derivaten stabil transfiziert. Dabei handelt es sich um Vektoren, in denen die cDNA für die intrazelluläre Domäne von E-cadherin kloniert worden ist. In einen Vektor wurde die cDNA für den zytoplasmatischen Teil von E-cadherin kloniert. Dies bedeutet, dass nur ein löslicher zytoplasmatischer Teil von E-cadherin translatiert wird (CD-Klone C,D,E). In das zweite Konstrukt wurde die cDNA für die intrazelluläre Domäne von E-cadherin, das über ein Myristoylation Signal an die Membran gebunden vorliegt, kloniert (M-Klone 2 und 3) (Kuphal et al., 2006). Mittels Western Blot Analysen konnte man weder in den CD- noch in den M-Klonen im Vergleich zu pcDNA und pCMX Kontrollen eine Veränderung der c-Jun Expression beobachten (Abbildung 4-16). Man geht deshalb davon aus, dass auch im Melanom eine Zell-adhäsionsabhängige Regulation von c-Jun stattfindet.

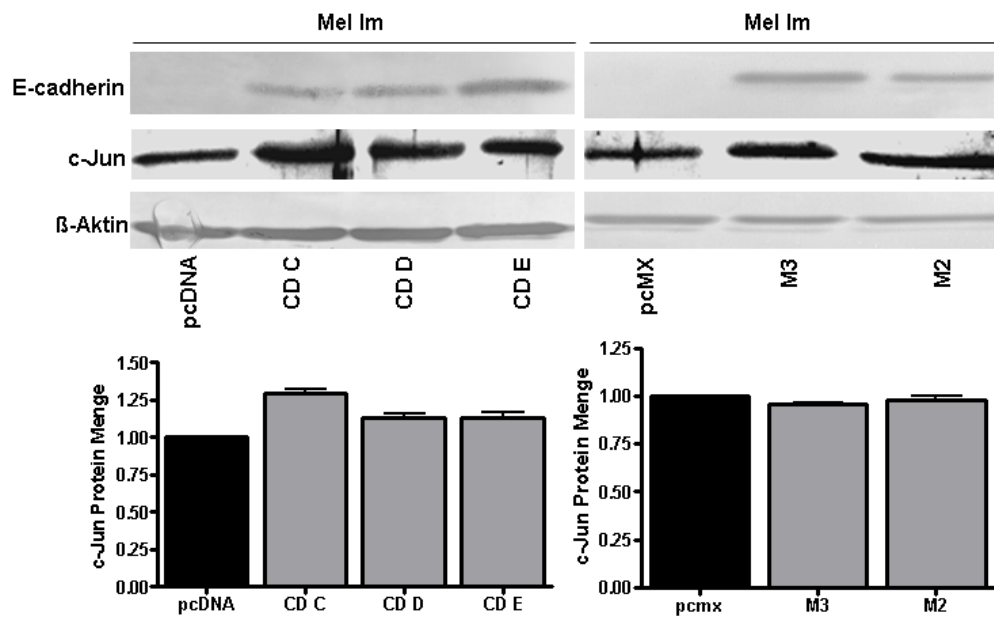


Abbildung 4-16: Western Blot Analyse der c-Jun Expression in CD- und M-Klonen. (Erläuterung siehe Text). Der Verlust der extrazellulären Domäne führt zu keiner Veränderung der c-Jun Expression.

Zusammenfassend kann man sagen, dass aktive Zell-Zell-Kontakte über den extrazellulären Teil von E-cadherin entstehen müssen, um auf die Regulation von c-Jun Einfluss nehmen zu können.

4.2.2.2 Ko-Kulturexperimente mit Keratinozyten und Melanozyten

Im normalen Hautverbund stehen Melanozyten im engen Kontakt mit Keratinozyten. Dabei kommt dem Adhäsionsmolekül E-cadherin eine entscheidende Rolle zu (siehe Kapitel 1.4.2). Um nun die Regulation von c-Jun unter physiologischen Bedingungen zu analysieren, wurden für die nächsten Untersuchungen Ko-Kultur Experimente angewendet. Hierfür wurden Melanozyten und Keratinozyten gemeinsam im physiologischen Verhältnis von 1:4 kultiviert. Melanozyten besitzen *in vitro* die Eigenschaft, dass sie, je öfter sie passagiert werden, die E-cadherin Expression verlieren und „Melanom“ ähnliche Eigenschaften erlangen (Haass et al., 2004). Deshalb wurden für die Ko-Kultur Versuche eine frühe Passage von Melanozyten (P2), die E-cadherin exprimiert, und eine späte Passage (P5), die bereits die E-cadherin Expression verloren hat, verwendet.

Zunächst wurden die Melanozyten der zwei verschiedenen Passagen hinsichtlich ihrer E-cadherin und c-Jun Expression untersucht. Die Melanozyten wurden jeweils in hoher und niedriger Wachstumsdichte ausgesät. Bei geringer Wachstumsdichte zeigte sich mittels Western Blot Analyse, dass c-Jun unabhängig vom E-cadherin Expressionsstatus der beiden Melanozyten Passagen exprimiert wurde. Bei hoher Wachstumsdichte allerdings, kam es zum Verlust der c-Jun Proteinexpression in den Melanozyten der frühen Passage (P2). Dies ließ vermuten, dass bei hoher Wachstumsdichte aktive Zell-Zell-Kontakte durch E-cadherin zustande kommen, die einen regulatorischen Einfluss auf die c-Jun Expression haben. In den Melanozyten der späten Passage (P5), die keine E-cadherin Expression mehr aufweisen, konnte selbst bei hoher Wachstumsdichte eine starke c-Jun Protein Expression nachgewiesen werden. Hier wurden keine Zell-Zell-Kontakte über E-cadherin gebildet werden. Dies führte zu einer Induktion der c-Jun Protein Expression. Die graphische Darstellung zeigt die densitometrische Vermessung der c-Jun Protein Expression von Melanozyten verschiedener Passagen, gewachsen in niedriger und hoher Wachstumsdichte. (Abbildung 4-17 (A)).

Mittels Immunfluoreszenz Analysen wurde zusätzlich die E-cadherin Expression (grün) in den beiden Melanozyten Passagen und der Zelllinie HaCaT analysiert. Es konnte eine starke E-cadherin Färbung in NHEM P2 und in HaCaTs nachgewiesen werden, wohingegen in NHEM P5 die E-cadherin Färbung nicht sichtbar war. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt (Abbildung 4-17(B)).

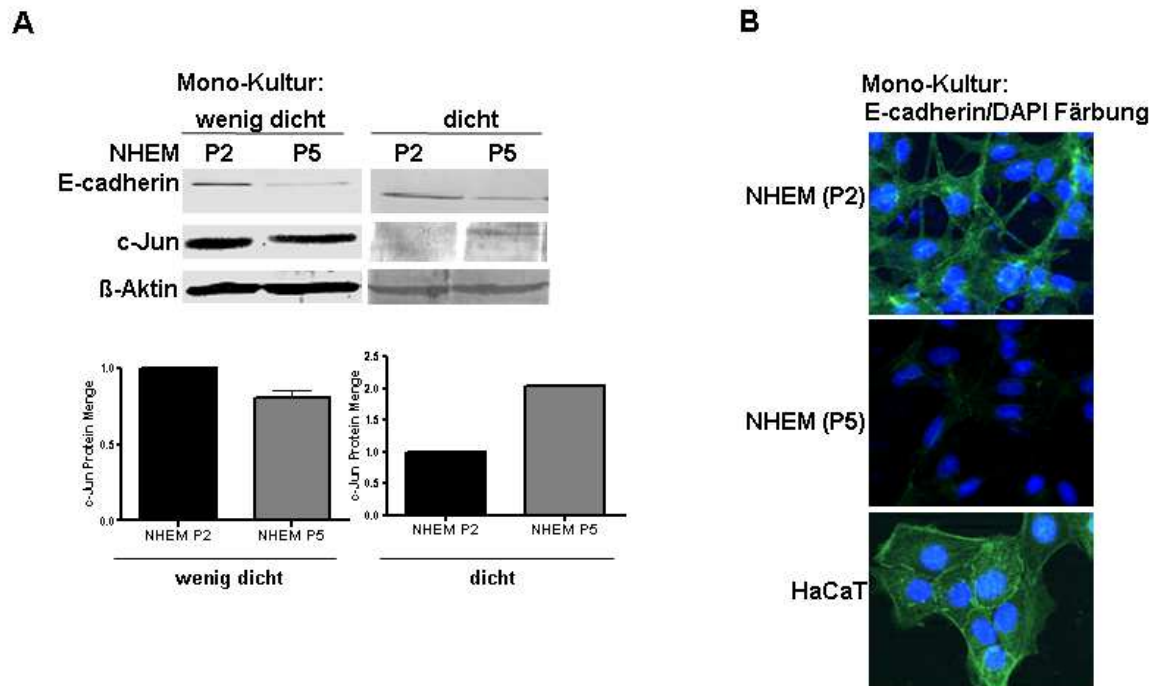


Abbildung 4-17: (A) Western Blot Analysen der c-Jun und E-cadherin Expression verschiedener Melanozyten Passagen in unterschiedlichen Dichten. Eine densitometrische Vermessung wurde durchgeführt. (B) Immunfluoreszenz-Analyse der E-cadherin Expression in Melanozyten und Keratinozytenkultur. grün= E-cadherin; blau (DAPI)= Kern

Im nächsten Schritt wurden die Melanozyten der beiden Passagen jeweils mit Keratinozyten ko-kultiviert, um unter physiologischen Bedingungen die adhäsionsabhängige Regulation von c-Jun zu untersuchen.

Western Blot Analysen und die dazugehörige densitometrische Vermessung zeigten, dass die c-Jun Expression in dem Ko-Kulturansatz NHEM P2 und HaCaTs verloren ging, wohingegen im Ko-Kulturansatz NHEM P5 und HaCaTs c-Jun Protein nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4-18 (A)). Man geht davon aus, dass zwischen NHEM P2 und HaCaTs aktive Zell-Zell-Kontakte über E-cadherin aufgebaut wurden, die für die Regulation von c-Jun Protein wichtig sind. In der Keratinozytenzelllinie HaCaT konnte nur eine geringe Expression von c-Jun Protein nachgewiesen werden.

Mittels Immunfluoreszenzanalysen konnten diese Ergebnisse nochmals bestätigt werden (Abbildung 4-18 (B)). Monokultivierung der frühen und späten Passage von NHEMs und der Keratinozyten zeigten eine deutliche c-Jun Kernfärbung (grün).

Tyrosinase (rot) wurde als Melanozytenmarker verwendet. In der Ko-Kultur der frühen Passage NHEM P2 mit Keratinozyten (HaCaT) konnte eine deutliche Abnahme der c-Jun Kernfärbung (grün) beobachtet werden, wohingegen die Ko-Kultur der späten Passage NHEM P5 mit Keratinozyten noch eine deutliche c-Jun Kernfärbung (grün) erkennen ließ. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Die Ko-Kultur Versuche wurden in hoher Wachstumsdichte durchgeführt, sodass die Zellen aktive Zell-Zell-Kontakte aufbauen konnten.

Ko-Kultur mit Keratinozyten

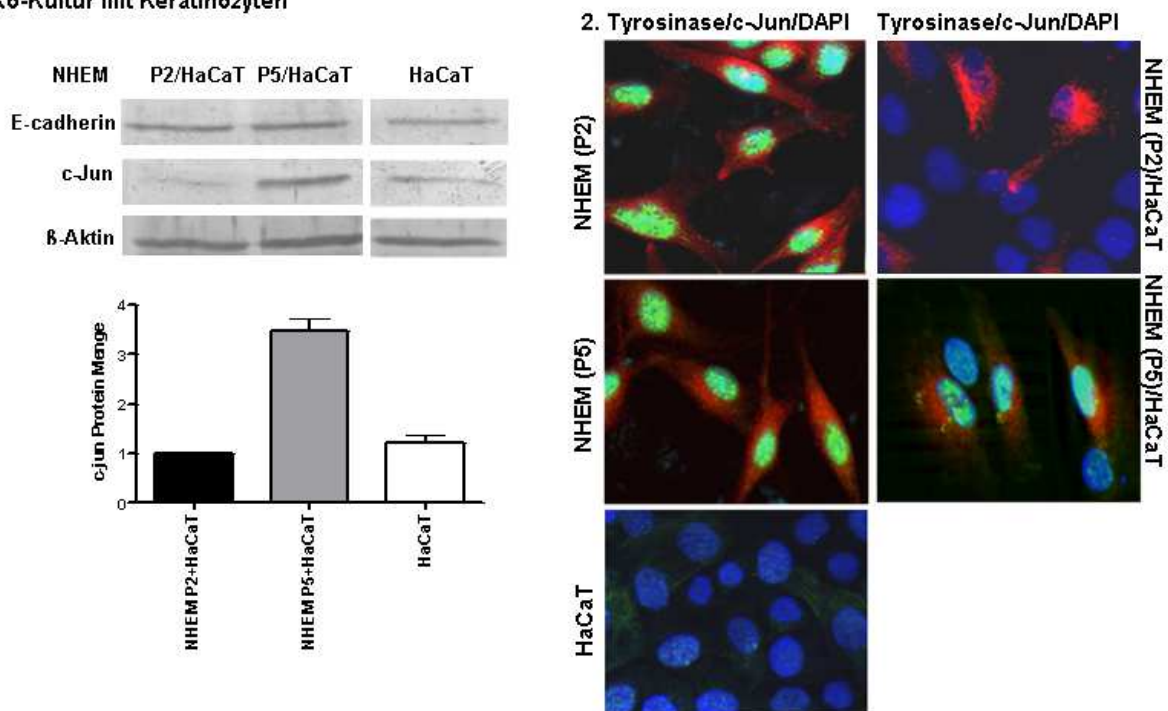


Abbildung 4-18: Kokulturrexperimente mit Melanozyten und Keratinozyten. (A) Western Blot Analyse der c-Jun Expression in der Kokultur Melanozyten/ Keratinozyten. Es wurden zwei verschiedene Melanozyten Passagen verwendet. (B) Immunfluoreszenz-Analyse der c-Jun Expression in Melanozyten, Keratinozyten und Kokultur der beiden Zelltypen. Grün= c-Jun; rot= Tyrosinase (Melanozytenmarker); blau (DAPI)= Kern

Damit bestätigt sich, dass die Expression von E-cadherin nicht ausreicht, um c-Jun zu regulieren. Erst der Verlust von aktiven Zell-Zell-Kontakten ist für die starke Induktion von c-Jun Protein im malignen Melanom verantwortlich.

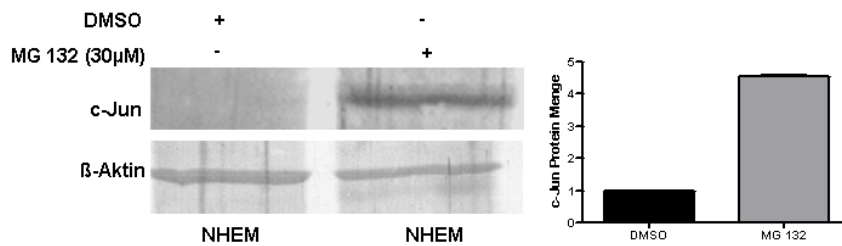
4.3 Die Regulation von c-Jun erfolgt über Protein Stabilität

In vorherigen Ergebnissen konnte bereits gezeigt werden, dass für die c-Jun Expression eine posttranskriptionelle Regulation zugrunde liegt. Hinweise darauf lieferte zusätzlich eine Publikation von Polak und Mitarbeitern. Sie zeigten, dass Veränderungen der c-Jun Protein Mengen nicht mit Änderungen der mRNA Mengen einhergingen (Polak et al., 2006). Deshalb wurden nun verschiedene Moleküle, die an der posttranskriptionellen Regulation von c-Jun beteiligt sein könnten, untersucht.

4.3.1 Posttranskriptionelle Regulation von c-Jun

Zunächst sollte geklärt werden, ob Proteinstabilität als eine Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation für c-Jun in Frage kommt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Versuche mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 durchgeführt. Sowohl NHEM als auch die Melanomzelllinie Mel Im wurden mit dem inhibitor MG 132 behandelt. Für die Melanozyten zeigte sich, dass nach Behandlung mit MG 132 vermehrt c-Jun Protein, im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen, angereichert wurde. Die Expression von c-Jun wurde zusätzlich graphisch dargestellt (Abbildung 4-19 (A)). Hingegen konnte in Mel Im Zellen keine Änderung der c-Jun Proteinmengen beobachtet werden (Abbildung 4-19 (B)). Dies lässt vermuten, dass die Menge an c-Jun Protein in Mel Im Zellen bereits maximal stabilisiert wird. Damit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass Proteinstabilität zu den hohen c-Jun Mengen beiträgt.

A



B

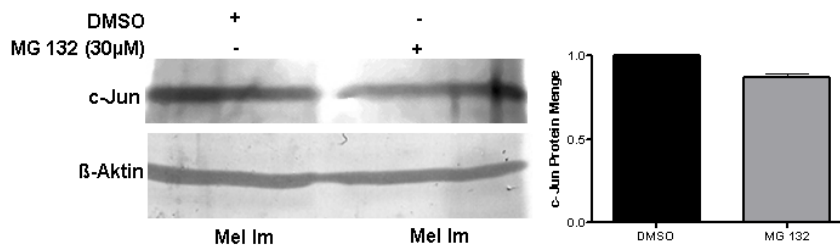


Abbildung 4-19: Western Blot Analysen der c-Jun Expression von Melanozyten (NHEM) und Mel Im Zellen nach Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor MG132.

4.3.2 Rolle verschiedener Kinasen in der Regulation der Proteinstabilität von c-Jun

4.3.2.1 Die Rolle der MAPKinasen ERK und JNK

Als nächstes wollte man genauer untersuchen, welche Signalwege für die Proteinstabilität von c-Jun von Bedeutung sein könnten. Es wurde beschrieben, dass die MAPKinase c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) für die Aktivierung durch Phosphorylierung von Serin73 und Serin63 des c-Jun Transkripts verantwortlich ist (siehe Kapitel 1.3.2). Außerdem konnten Lopez – Bergami und Mitarbeiter (2007) vor kurzem zeigen, dass der konstitutiv aktive ERK-Signalweg mit der Kinase JNK zur Proteinstabilität von c-Jun im Melanom führt (siehe Kapitel 1.3.3). Deshalb wurde nun genauer überprüft, ob die beiden Kinasen ERK und JNK auch an der E-cadherin abhängigen Regulation von c-Jun in den von uns untersuchten Zellen beteiligt sein könnten. Die Analysen wurden mit den Zelllinien Mel Im und A375 durchgeführt. Die Zelllinie A375 diente hierbei als „positive Kontrolle“ für die Aktivierung von c-Jun durch den aktiven ERK/JNK-Weg. Dies konnten Lopez-Bergami und Mitarbeiter für diese Zelllinie bereits zeigen (Lopez-Bergami et al., 2007).

Die beiden Zelllinien wurden mit spezifischen Inhibitoren für JNK (SP600125) und MEK/ERK (PD98059) behandelt. Mittels Western Blot Analysen wurde die Expression von JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, c-Jun und p-c-Jun bestimmt. Für die Zelllinie A375 konnte nach Inhibierung von ERK eine Abnahme der c-Jun Gesamtproteinmenge beobachtet werden. Allerdings führte die Inhibierung von JNK zu keiner Veränderung der c-Jun Proteinmengen (Abbildung 4-20). Für die Zelllinie Mel Im konnte weder nach Inhibierung von ERK noch JNK eine Veränderung der c-Jun Gesamtproteinmenge nachgewiesen werden. Die c-Jun Gesamtproteinmengen für beide Zelllinien nach Inhibition von ERK und JNK wurden zusätzlich graphisch dargestellt (Abbildung 4-20).

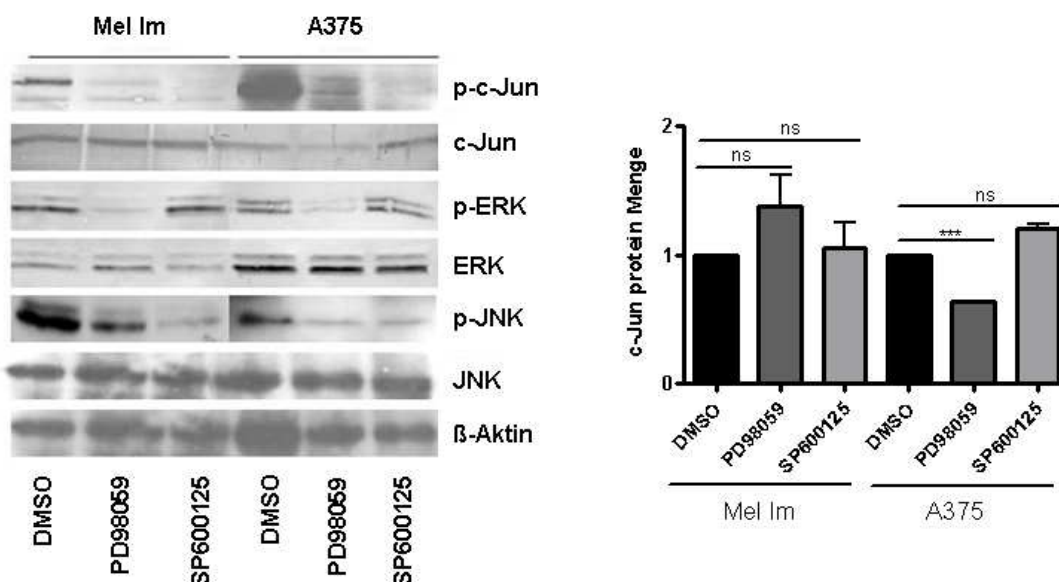


Abbildung 4-20: Die Rolle der MAPKinasen ERK und JNK in der Regulation von c-Jun. Inhibition der MAPKinase ERK (PD98059) führt in der Zelllinie A375 zu Veränderungen der c-Jun Protein Expression, nicht aber die Inhibition von JNK (SP600125). Weder ERK noch JNK haben in der Zelllinie Mel Im Einfluss auf die c-Jun Proteinmenge. Densitometrische Darstellung der c-Jun Gesamtproteinmenge nach Inhibition von ERK und JNK in A375 und Mel Im.

In Analogie dazu wurde die AP-1 Aktivität in den beiden Zelllinien gemessen. Es bestätigte sich, dass ERK in der Zelllinie A375 sowohl auf c-Jun als auch auf die AP-1 Aktivität einen Einfluss hat. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass JNK die AP-1 Aktivität in dieser Zelllinie nicht beeinflusst, was bereits für die Expression von c-Jun gezeigt wurde. Auch für die Zelllinie Mel Im konnte nachgewiesen werden, dass ERK und JNK keinen Einfluss auf die AP-1 Aktivität haben (Abbildung 4-21).

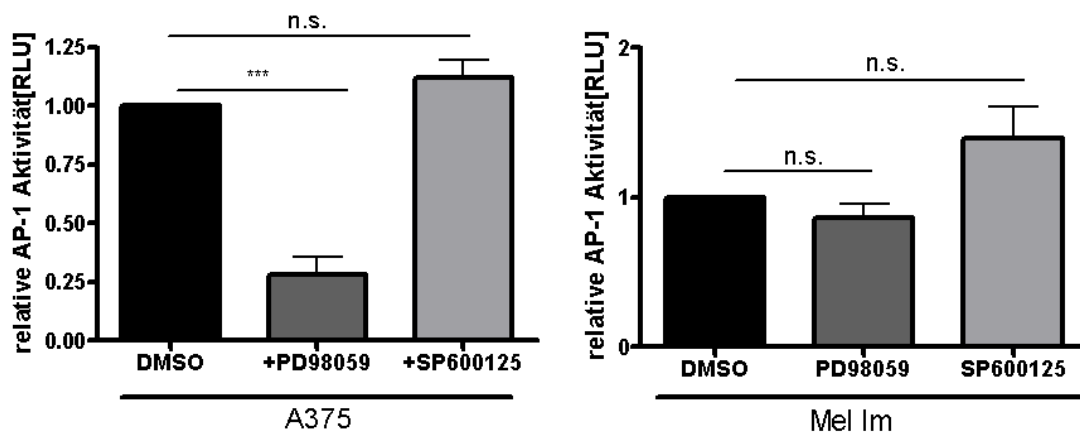


Abbildung 4-21: Luciferase Aktivitätsmessung. Inhibition von ERK mit PD98059 führt in der Zelllinie A375 zur Reduktion der AP-1 Aktivität. Inhibition von JNK mit SP600125 hat keinen Einfluss auf die AP-1 Aktivität in beiden Zelllinien. Je Zelllinie wurden vier Wiederholungen durchgeführt.

Dies lässt spekulieren, dass die Stabilität des c-Jun Proteins in der Zelllinie A375 über die aktiven Kinasen ERK und JNK vermittelt wird. Für die Melanomzelllinie Mel Im sind andere, noch unbekannte Moleküle für die Stabilität von c-Jun wichtig.

4.3.2.2 Die Rolle der MAPKinase p38

Die MAPKinase p38 könnte ein weiterer möglicher Kandidat für die posttranskriptionelle Regulation von c-Jun sein. Um dies zu untersuchen, wurde die Melanomzelllinie Mel Im mit zwei spezifischen Inhibitoren für p38 behandelt (SB202190 und SB203580). Allerdings konnte mittels Western Blot Analysen keine Veränderung der c-Jun Expression, verglichen zu Kontroll-behandelten Zellen beobachtet werden (Abbildung 4-22).

Damit kann auch die MAPKinase p38 als Regulator der c-Jun Proteinstabilität ausgeschlossen werden.

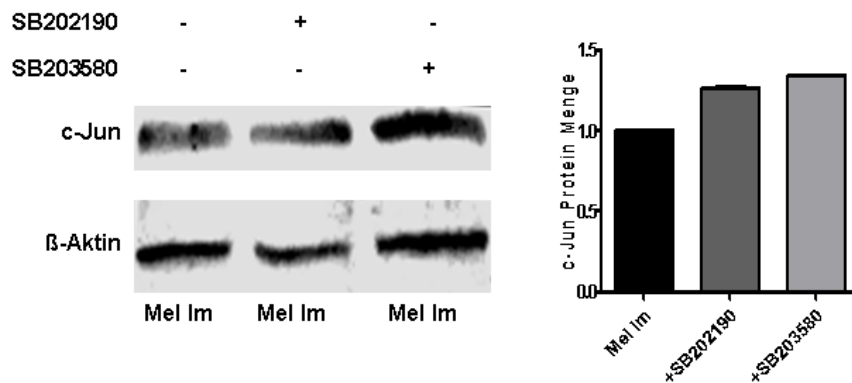


Abbildung 4-22: Untersuchung der MAPKinase p38 in der Regulation von c-Jun. Inhibition von p38 mit SB202190 und SB203580 führte zu keiner Veränderung der c-Jun Expression. Densitometrische Darstellung der c-Jun Proteinmengen nach Inhibition von p38.

4.3.2.3 Die Rolle des Transkriptionsfaktors NFkB

Als nächstes stellte sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor NFkB an der Stabilität von c-Jun beteiligt sein könnte. Dafür wurden die Melanomzelllinien Mel Im und Mel Ei mit einem adenoviralen Vektor für stabiles Ikb transduziert. Das Molekül Ikb ist der zelluläre Repressor von NFkB und verhindert, dass die NFkB Untereinheiten in den Zellkern translozieren und Zielgene aktivieren können. Mittels Western Blot Analysen wurde die c-Jun Protein Expression nach 24h und 48h Inkubationszeit mit dem zellulären Inhibitor untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass die c-Jun Protein Expression durch Inhibierung von NFkB nicht beeinflusst wurde (Abbildung 4-23).

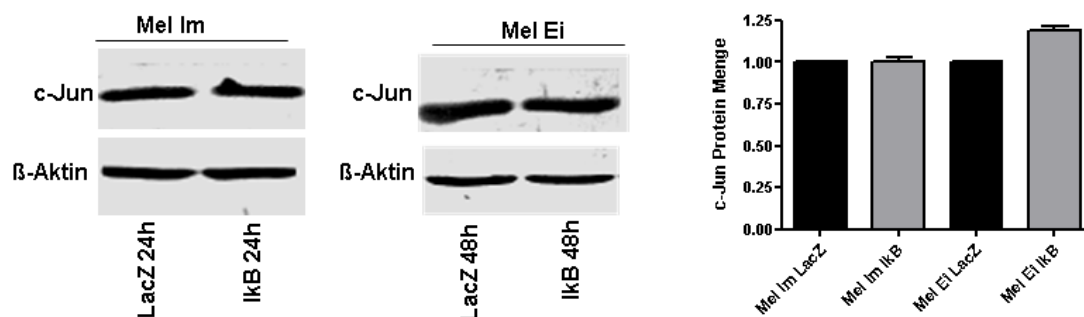


Abbildung 4-23: Die Rolle Transkriptionsfaktors NFkB in der Regulation von c-Jun. Transduktion eines adenoviralen Ikb-Konstruktes in Mel Im und Mel Ei Zellen entweder für 24h oder 48h zeigte gleichbleibende c-Jun Protein Expression verglichen zur LacZ Kontrolle. Graphische Darstellung der c-Jun Protein Menge nach Inhibierung von NFkB.

4.4 Posttranskriptionelle Regulation von c-Jun durch das Zytoskelett

Im vorherigen Kapitel konnte deutlich dargestellt werden, dass für das Melanom wichtige MAPKinasen und Transkriptionsfaktoren in der posttranskriptionellen Regulation von c-Jun keine Rolle spielen. Es blieb also die Frage offen, wie c-Jun im Melanom E-cadherin abhängig reguliert wird. Dafür wurde als nächstes das Zytoskelett in Betracht gezogen. Es ist bereits beschrieben, dass in epithelialen Zelltypen durch das Zytoskelett eine Regulation von c-Jun stattfindet (Reisfeld und Vardimon, 1994; Lallemand et al., 1998; Oren et al., 1999). Zusätzlich zeigen vorherige Ergebnisse, dass Zell-Zell-Kontakte an der Regulation von c-Jun beteiligt sind. Auf- und Abbau von Zell-Kontakten sind immer mit Umstrukturierungen des Zytoskeletts verbunden. Dies lässt spekulieren, ob das Zytoskelett oder einzelne Bestandteile davon an der posttranskriptionellen Regulation von c-Jun beteiligt sein könnten.

4.4.1 Rolle des Zytosketts in der Regulation von c-Jun

Um nun die Rolle des Zytoskeletts in der Regulation von c-Jun genauer zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Chemikalien verwendet. Nocodazol führt zur Zerstörung der Mikrotubuli und imitiert so zytoskelettale Umstrukturierungen, wie sie nach E-cadherin Verlust in der Zelle auftreten. Der Wirkmechanismus von Taxol (Paclitaxel) besteht darin, die Mikrotubuli einer Zelle zu stabilisieren. Über längere Zeit angewendet führt dies zur Apoptose der Zellen. Daher wird es bereits erfolgreich als Chemotherapeutikum in der Krebstherapie eingesetzt. Für die Analyse der c-Jun Regulation wurde nun die Zelllinie HMB2-5, die E-cadherin positiv ist, mit Nocodazol behandelt. Mittels Immunfluoreszenz konnte man beobachten, dass die Umstrukturierung des Zytosketts nach Nocodazol-Behandlung, im Vergleich zur Kontrolle, zu einer gravierenden Induktion der c-Jun Expression (grün) im Kern von HMB2-5 Zellen führte (Abbildung 4-24). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

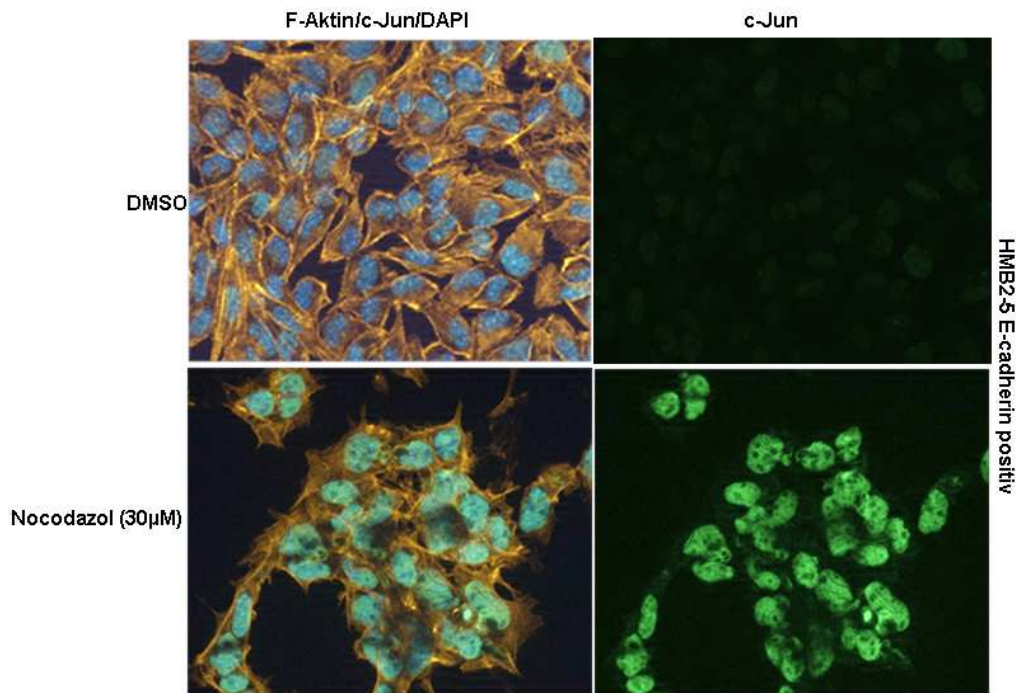


Abbildung 4-24: Immunfluoreszenzfärbung von HMB2-5 Zellen nach Nocodazol Behandlung. Die Zerstörung des Zytoskeletts nach Nocodazol Behandlung führte zur Induktion der c-Jun Expression im Kern von HMB2-5 Zellen. Rot= F-Aktin; grün= c-Jun; blau (DAPI)= Kern

In Analogie dazu wurde die Zelllinie Mel Im, die E-cadherin negativ ist, mit Taxol behandelt. Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass nach Applikation von Taxol in Mel Im Zellen, die Struktur des Zytoskeletts deutlich verändert wurde. Dies führte einer Reduktion der c-Jun Expression (grün). Die Kerne wurden wieder mit DAPI angefärbt (blau) (Abbildung 4-25).

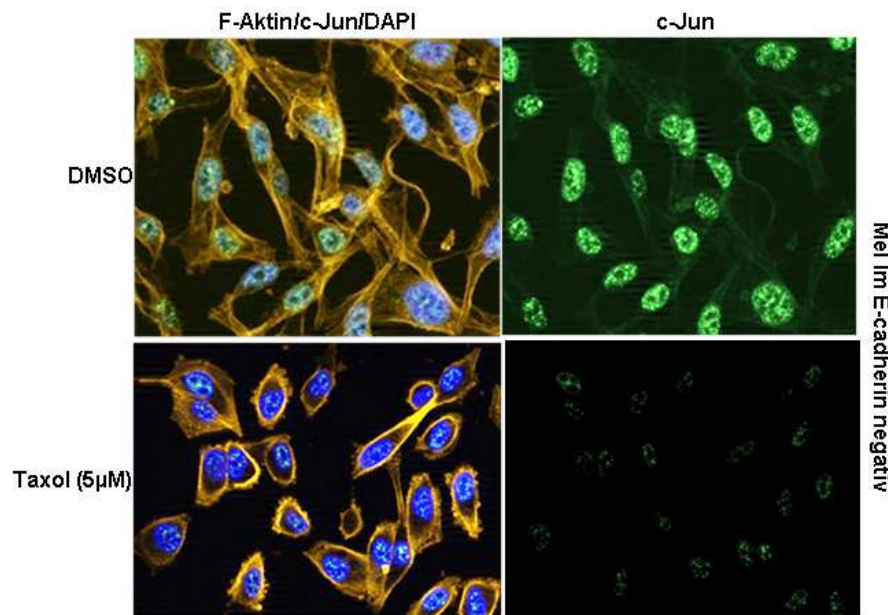


Abbildung 4-25: Immunfluoreszenzfärbung der Melanomzelllinie Mel Im nach Taxol Behandlung. Die Stabilisierung des Zytoskeletts (F-aktin, rot) führte nach Behandlung mit Taxol zur signifikanten Abnahme der c-Jun Protein Expression (grün) im Kern. Verglichen wurde mit der DMSO-behandelten Kontrolle. Kernfärbung= DAPI (blau)

Um zu bestätigen, dass Nocodazol induzierende Effekte und Taxol hemmende Effekte auf die c-Jun Protein Expression hat, wurde die AP-1 Aktivität in den Zelllinien HMB2-5 nach Nocodazol Behandlung und in Mel Im Zellen nach Taxol Behandlung gemessen. Es zeigte sich, dass nach Nocodazol Behandlung die AP-1 Aktivität in dem E-cadherin positiven Zellklon HMB2-5 signifikant anstieg, während nach Taxol Behandlung die AP-1 Aktivität in Mel Im Zellen deutlich abnahm. Es wurde jeweils mit der DMSO-behandelten Kontrolle verglichen (Abbildung 4-26).

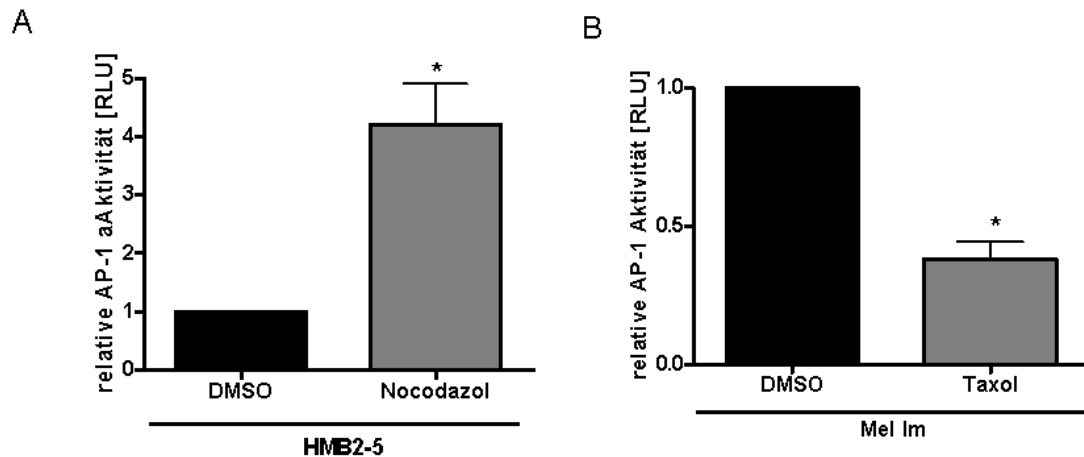


Abbildung 4-26: Luciferase Aktivitätsmessung. (A) Nach Nocodazol Behandlung nahm im Zellklon HMB2-5 die AP-1 Aktivität signifikant zu. (B) Die AP-1 Aktivität nahm nach Taxol Behandlung in Mel Im Zellen signifikant ab. Es wurde jeweils mit der entsprechenden DMSO-behandelten Kontrolle verglichen. Der Versuch wurde je Zelllinie dreimal wiederholt.

Auch in EMSAs (Electrophoretic Mobility Shift Assays) zeigte sich, dass Kern-Proteine des HMB2-5 Zellklons nach Behandlung mit Nocodazol vermehrt an das radioaktiv markierte AP-1 Oligonukleotid binden, wohingegen in Mel Im Zellen nach Behandlung mit Taxol, diese Bindung abnahm (Abbildung 4-27). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der Luciferase Messung.

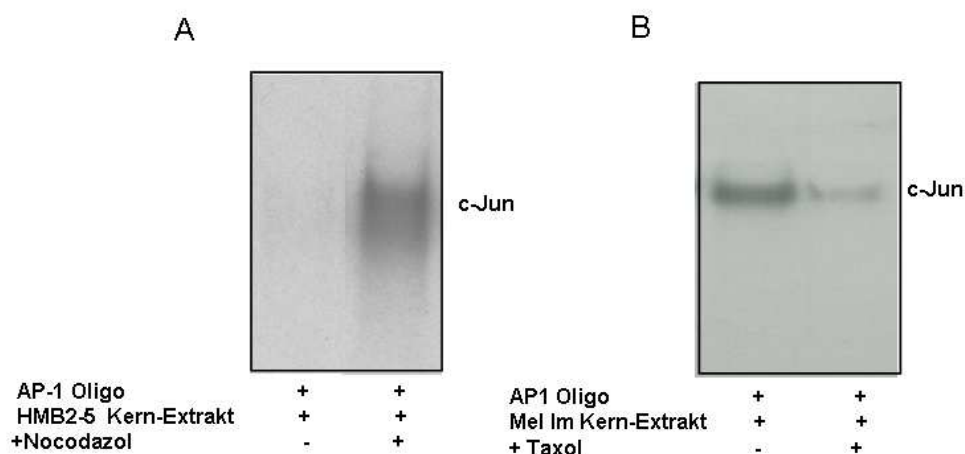


Abbildung 4-27: Electrophoretic mobility shift assay. (A) Nach Nocodazol Behandlung nahm die Bindung der Kern-Proteine an die AP-1 Konsensus Sequenz zu. (B) Nach Taxol Behandlung nahm die Bindung der Kern-Proteine an die AP-1 Konsensus Sequenz ab. Der Versuch wurde für die Nocodazol als auch für die Taxol Behandlung dreimal durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Zytoskelett und der Vorgang der Umstrukturierung an der posttranskriptionellen Regulation von c-Jun beteiligt ist.

4.4.2 Beteiligung der RhoGTPase RhoC

Im nächsten Abschnitt wird nun genauer untersucht, ob Moleküle, die mit dem Zytoskelett in Zusammenhang stehen, an der Regulation von c-Jun beteiligt sind.

4.4.2.1 Expression von RhoC hat Einfluss auf die c-Jun Protein Expression

Bisherige Ergebnisse zeigten, dass Umstrukturierungen des Zytoskeletts Auswirkung auf die Regulation von c-Jun haben. Es stellte sich nun die Frage, wie die zytoskelettale Struktur in den Signalweg der c-Jun Regulation eingreifen kann. In den Fokus der Analysen rückten dabei RhoGTPasen. Es wurde bereits beschrieben, dass RhoGTPasen Modulatoren der zytoskelettalen Struktur sind, und dadurch eine Signalweiterleitung ermöglichen. Im Melanom spielt vor allem die RhoGTPase RhoC eine wichtige Rolle. Sie ist im malignen Melanom stark überexprimiert und vor allem an Metastasierungsprozessen beteiligt (Hakem et al., 2005; Ruth et al., 2006; Boone et al., 2009). Zunächst wurde überprüft, ob Rho-Proteine an der Regulation von c-Jun beteiligt sind. Dafür wurden dominant negative Rho Konstrukte verwendet, die mit hoher Affinität GDP binden und dadurch nicht mehr aktiviert werden können.

Es konnte mittels Western Blot Analysen beobachtet werden, dass nach Expression des DNRhoC Konstruktes in der Melanomzelllinie Mel Im, verglichen mit der pcDNA-Kontrolle, die c-Jun Expression deutlich abnahm. Hingegen führte die Expression von DNRhoA und DNRhoB Konstrukten zu keiner Veränderung der c-Jun Gesamtproteinmengen (Abbildung 4-28).

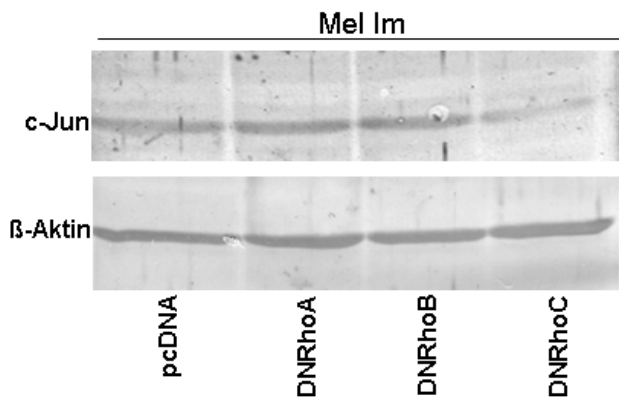


Abbildung 4-28: Western Blot Analyse der c-Jun Expression in Mel Im Zellen nach Transfektion von dominant negativen Rho-Konstrukten. Der pcDNA Leervektor wurde als Negativkontrolle verwendet.

In Analogie dazu wurde die AP-1 Aktivität in der Zelllinie Mel Im nach Transfektion von DNRhoA, DNRhoB und DNRhoC Konstrukten analysiert. Übereinstimmend mit den Protein Daten, konnte im Vergleich zur pcDNA Kontrolle eine Reduktion der AP-1 Aktivität nur nach Transfektion des dominant negativen RhoC Konstruktes beobachtet werden. Die DNRhoA und DNRhoB Konstrukte zeigten keine Effekte auf die AP-1 Aktivität (Abbildung 4-29).

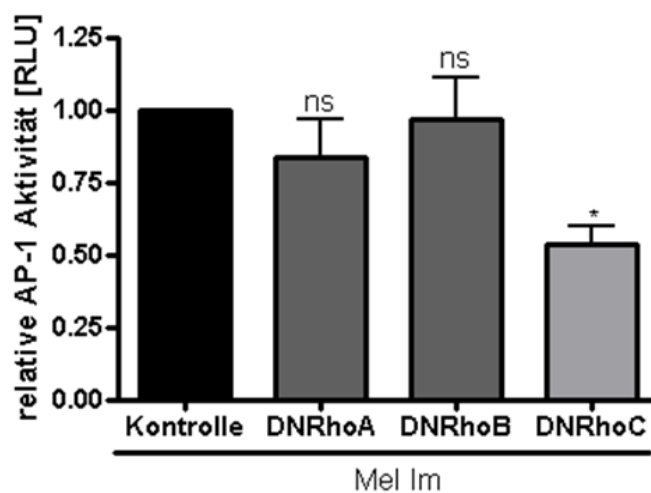


Abbildung 4-29: Luciferase Aktivitätsmessung. Transfektion eines DNRhoC Konstruktes führte zur Reduktion der AP-1 Aktivität. RhoA und RhoB zeigten keine Effekte. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Für alle nachfolgenden Experimente wurde nur noch die Expression von RhoA und RhoC untersucht, da im Melanom hauptsächlich die RhoGTPase RhoC für Metastasierungsprozesse verantwortlich ist (Hakem et al., 2005; Ruth et al., 2006; Boone et al., 2009). Die Analyse der RhoA Expression diente als „negative“ Kontrolle.

4.4.2.2 Zusammenhang zwischen E-cadherin und RhoC

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob ein regulatorischer Zusammenhang zwischen RhoC und dem Verlust von E-cadherin besteht. Mittels quantitativer RT-PCR stellt sich heraus, dass die RhoC mRNA Expression nach E-cadherin Re-expression in den Melanomzelllinien Mel Im und Mel Juso signifikant abnahm. Die RhoA mRNA Expression hingegen bleibt in denselben Proben unverändert (Abbildung 4-30).

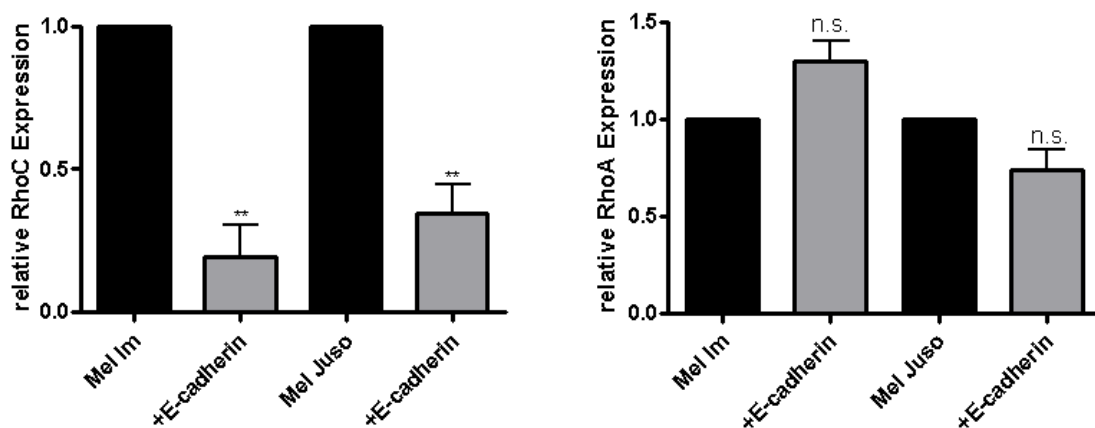


Abbildung 4-30: quantitative RT-PCR Analysen der RhoC und RhoA mRNA Expression in E-cadherin re-exprimierenden Zellen. Die Expression der RhoC und RhoA mRNA Mengen wurde in je drei Replikaten nachgewiesen.

Um die RhoC Expression in Abhängigkeit von E-cadherin auch auf Proteinebene zu analysieren, wurden die Zelllinien Mel Im und Mel Juso nach adenoviraler E-cadherin Transduktion mittels Western Blot untersucht. Es war entsprechend der mRNA Daten ein Rückgang der RhoC Expression nach E-cadherin Re-expression in beiden Zelllinien zu beobachten. Als Vergleich diente die Transduktion mit einem LacZ-Vektor (Abbildung 4-31).

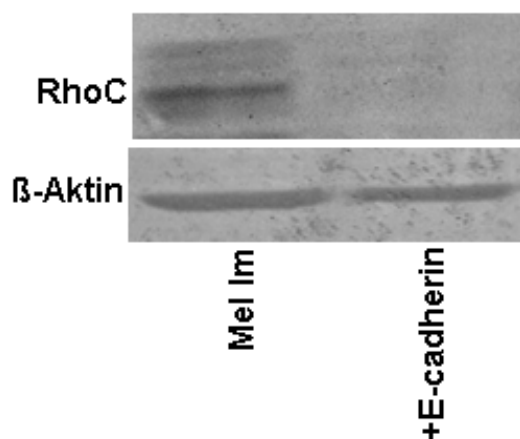


Abbildung 4-31: Messung der RhoC Protein Expression nach E-cadherin Re-expression in Mel Im Zellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression der RhoGTPase RhoC an der E-cadherin-abhängigen Regulation von c-Jun eine wichtige Rolle spielt.

4.4.3 Beteiligung des Transkriptionsfaktors Ets-1

Für das Kolon-Karzinom konnte kürzlich gezeigt werden, dass unter Einfluss von E-cadherin RhoC zum einen am Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp beteiligt ist, und zum anderen konnten im *RhoC* Promotorbereich Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Ets-1 identifiziert werden (Bellovin et al., 2008).

Im Melanom spielt der Transkriptionsfaktor Ets-1 eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.3.1). Deshalb stellte sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor Ets-1 auch im Melanom einen Einfluss auf die Expression von RhoC hat. Für die Analysen wurden Mel Im Zell-Klone herangezogen, bei denen durch anti sense Strategie die Expression für Ets-1 ausgeschaltet worden ist (asEts-Klone). Diese Klone sind im Labor bereits etabliert und charakterisiert worden (Rothhammer et al., 2004). Es konnte mittels quantitativer RT-PCR gezeigt werden, dass, verglichen zu Kontrollzellen, die mit dem Leervektor pcDNA stabil transfiziert wurden, die RhoC mRNA Expression in einem asEts-Klon signifikant verringert war. Übereinstimmend mit vorherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass auch im asEts- Zellklon im Vergleich zu pcDNA transfizierte Mel Im Zellen die RhoA mRNA Expression nicht verändert wurde (Abbildung 4-32).

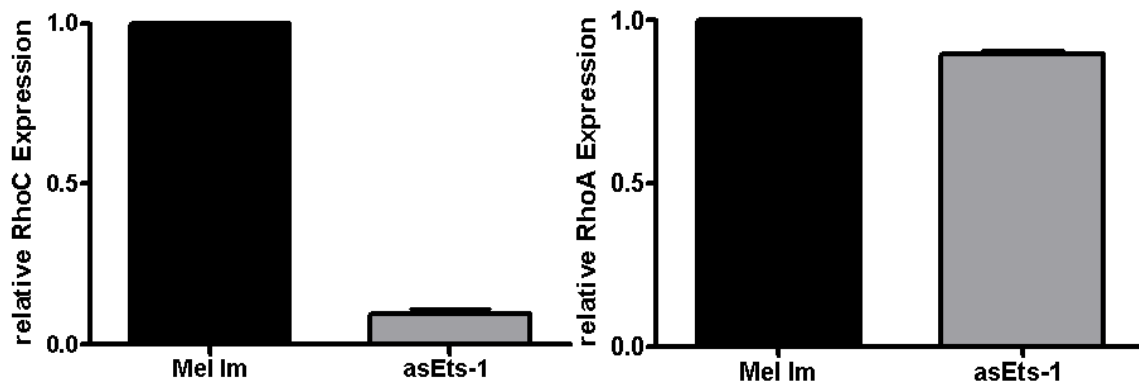


Abbildung 4-32: quantitative RT-PCR Analysen der RhoC und RhoA mRNA Expression in einem asEts-Klon. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

Zusätzlich wurde im asEts-Zellklon die RhoC Expression mittels Western Blot Analyse auch auf Proteinebene untersucht. Es konnte eine deutliche Reduktion der RhoC Expression im asEts- Zellklon, verglichen zur pcDNA Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 4-33).

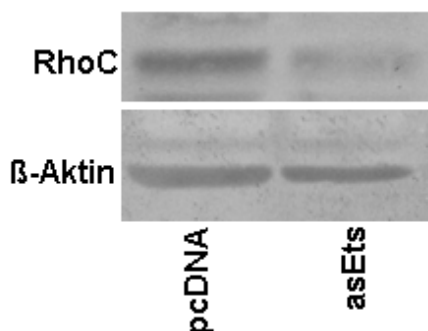


Abbildung 4-33: Western Blot Analyse der RhoC Expression in einem asEts- Zell-Klon.

Damit konnte gezeigt werden, dass im Melanom ein Zusammenhang zwischen der Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 und der Expression der RhoGTPase RhoC besteht.

Als nächstes wurde überprüft, ob die Expression von Ets-1 auch Einfluss auf die c-Jun Protein Expression und AP-1 Aktivität hat. Mittels Western Blot Analysen wurde in zwei asEts-Zellklonen und der entsprechenden Kontrolle die c-Jun Expression untersucht. Überraschenderweise konnte ein fast kompletter Verlust der c-Jun Expression, verglichen mit den pcDNA Kontroll transfizierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 4-34 (A)). Übereinstimmend mit diesen Daten konnte eine Reduktion der AP-1 Aktivität in den beiden Zell-Klonen nachgewiesen werden (Abbildung 4-34 (B).)

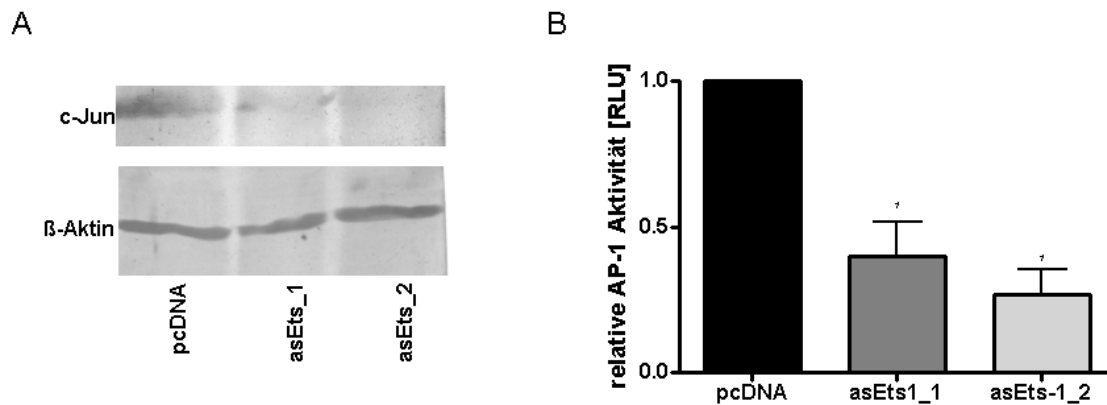


Abbildung 4-34: Analyse der c-Jun Expression und AP-1 Aktivität in asEts-Zellklonen. (A) Western Blot Analysen zeigten einen fast vollständigen Verlust der c-Jun Protein Expression in asEts-Klonen (asEts_1; asEts_2) verglichen mit pcDNA kontroll-transfizierten Mel Im Zellen. (B) Luciferase Aktivitätsmessung. Eine Reduktion der AP-1 Aktivität konnte in asEts Zellklonen (asEts_1; asEts_2) im Vergleich zum pcDNA transfizierten Zellklon beobachtet werden. Die Luciferase Messung wurde in drei Replikaten durchgeführt.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von E-cadherin und der Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 besteht. Um dies genauer zu untersuchen, wurden mittels quantitativer RT-PCR die Ets-1 mRNA Mengen in Mel Im und Mel Juso Zellen nach E-cadherin Transduktion bestimmt. Erstaunlicherweise nahm die Ets-1 Expression in den E-cadherin re-exprimierenden Zellen, im Vergleich zu den LacZ Kontroll transduzierten Zellen signifikant ab (Abbildung 4-35).

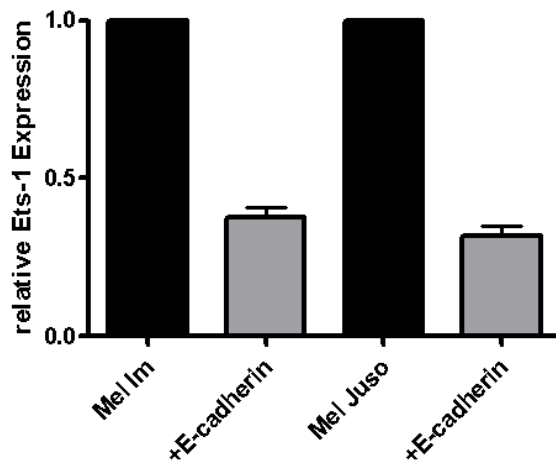


Abbildung 4-35: quantitativer RT-PCR Analyse der Ets-1 mRNA Expression in den Melanomzelllinien Mel Im und Mel Juso nach E-cadherin Transduktion. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

Es ließ sich ferner zeigen, dass die Re-expression von E-cadherin zur Abnahme der transkriptionellen Aktivität von Ets-1 führte (Abbildung 4-36). Dies ist in Übereinstimmung mit den mRNA Daten. LacZ transduzierte Mel Im Zellen dienten als positive Kontrolle, Transfektion eines pGL3 basic Leervektor wurde als Negativkontrolle verwendet.

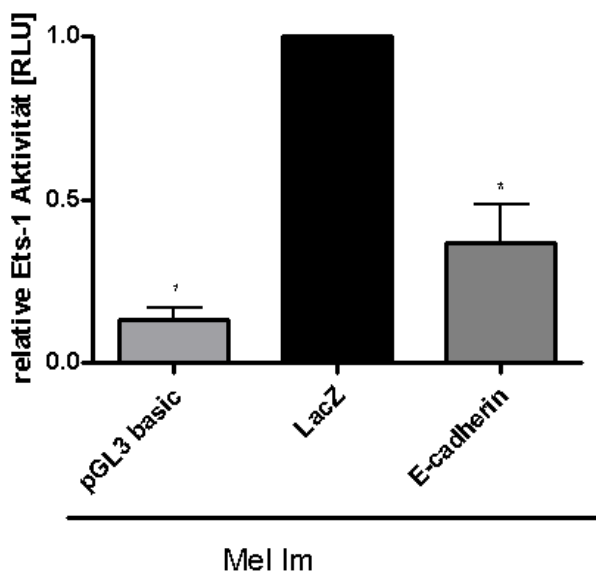


Abbildung 4-36: Luciferase Aktivitätsmessung. Die Ets-1 Aktivität nimmt in der E-cadherin re-exprimierenden Melanomzelllinie Mel Im ab. Der Versuch wurde mit drei Replikaten durchgeführt.

Damit konnten zwei weitere Moleküle identifiziert werden, die an der Regulation von c-Jun beteiligt sind. In der folgenden Abbildung 4-37 wird nun ein Modell vorgestellt, welches die einzelnen Moleküle dieser Signalkaskade in Zusammenhang bringt. Es wird davon ausgegangen, dass im Melanom durch den Verlust von E-cadherin der Transkriptionsfaktor Ets-1 exprimiert und aktiviert wird. Dies führt wiederum zur

Expression der RhoGTPase RhoC. Die Expression von RhoC führt dann zur Stabilisierung von c-Jun und aktiviert dadurch den Transkriptionsfaktor AP-1.

Die Stellung des Zytoskletetts in der Regulation von c-Jun, dessen Umstrukturierung durch den Verlust von E-cadherin ausgelöst wird, bleibt noch ungeklärt. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie es an der Regulation von c-Jun beteiligt sein kann. Zum einen könnte es unabhängig von den anderen Molekülen direkt auf die c-Jun Expression und Aktivität wirken, zum anderen könnte es an verschiedenen Punkten in die Signalkaskade eingreifen. Allerdings muss dies noch in weiteren Experimenten geklärt werden, darum sind die Linien gestrichelt dargestellt (Abbildung 4-37).

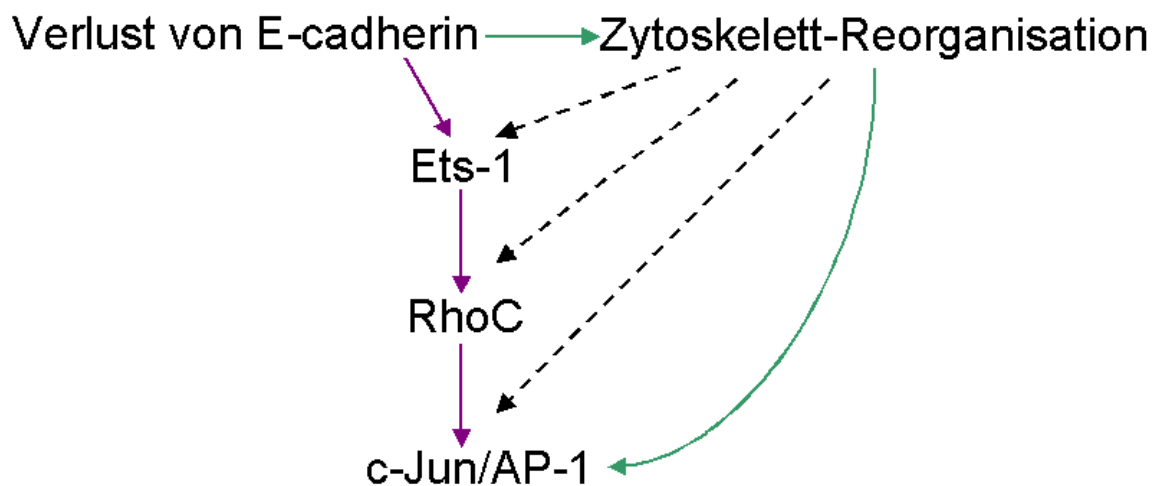


Abbildung 4-37: Modell der c-Jun Regulation im malignen Melanom.

Ausgehend vom Verlust der E-cadherin Expression wird eine Signalkaskade angeschaltet, die dazu führt, dass der Transkriptionsfaktor Ets-1 hochreguliert wird, die RhoC Expression ansteigt, was in einer Induktion der c-Jun Protein Expression und AP-1 Aktivität resultiert (lila Pfeile). Die Zytoskelett-Umstrukturierung, ausgelöst durch den Verlust von E-cadherin, induziert entweder unabhängig vom ersten Signalweg Expression von c-Jun (grüne Pfeile) oder greift an verschiedenen Punkten (gestrichelte Linien) mit in den Signalweg ein.

4.5 Kooperationen

Ein Teil der Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, wurden im Rahmen von Kooperationen bearbeitet. Daher möchte ich nur kurz auf diese Themen eingehen, ohne die Daten im Detail zu präsentieren. Die Publikationen werden in Kapitel 6 aufgelistet.

Ich konnte an einer Publikation mitarbeiten, in der gezeigt wurde, dass das Molekül 5'-Deoxy-5'-(methylthio-) adenosin (MTA), welches von Melanomzellen sekretiert anstatt metabolisiert wird, einen Einfluss auf die Tumorprogression von Melanomzellen hat. Dabei konnte auch ein Zusammenhang zum Transkriptionsfaktor AP-1 hergestellt werden. Wir konnten zeigen, dass die Sekretion von MTA zu einer erhöhten AP-1 Aktivität im Melanomzellen führt und so Beitrag zur Tumorprogression leistet (Stevens et al., 2009).

Desweiteren wurden mit unserer Kooperationspartnerin Dr. Lily Vardimon (Tel Aviv University) erste Daten zu c-Jun und E-cadherin publiziert (Knirsh et al., 2009). Wir konnten hier bereits einen generellen Mechanismus von E-cadherin vermittelnden Zell-Zell-Kontakten und der Regulation von c-Jun zeigen.

Eine weitere Publikation entstand im Rahmen des Melanomverbundes, gefördert von der Deutschen Krebshilfe (Eberle et al., 2010). Die Doktorarbeit ist als ein Teilprojekt in diesem Verbund verankert und ist damit in ein Netzwerk eingebunden, das sich zum Ziel gemacht hat, molekulare Mechanismen des Melanoms aufzuklären, Projekte zu vernetzen und langfristig Therapieoptionen zu entwickeln. In einem zentralen Projekt konnte gezeigt werden, dass die Standardisierung der Zellkulturbedingungen von Melanomzellen nicht zum gewünschten Erfolg führen und machte deutlich, dass unterschiedliche Zellkulturbedingungen in verschiedenen Laboren mitunter zu deutlichen Schwankungen in der Expression von Melanommarkern wie MIA (melanoma inhibitory activity), ITGB3 (Integrin beta 3) oder Muc18 (MCAM, melanoma adhesion molecule) führen.

Für die Daten zum Zusammenspiel von Zytoskelett und der E-cadherin abhängigen Signalkaskade im Melanom, die im Kapitel 4.4 gezeigt wurden, wird gerade ein Manuskript zur Veröffentlichung erarbeitet.

5 Diskussion

5.1 c-Jun im malignen Melanom

Der Transkriptionsfaktor AP-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und –Progression. Seine Effekte auf Proliferation und seine Rolle bei Differenzierung, Apoptose und Migration machen den Transkriptionsfaktor zu einem interessanten Molekül in der Tumorigenese (Hess et al., 2004; Shaulian et al., 2002; Wagner et al., 2005). Diverse Publikationen beschreiben eine konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 in den verschiedensten Tumorentitäten. Nur als zwei Beispiele seien das hepatozelluläre Karzinom (HCC) und das Lungenkarzinom (non-small cell lung cancer; NSCLC) genannt. Im HCC führt eine Inhibition des JNK/c-Jun Signalweges zur Apoptosesensitivierung und Arrest des Zellzyklus (Mucha et al., 2009). Für das NSCLC konnte ebenfalls eine verstärkte AP-1 Aktivität belegt werden (Shimizu et al., 2008). Nach spezifischer Inhibition von c-Jun im AP-1 Komplex von verschiedenen NSCLC Zelllinien wurde das Tumorwachstum im *Xenograft* Nacktmausmodell signifikant reduziert.

Die in unserem Labor generierten Daten beschäftigen sich mit der AP-1 Aktivität im malignen Melanom. Auch in diesem Tumortyp konnten wir eine gesteigerte AP-1 Aktivität nachweisen. Wie im beschriebenen Lungenkarzinom gründet sich die AP-1 Aktivität im Melanom zum größten Teil auf c-Jun. Dass c-Jun einer der wichtigsten Faktoren im AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex im malignen Melanom ist, zeigten aber nicht nur unsere Daten, sondern wurde auch von der Arbeitsgruppe von Ze`ev Ronai in mehreren Publikationen bewiesen (Lopez-Bergami et al., 2007; 2010). Hier konnte gezeigt werden, dass c-Jun durch Aktivierung von ERK und JNK zur Tumorigenese des malignen Melanoms beiträgt (Lopez-Bergami et al., 2007), indem es die Regulation von PDK1 (Phosphoinositide-dependent Kinase 1) beeinflusst (Lopez-Bergami et al., 2010).

c-Jun ist nicht nur als Onkogen definiert, da ihm auch Tumorsuppressoreigenschaften zugewiesen wurden. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass c-Jun in UV-geschädigten Fibroblasten Apoptose induziert. Die Induktion der Apoptose ist dabei vom Tumorsuppressor p53 abhängig (Shaulian et al., 2000). In unseren Melanomzelllinien spielt der Tumorsuppressor p53 allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Deshalb können wir keine tumorsuppressiven Eigenschaften von c-Jun über p53 nachvollziehen.

Außerdem wird in einem weiteren Manuskript spekuliert, dass c-Jun zu einer Hemmung des Wachstums des malignen Melanoms beiträgt und damit eine tumorsuppressive Eigenschaft besitzt (Yang et al., 2004). Diese Daten sind konträr zu unseren Ergebnissen. Wir zeigen, dass in Melanozyten nahezu keine AP-1 Aktivität zu messen ist und in primären Melanomen eine spezifische Induktion der c-Jun Proteinmenge detektierbar war. Die Gegensätze lassen sich dadurch erklären, dass sich in der Studie von Yang die AP-1 Komplexe der Melanomzelllinien eher aus c-Jun/JunD Dimeren zusammensetzen, wie EMSA Ergebnisse zeigten. JunD verhält sich in seiner Funktion, wie auch JunB, antagonistisch zu c-Jun und wirkt hemmend auf die Tumorigenese. Wir gehen hingegen davon aus, dass c-Jun der wichtigste Bestandteil im AP-1 Komplex unserer Zelllinien ist und dadurch förderlich auf die Tumorprogression wirkt. Ferner schließen wir für unsere analysierten Zelllinien aus, dass c-Jun/JunB und c-Jun/JunD Heterodimere vorliegen. Deshalb sehen wir keine Tumorsuppressor-Effekte von c-Jun auf die Melanomentwicklung.

Klassischerweise wird für viele Krebsarten (Prostatakarzinom, Zervixkarzinom, Lungenkrebs, Brustkrebs) beschrieben, dass sich der AP-1 Transkriptionsfaktor vor allem aus c-Fos/c-Jun Heterodimeren zusammensetzt (de Wilde et al., 2008; Fong et al., 2010; Sen et al., 2010). Aber auch in diesem heterodimären Komplex gilt c-Jun als stärkster transkriptioneller Aktivator (Ryseck et al., 1991). Ganz im Einklang mit unseren Daten konnte für das Melanom gezeigt werden, dass vor allem die Expression von c-Jun im Melanom die größte onkogene Relevanz besitzt.

Bei der weiteren Untersuchung der Rolle von c-Jun im Melanom stießen wir auf verschiedene Signalkaskaden, die in der Regulation von c-Jun mündeten. Überraschenderweise zeigten quantitative RT-PCR Analysen der mRNA Expression von c-Jun, dass in den uns zur Verfügung stehenden Melanomzelllinien nur sehr niedrige c-Jun mRNA Mengen nachgewiesen werden konnten. Dies zeigte sich ganz deutlich, nachdem die c-Jun mRNA Mengen in den Melanomzelllinien mit normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) verglichen wurden. In NHEM und in Melanomzelllinien lagen die c-Jun mRNA Mengen auf gleich niedrigem Niveau. Hohe mRNA Mengen in NHEM konnten durch Stimulation mit dem Wachstumsfaktor bFGF erzielt werden. Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass Melanomzelllinien sehr wenig c-Jun mRNA exprimierten (siehe Abbildung 4-1).

Im Gegensatz zu der geringen mRNA Expression von c-Jun konnte eine starke Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse weisen daher eindeutig auf eine posttranskriptionelle Regulation von c-Jun hin. Wir vermuteten, dass das c-Jun Protein durch verschiedene Mechanismen stabilisiert werden könnte und ein Abbau verhindert wird. Durch die Publikation von Polak und Mitarbeiter bekamen wir Hinweise auf eine mögliche posttranskriptionelle Regulation von c-Jun. Die Arbeitsgruppe konnte eine verstärkte c-Jun Protein Expression in HeLa Zellen und Fibroblasten nachweisen. Die Proteinstabilität wird dabei über die 3' und 5' UTR's (untranslatierte Bereiche) vermittelt (Polak et al., 2006). Sie postulierten, dass die Translation des c-Jun Transkripts durch bestimmte Moleküle, die an die 3'/5'UTRs binden, deutlich besser angeschaltet wird. Für unsere Melanomzelllinien kam diese Art der Regulation von c-Jun nicht in Frage. Die untranslatierten Bereiche am 3' und 5' Ende konnten in den Melanomzelllinien für die Regulation der Proteinstabilität in Luciferase Assays jedoch ausgeschlossen werden.

Phosphorylierungsstellen wie Serin63, Serin73, Threonin293 und Serin243, denen eine Rolle für den Erhalt der Proteinstabilität von c-Jun zukommt, wurden desweiteren für die posttranskriptionelle Regulation von c-Jun in Erwägung gezogen (Morton et al., 2003; Laine und Ronai, 2005). Serin243 kann zum einen durch GSK3 phosphoryliert werden und führt dadurch zum proteasomalen Abbau von c-Jun (Wei et al., 2005). Im Gegensatz dazu dephosphoryliert die Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin (PP2B) Serin243 und führt so zur Stabilitätssteigerung von c-Jun (Huang et al., 2008). Im Zuge unserer Untersuchungen konnten wir allerdings für unsere Zellen eine mögliche Rolle der Kinasen GSK3 oder Calcineurin an der posttranskriptionellen Regulation von c-Jun durch Inhibitionsanalysen ausschließen.

Die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) ist die klassische MAPKinase, die c-Jun Serin63 und 73 phosphoryliert und somit die Aktivität von c-Jun induziert (Minden et al, 1994; Weston und Davis, 2002). In unseren Analysen ließ sich aber eine Beteiligung der Kinase JNK an der Regulation von c-Jun nicht bestätigen. Die inhibitorische Blockade der JNK Aktivität in Melanomzelllinien wie Mel Im und Mel Juso hatte keinen Effekt auf das Protein c-Jun. Dies konnte in Western Blot und Luciferase Assays bestätigt werden.

Unsere Ergebnisse zu JNK sind teilweise im Widerspruch zu Studien, die von Lopez-Bergami und Mitarbeitern durchgeführt wurden (Lopez-Bergami et al., 2005; 2007).

Hier konnte für die Melanomzelllinie A375 nachgewiesen werden, dass die konstitutiv aktive MAPKinase ERK zusammen mit der MAPKinase JNK zur Stabilisierung von c-Jun Protein führt („JNK Weg“) (Lopez-Bergami et al., 2007). Auch wir konnten in unserer Studie bestätigen, dass in der Zelllinie A375 der Signalweg über ERK und JNK wichtig für die Stabilität von c-Jun ist. Allerdings konnte dies nicht für die Melanomzelllinien Mel Im und Mel Juso belegt werden. Hier wird offensichtlich ein alternativer Signalweg für die Regulation von c-Jun aktiviert. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Melanomzelllinien unterschiedliche Signalwege angeschaltet haben, um ein bestimmtes Molekül, wie in diesem Fall c-Jun, zu aktivieren.

Kolomeichuk und Mitarbeiter generierten Daten, die im Einklang mit unseren Ergebnissen waren. Sie konnten in ihrer Studie am Zervixkarzinom zeigen, dass c-Jun nicht unbedingt durch JNK aktiviert und stabilisiert werden muss (Kolomeichuk et al., 2008). Allerdings blieb hier die Frage offen, welche alternativen Signalwege zur Aktivierung und Stabilisierung von c-Jun führen. Dies bekräftigt uns in unserer Annahme, dass es neben dem klassischen JNK Weg zur Aktivierung und Stabilisierung von c-Jun andere Wege gibt, die zur Stabilität von c-Jun beitragen.

Überraschenderweise stellten wir im Zuge dieser Untersuchung fest, dass die Melanomzelllinie A375, die hier als positive Kontrolle für den „JNK Weg“ dient, sich deutlich in der E-cadherin Expression zur Zelllinie Mel Im unterschiedet. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass Unterschiede in der E-cadherin Expression in verschiedenen Melanomzelllinien immer wieder beobachtbar waren (Alexaki et al., 2010; Krenkel, 2004). Im folgendem Kapitel gingen wir nun der Frage nach, ob der Verlust der E-cadherin Expression in den Melanomzelllinien Mel Im und Mel Juso einen regulatorischen Einfluss auf die c-Jun Protein Expression haben könnte.

5.2 E-cadherin-abhängige Regulation von c-Jun

Für die Regulation von c-Jun in verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten oder Glioblastomzellen wusste man bis jetzt, dass die Expression von c-Jun durch Modulation der Wachstumsdichte von Zellen verändert werden kann (Assimakopoulou et al., 2001). Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Menge an c-Jun Protein in konfluenten Zellen wesentlich weniger war, als in subkonfluenten Zellen (Pfarr et al., 1994; Lallemand et al., 1997). Es war allerdings

bis jetzt noch unklar, welche molekularen Mechanismen diesem Phänomen zugrunde liegen könnten. Wir stellten zu Beginn der Experimente daher zunächst die Hypothese auf, dass die Zelldichte in direktem Zusammenhang mit Zell-Zelladhäsion steht. Für normale Melanozyten im Gewebeverband interpretierten wir das so, dass, wenn sie in Kontakt zu Keratinozyten wachsen, sie Zellkontakte über E-cadherin ausbilden. Dadurch wird dann auch das Onkogen c-Jun kontrolliert.

Wir konnten nun für Melanozyten zeigen, dass die Unterschiede der c-Jun Expression auf die Ausbildung von aktiven Zell-Zell-Kontakten über E-cadherin zurückzuführen sind, wie Ko-Kultur Experimente zwischen Keratinozyten und Melanozyten zeigten. Zelldichte steht also tatsächlich in direktem Einklang mit E-cadherin abhängiger Zelladhäsion und der Herabregulation von c-Jun.

Erstaunlicherweise zeigen unsere Daten, dass der Verlust von Zell-Zell-Kontakten über E-cadherin mit der Induktion des Onkoproteins c-Jun korreliert ist und so einen Beitrag zur malignen Transformation von Melanozyten leistet. E-cadherin spielt bei der malignen Transformation von Melanozyten eine entscheidende Rolle als Tumorsuppressor (Hirohashi et al., 1998; Berx et al., 2001; Hajra & Fearon 2002). Durch den Verlust von E-cadherin entziehen sich die Melanozyten der strengen Kontrolle der Keratinozyten und beginnen unkontrolliert zu proliferieren (Hsu et al., 1996; 2000; 2002). Gleichzeitig werden Melanom-assoziierte Gene wie MelCAM/MUC18, β 3 Integrine, Melanotransferrin, Proteasen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Hsu et al., 2002) hochreguliert. Daher gehen wir davon aus, dass die Induktion der c-Jun Protein Expression bereits ein wichtiger Schritt für die frühe Entwicklung des malignen Melanoms ist.

Auch für die Progression des Melanoms spielt die Zell-Zelladhäsion eine wichtige Rolle. Dies konnte in Modellsystemen bestätigt werden, in dem es in Melanomzellen experimentell zur Re-Expression von E-cadherin kommt (Herlyn et al., 2000). Es zeigte sich, dass durch Re-expression von E-cadherin die Keratinozyten wieder Kontrolle über die Melanomzellen erlangten. Indem dadurch Invasion und Metastasierung der Tumorzellen gehemmt wurden, konnte der maligne Phänotyp revertiert werden. Wir fokussierten uns in unseren weiteren Studien auf die Zelllinien Mel Im und Mel Juso, in denen wir den klassischen ERK/JNK/c-Jun Signalweg nicht nachweisen konnten. Außerdem wiesen gerade diese Zelllinien einen kompletten E-cadherin Verlust auf, wie Western Blot Ergebnisse zeigten. Die zwei Zelllinien

wurden zum einem mit asSNAIL transfiziert, welches zur Re-Expression von E-cadherin führte und zum anderen wurde durch virale Transduktion E-cadherin Expression erreicht. Nach Re-expression von E-cadherin detektierten wir eine ca. 40 bis 50%ige Abnahme der c-Jun Proteinmengen. Desweiteren wurde in der Melanomzelllinie HMB2 die Expression des Proteins MIA durch Transfektion mit einem antisense MIA Konstrukt unterdrückt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich diese Zellklone durch einen Melanozyten-ähnlichen Phänotyp auszeichnen (Poser et al. 2004; Tatzel et al. 2005). Die MIA defizienten Zellen wiesen, im Vergleich zu den Kontrollen, verstärkte E-cadherin Expression sowie Zell-Zell Kontakte, dendritische Ausläufer und Pigmentierung der Zellen auf. Hier zeigte sich, dass in den Zellklonen, die E-cadherin re-exprimieren und aktive Zell-Zell-Kontakte aufbauten (HMB2-5; HMB2-8), ein nahezu kompletter Verlust der c-Jun Protein Expression zu beobachten war. Darüber hinaus konnte in unseren quantitativen RT-PCR Analysen beobachtet werden, dass Zielgene von c-Jun, wie MMP-9 und MMP-14, die für Prozesse der Invasion von großer Bedeutung sind, durch den Verlust von E-cadherin hochreguliert werden. Auch weitere funktionelle Eigenschaften des Melanoms gehen mit der Expression des Onkoproteins c-Jun einher. So nimmt c-Jun auf das Apoptoseverhalten der Melanomzellen Einfluss. In unseren Studien konnten wir beobachten, dass ein stabiler „Knockdown“ von c-Jun die Melanomzellen in Nekrose trieb. Daher gehen wir davon aus, dass E-cadherin seinen hemmenden Einfluss auf die Progression des Melanoms über das Onkogen c-Jun vermittelt.

Unsere Daten zeigen deutlich, dass E-cadherin nicht nur als „starres“ Adhäsionsmolekül fungiert, sondern auch Signalwege, die einen Beitrag zur Tumorentwicklung leisten, aktivieren kann. Dies ist im Einklang mit der momentanen Literaturlage. So konnten zum Beispiel in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Kuphal et al., 2004, 2006), dass der frühe Verlust der E-cadherin Expression mit der Induktion von N-cadherin einhergeht und so die Invasion von Tumorzellen erleichtert. An der Signalkaskade ist die MAPKinase p38 und der Transkriptionsfaktor NFkB beteiligt. Eine Beteiligung dieser beiden Moleküle an der Regulation von c-Jun konnten wir allerdings in unseren Analysen nicht bestätigen.

Darüber hinaus ist beschrieben, dass durch den Verlust von E-cadherin nicht nur Zell-Zell-Kontakte zerstört werden, sondern dass damit auch immer eine Umstrukturierung des Zytoskeletts verbunden ist. Dies kann sehr wichtig für

Signalweiterleitungen sein. Wir stellten uns deshalb die Frage, ob strukturelle Veränderungen des Zytoskeletts, wie sie nach dem Verlust von E-cadherin im Melanom auftreten, einen Einfluss auf die Regulation von c-Jun haben.

5.3 Posttranskriptionelle Regulation von c-Jun durch das Zytoskelett

Durch die Beobachtung der Morphologie unserer zellulären Modellsysteme (Re-expression von E-cadherin) stellten wir bei unseren anschließenden Analysen fest, dass zytoskelettale Umstrukturierungen der Zellen zu beobachten waren. Besonders F-Aktin Färbungen wiesen darauf hin, das Zytoskelett näher in unsere Untersuchungen mit einzubeziehen. Um natürliche Effekte der Zell-Zelladhäsion im Experiment auf das Zytoskelett zu übertragen modulierten wir die Umstrukturierung des Zytoskeletts mit Nocodazol und Taxol. Die Behandlung von E-cadherin positiven Zellen mit Nocodazol zerstörte die natürliche Struktur des Zytoskeletts und eine deutliche Induktion der c-Jun Expression war interessanterweise zu beobachten. Wir gehen davon aus, dass durch die Behandlung mit Nocodazol E-cadherin abhängige Zell-Zell-Kontakte zerstört wurden, weshalb eine Induktion der c-Jun Expression zustande gekommen ist. In Analogie dazu wurde in einem weiteren Ansatz das Zytoskelett von E-cadherin negativen Melanomzellen kurzfristig durch Behandlung mit Taxol stabilisiert. Eine Reduktion der c-Jun Expression war die Folge. Wir vermuten, dass die Stabilisierung des Zytoskeletts ähnliche Effekte wie aktive Zell-Zell-Kontakte auf die Regulation von c-Jun ausübt. Da das Zytoskelett sehr eng mit dem Adhäsionsmolekül E-cadherin verbunden ist (Gottardi et al., 2001; Tunggal et al., 2005), ist es nicht erstaunlich, dass wir nach Umstrukturierung des Zytoskeletts Effekte auf die Regulation von c-Jun sehen. Aufgrund unserer Datenlage postulieren wir, dass Veränderungen der E-cadherin Expression mit Veränderungen der zytoskelettalen Struktur einhergehen und so eine Regulation von c-Jun ermöglicht wird. In Analogie zu unseren Daten konnte dies bereits für die MAL-SRF (Serum response factor) vermittelte Transkription in epithelialen Magenkarzinomzellen gezeigt werden (Busche et al., 2010). Durch den Verlust von E-cadherin werden keine Adherens Junctions mehr gebildet, welches zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts führt. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor SRF nicht mehr aktiviert.

Das Zytoskelett setzt sich aus Aktinfilamenten und Mikrotubuli zusammen. Ob der Verlust der E-cadherin Expression in den Melanomzellen eher einen Einfluss auf

Aktinfilamente oder Mikrotubuli hat, ist bis jetzt noch ungeklärt. Wir stellten allerdings fest, dass durch die Behandlung mit Nocodazol und Taxol, zwei Substanzen, die die Mikrotubuli beeinflussen, auch Effekte auf das Aktin-Zytoskelett zu sehen sind, wie die F-Aktin Immunfluoreszenz zeigt (siehe Kapitel 4.4.1). Daher gehen wir davon aus, dass im Melanom eine Veränderung von einem Bestandteil des Zytoskeletts auch immer mit der Veränderung des anderen einhergeht. Dieses Phänomen wurde bereits mehrfach beschrieben. So konnte zum Beispiel in Endothelzellen beobachtet werden, dass die Behandlung mit Nocodazol nicht nur die Mikrotubuli beeinflusst, sondern auch die Struktur von Aktinfilamenten gestört wird (Smurova, 1990). Weiterhin konnten Kee und Mitarbeiter zeigen, dass die Behandlung von Nocodazol immer auch mit einer Akkumulierung von Aktinfilamenten einhergeht (Kee et al., 2002).

Nachdem wir nun zuerst einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von E-cadherin im Melanom und der Hochregulation von c-Jun analysiert haben und anschließend außerdem eine E-cadherin abhängige Regulation von c-Jun mit Hilfe des Zytoskeletts gesehen haben, wollten wir zwischengeschaltete Moleküle der Signalkaskade finden.

In der Literatur wird das Zytoskelett immer wieder in Zusammenhang mit der Familie der RhoGTPasen gebracht. Es wird beschrieben, dass RhoGTPasen hauptsächlich in Signalwegen, die zu Umstrukturierung des Zytoskeletts führen, involviert sind (Etienne-Manneville et al., 2002; Jaffe et al., 2005). Die Rho-Proteine sind dabei an der Bildung von Stress-Fasern und Fokal-Adhäsionen beteiligt (Kim et al., 2010). Wie bereits erwähnt, sind auch in Melanomzellen Umstrukturierungen des Zytoskeletts zu beobachten. Wir wollten nun überprüfen, ob RhoGTPasen an der E-cadherin abhängigen Umstrukturierung des Zytoskeletts eine Rolle spielen und so eine Regulation von c-Jun ermöglichen. Interessanterweise stellten wir dabei fest, dass die RhoGTPase RhoC im E-cadherin abhängigen Signalweg wichtig war. Wir konnten zeigen, dass die Expression von E-cadherin in Melanomzellen zu einer Abnahme der Expression von RhoC führt. Dies löste wiederum eine Reduktion der c-Jun Expression aus. Unsere Ergebnisse zur RhoGTPase RhoC sind im Einklang mit der Literaturlage. Für das Melanom ist RhoC als die wichtigste RhoGTPase für Migrations- und Invasionsprozesse beschrieben worden (Hakem et al., 2005; Ruth et al., 2006; Boone et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass in einem RhoC defizientem

Mausmodell die Tumorentwicklung nicht beeinflusst wurde, allerdings konnte die Migration von Tumorzellen und die Bildung von Metastasen drastisch verringert werden (Hakem et al., 2005). Außerdem konnten die Melanomzellen durch Überexpression von RhoC leichter in das Lungengewebe metastasieren (Hakem et al., 2005). Für das Melanom beschreiben wir hier zum ersten mal ganz spezifisch einen Zusammenhang zwischen E-cadherin und der RhoGTPase RhoC. Dass E-cadherin die Aktivität der RhoGTPase RhoA regulieren kann, wurde bereits in mehreren Studien gezeigt. Hier konnte demonstriert werden, dass durch E-cadherin das RhoA spezifische RhoGTPase Activating Protein (GAP) p190RhoGAP mit Hilfe von Src phosphoryliert wird und so die Aktivität von RhoA beeinflusst (Molina-Ortiz et al., 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass E-cadherin die Proliferation und Migration von Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom Zellen (NSCLC) verringert, indem es die Menge an der aktiven Form von RhoGTPasen herunterreguliert (Asnaghi et al., 2010).

Als nächstes sollte aber auch der Zusammenhang zwischen RhoGTPasen und c-Jun hergestellt werden. In Analogie zu unseren Daten konnte für andere Zellsysteme bereits beschrieben werden, dass RhoGTPasen an der Expression von c-Jun beteiligt sind (Marinissen et al., 2004). So konnte gezeigt werden, dass die RhoGTPase RhoA über seinen Effektor ROCK die c-Jun N-terminale Kinase JNK in Fibroblasten aktiviert, was wiederum in der Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun resultiert (Marinissen et al., 2004). Unsere Daten zeigten, dass im Melanom die Regulation von c-Jun ausschließlich über RhoC läuft. Wie bereits erwähnt ist RhoC im Melanom auch die wichtigste GTPase der Rho Familie. RhoA zeigte in unseren Experimenten keine Effekte auf die Regulation von c-Jun.

Da unsere Experimente auf keine Regulation der GTPase Aktivität von RhoC durch E-cadherin hinwiesen, interessierten wir uns für die transkriptionelle Regulation von RhoC. Durch die Literatur gab es Hinweise, dass der Transkriptionsfaktor Ets-1 an der transkriptionellen Regulation von RhoC im Melanom beteiligt sein könnte. Ets-1 ist bereits als einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren im Melanom beschrieben worden (Braig et al., 2010; Hegyesi et al., 2005; Rothhammer et al., 2004). Da wir in computerbasierter Analyse zunächst Bindestellen für Ets-1 im RhoC Promotor fanden, beschäftigten wir uns intensiv mit der Ets-1/RhoC Literatur. Beispielsweise konnte in einer Studie am Kolon Karzinom bereits gezeigt werden, dass Ets-1 die

Expression von RhoC reguliert (Bellovin et al., 2006). Es konnte auch von dieser Arbeitsgruppe Ets-1 Bindestellen im Promotorbereich von RhoC identifiziert werden, die für die Regulation von RhoC bestätigt wurden. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte hier ein Zusammenhang zwischen Ets-1 und RhoC Expression hergestellt werden. Im Speziellen gelang es uns für das Melanom zu zeigen, dass Ets-1 E-cadherin-abhängig die Expression von RhoC reguliert und so Effekte auf die Regulation von c-Jun ausüben kann. Für das Melanom wird dieser Zusammenhang von uns zum ersten Mal beschrieben.

Allerdings ist noch unklar, wie RhoC die Regulation von c-Jun im Detail beeinflussen kann. Dazu stellten wir folgende Hypothese auf: Veränderungen der RhoC Expression aufgrund veränderter Expression von E-cadherin, lösen eine Umstrukturierung des Zytoskeletts aus. Dies führt wiederum zur Aktivierung und Stabilisierung von c-Jun Protein. Allerdings muss für das Melanom diese Hypothese noch bestätigt werden. Die momentane Literaturlage bekräftigt unsere aufgestellte Hypothese. Es wurde bereits beschrieben, dass RhoGTPasen die Zusammensetzung und Organisation des Aktinzytoskeletts in eukaryotischen Zellen regulieren. Dabei kommt ihnen eine große Bedeutung für das Verhalten von Krebszellen bei Migrationsprozessen zu (Hall et al., 2009). Für das Kolon-Karzinom wurde zum Beispiel beschrieben, dass in Abwesenheit von Calcium RhoA über seinen Effektor ROCK zusammen mit der Protein Kinase A (PKA) zur Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts führt und damit einen Beitrag zur epithelialen zu mesenchymalen Transition leistet (Leve et al., 2008). Darüber hinaus ist bekannt, dass Veränderungen in der zytoskelettalen Struktur Auslöser für die Aktivierung von Signalkaskaden in Zellen sein können. So konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Zerstörung des Zytoskeletts in humanen Neuroblastomzellen die nukleäre Translokation des NFkB Transkriptionsfaktors gestört wird. Die NFkB Aktivität nahm daraufhin signifikant ab (Mackenzie et al., 2006). Außerdem konnte für den transkriptionellen Ko-Aktivator MAL eine Regulation seiner nukleären Translokation durch das Zytoskelett gezeigt werden. Der Ko-Aktivator MAL bindet direkt an monomeres Aktin und liegt so im Zytoplasma vor. Wird der Komplex getrennt, transloziert MAL in den Kern (Miralles et al., 2003; Posern et al., 2004). Auch für den Transkriptionsfaktor c-Jun konnte bereits gezeigt werden, dass zytoskelettale Veränderungen durch Zerstörung des intakten Zytoskeletts Auswirkungen auf die Induktion und Aktivität von c-Jun haben. In Glioblastomzellen führt die

Depolymerisation des Zytoskeletts zur Induktion der AP-1 Aktivität. Dabei werden die Kinasen JNK und p38 aktiviert. Diese wiederum induzieren die Expression von c-Jun und aktivieren das Protein (Oren et al., 1999; Assimakopoulou et al., 2000). Für Keratinozyten konnten Knirsh und Mitarbeiter bereits zeigen, dass die Zerstörung des zytoskelettalen Netzwerks mit einem Anstieg in der c-Jun Gesamtproteinmenge einhergeht (Knirsh et al., 2009). Auch für andere Zelltypen wie Fibroblasten oder retinales Gewebe konnte ein Zusammenhang zwischen zytoskelettalen Veränderungen und dem Anstieg der c-Jun Proteinmenge beobachtet werden (Polak et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den Verlust von E-cadherin ein Signalweg angeschaltet wird, an dem der Transkriptionsfaktor Ets-1, die RhoGTPase RhoC und Umstrukturierungen des Zytoskeletts in der Regulation von c-Jun involviert sind. In der nachfolgenden Abbildung ist der neue Signalweg nochmals dargestellt.

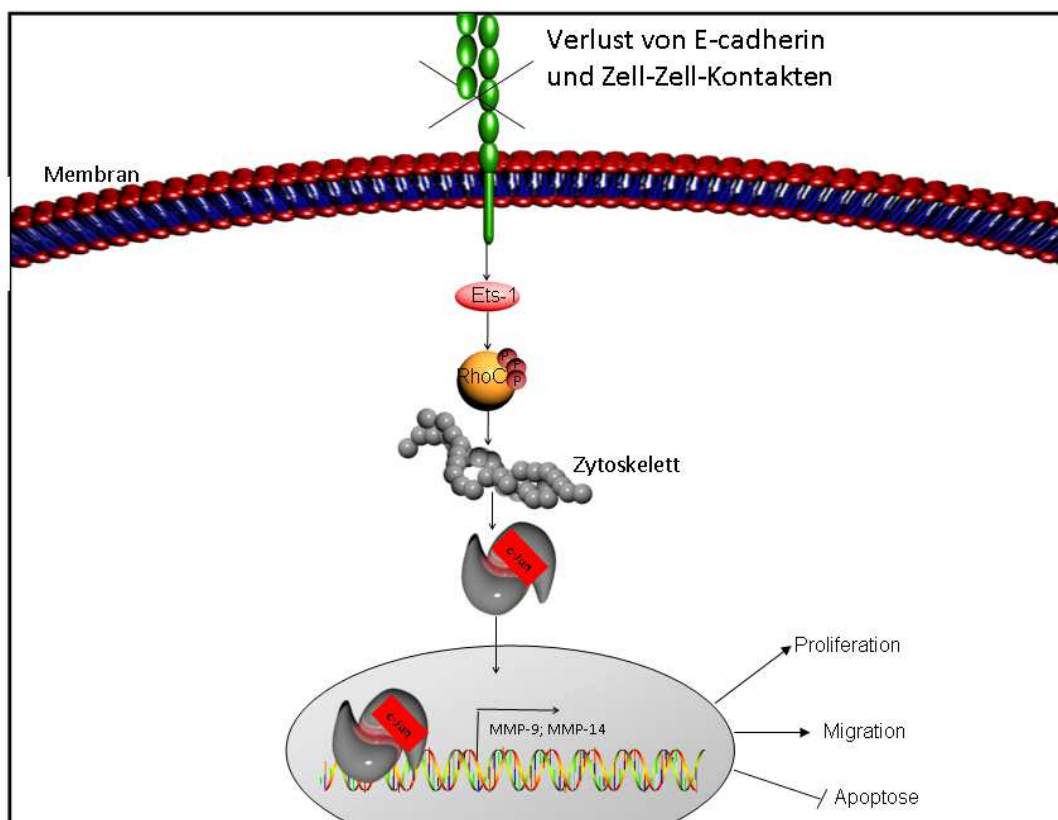


Abbildung 5-1: Darstellung des schematischen Signalweges, der im Melanom zur posttranslationalen Stabilität von c-Jun führt.

Die Aufklärung dieser Signalkaskade ist von größter Bedeutung für neue Optionen in der Therapie des malignen Melanoms. So kann zum Beispiel durch gezieltes Ausschalten einzelner Moleküle die Stabilisierung von c-Jun unterbunden werden, welches zu einer Umkehrung des aggressiven Phänotyps führen könnte um so die Heilungschancen betroffener Patienten deutlich erhöhen zu können.

6 Eigene Publikationen

Spangler B, Vardimon L, Bosserhoff AK, Kuphal S: Posttranscriptional regulation controlled by E-cadherin is important for c-Jun activity in malignant melanoma. *PCMR*, accepted.

Eberle J, Spangler B, Becker JC, Heinemann SH, Klein CA, Kunz M, Kuphal S, Langer P, Mauch C, Meierjohann S, Paschen A, Schadendorf D, Scharl M, Schittek B, Schönherr R, Tüting T, Zigrino P, Bosserhoff AK; German Melanoma Research Network of the German Cancer Aid: Multicentre study on standardisation of melanoma cell culture – an initiative of the German Melanoma Research Network.

Pigment Cell Melanoma Res. **(2010)** Apr;23(2):296-8

Knirsh R, Ben-Dror I, Spangler B, Matthews GD, Kuphal S, Bosserhoff AK, Vardimon L: Loss of E-cadherin mediated cell-cell-contacts activates a novel mechanism for upregulation of the proto-oncogene c-Jun.

Mol Biol Cell. **(2009)**, 20:2121-9.

Stevens AP, Spangler B, Wallner S, Kreutz M, Dettmer K, Oefner PJ, Bosserhoff AK: Direct and tumor environment mediated influences of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine on tumor progression of malignant melanoma.

J Cell Biochem. **(2009)**, 106:210-9.

7 Literaturverzeichnis

- Adler, V., Fuchs, S. Y., Kim, J., Kraft, A., King, M. P., Pelling, J., & Ronai, Z. (1995). jun-NH2-terminal kinase activation mediated by UV-induced DNA lesions in melanoma. *Cell Growth Differ*, 6(11), 1437–1446.
- Alexaki, V. I., Javelaud, D., Van, K. L. C., Mohammad, K. S., Dennler, S., Luciani, F., (2010). GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(15), 1148–1159. doi:10.1093/jnci/djq257.
- Amiri, K. I., & Richmond, A. (2005). Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev*, 24(2), 301–313. doi:10.1007/s10555-005-1579-7.
- Asnaghi, L., Vass, W. C., Quadri, R., Day, P. M., Qian, X., Braverman, R., (2010). E-cadherin negatively regulates neoplastic growth in non-small cell lung cancer: role of Rho GTPases. *Oncogene*, 29(19), 2760–2771. doi:10.1038/onc.2010.39.
- Assimakopoulou, M., & Varakis, J. (2001). AP-1 and heat shock protein 27 expression in human astrocytomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127(12), 727–732.
- Baeuerle, P. A., & Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 12, 141–179. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001041.
- Bar-Sagi, D., & Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*, 103(2), 227–238.
- Behrens, J. (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer metastasis reviews*, 18(1), 15–30.
- Bellovin, D. I., Simpson, K. J., Danilov, T., Maynard, E., Rimm, D. L., Oettgen, P., & Mercurio, A. M. (2006). Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene*, 25(52), 6959–6967. doi:10.1038/sj.onc.1209682.
- Bernstein, L. R., & Colburn, N. H. (1989). AP1/jun function is differentially induced in promotion-sensitive and resistant. *Science*, 244(4904), 566–569.
- Berx, G., & van, R. F. (2001). The E-cadherin/catenin complex: an important gate-keeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast cancer research : BCR*, 3(5), 289–293.
- Birchmeier, W., & Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et biophysica acta*, 1198(1), 11–26.
- Boone, B., Van, G. M., Lambert, J., Haspeslagh, M., & Brochez, L. (2009). The role of RhoC in growth and metastatic capacity of melanoma. *Journal of cutaneous pathology*, 36(6), 629–636. doi:10.1111/j.1600-0560.2008.01117.x.

- Bosserhoff, A. K., Echtenacher, B., Hein, R., & Buettner, R. (2001). Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma research*, 11(4), 417–421.
- Braig, S., Mueller, D. W., Rothhammer, T., & Bosserhoff, A. K. (2010). MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(20), 3535–3548. doi:10.1007/s00018-010-0394-7.
- Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery*, 172(5), 902–908.
- Brown, P. H., Alani, R., Preis, L. H., Szabo, E., & Birrer, M. J. (1993). Suppression of oncogene-induced transformation by a deletion mutant of c-jun. *Oncogene*, 8(4), 877–886.
- Brown, P. H., Chen, T. K., & Birrer, M. J. (1994). Mechanism of action of a dominant-negative mutant of c-Jun. *Oncogene*, 9(3), 791–799.
- Busche, S., Kremmer, E., & Posern, G. (2010). E-cadherin regulates MAL-SRF-mediated transcription in epithelial cells. *Journal of cell science*, 123(Pt 16), 2803–2809. doi:10.1242/jcs.061887.
- Campbell, P. M., Groehler, A. L., Lee, K. M., Ouellette, M. M., Khazak, V., & Der, C. J. (2007). K-Ras promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by Raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cancer Res*, 67(5), 2098–2106. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3752.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del, B. M. G., (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2(2), 76–83. doi:10.1038/35000025.
- Carr, J., & Mackie, R. M. (1994). Point mutations in the N-ras oncogene in malignant melanoma and congenital naevi. *The British journal of dermatology*, 131(1), 72–77.
- Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La, R. S. A., Galibert, M. D., Denat, L., ... (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle. *Nature*, 433(7027), 764–769. doi:10.1038/nature03269.
- Chinenov, Y., & Kerppola, T. K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription. *Oncogene*, 20(19), 2438–2452. doi:10.1038/sj.onc.1204385.
- Choi, B. Y., Choi, H. S., Ko, K., Cho, Y. Y., Zhu, F., Kang, B. S., (2005). The tumor suppressor p16(INK4a) prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nat Struct Mol Biol*, 12(8), 699–707. doi:10.1038/nsmb960.
- Chu, Y. S., Thomas, W. A., Eder, O., Pincet, F., Perez, E., Thiery, J. P., & Dufour, S. (2004). Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *The Journal of cell biology*, 167(6), 1183–1194. doi:10.1083/jcb.200403043.

- Clark, W. H. (1991). Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer*, 64(4), 631–644.
- Clark, W. H., JR, Elder, D. E., Guerry, D., 4th., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van, H. M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and. *Hum Pathol*, 15(12), 1147–1165.
- Clark, W. H., JR, From, L., Bernardino, E. A., & Mihm, M. C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer research*, 29(3), 705–727.
- Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*, 81(7), 1137–1146.
- Cruz, J., Reis-Filho, J. S., Silva, P., & Lopes, J. M. (2003). Expression of c-met tyrosine kinase receptor is biologically and prognostically. *Oncology*, 65(1), 72–82. doi:10.1159/000071207.
- Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England journal of medicine*, 353(20), 2135–2147. doi:10.1056/NEJMoa050092.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S.,(2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949–954. doi:10.1038/nature00766.
- de, V. E., Bray, F. I., Coebergh, J. W., & Parkin, D. M. (2003). Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising. *Int J Cancer*, 107(1), 119–126. doi:10.1002/ijc.11360.
- de, V. E., Bray, F. I., Coebergh, J. W., & Parkin, D. M. (2003). Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *International journal of cancer*, 107(1), 119–126. doi:10.1002/ijc.11360.
- de, V. E., Schouten, L. J., Visser, O., Eggermont, A. M., & Coebergh, J. W. (2003). Rising trends in the incidence of and mortality from cutaneous melanoma in the. *Eur J Cancer*, 39(10), 1439–1446.
- de, V. E., Schouten, L. J., Visser, O., Eggermont, A. M., & Coebergh, J. W. (2003). Rising trends in the incidence of and mortality from cutaneous melanoma in the Netherlands: a Northwest to Southeast gradient? *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 39(10), 1439–1446.
- de, W. J., De-Castro, A. J., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Rosl, F., & Steenbergen, R. D. (2008). Alterations in AP-1 and AP-1 regulatory genes during HPV-induced carcinogenesis. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology*, 30(1), 77–87.
- Debruyne, P. R., Bruyneel, E. A., Li, X., Zimber, A., Gespach, C., & Mareel, M. M. (2001). The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutat Res*, 480-481, 359–369.

- Diffey, B. L. (2003). A quantitative estimate of melanoma mortality from ultraviolet A sunbed use in. *Br J Dermatol*, *149*(3), 578–581.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, *123*(5), 903–915. doi:10.1016/j.cell.2005.09.021.
- Du, J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W. E., (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific. *Cancer Cell*, *6*(6), 565–576. doi:10.1016/j.ccr.2004.10.014.
- Eberle, J., Spangler, B., Becker, J. C., Heinemann, S. H., Klein, C. A., Kunz, M., (2010). Multicentre study on standardisation of melanoma cell culture--an initiative of the German Melanoma Research Network. *Pigment cell & melanoma research*, *23*(2), 296–298. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00684.x.
- Eferl, R., & Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, *3*(11), 859–868. doi:10.1038/nrc1209.
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, *420*(6916), 629–635. doi:10.1038/nature01148.
- Eychene, A., Rocques, N., & Pouponnot, C. (2008). A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer*. doi:10.1038/nrc2460.
- Faraone, D., Aguzzi, M. S., Toietta, G., Facchiano, A. M., Facchiano, F., Magenta, A., (2009). Platelet-derived growth factor-receptor alpha strongly inhibits melanoma growth. *Neoplasia*, *11*(8), 732–742.
- Fecher, L. A., Amaravadi, R. K., & Flaherty, K. T. (2008). The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol*, *20*(2), 183–189. doi:10.1097/CCO.0b013e3282f5271c.
- Florez, A., & Cruces, M. (2004). Melanoma epidemic: true or false? *Int J Dermatol*, *43*(6), 405–407. doi:10.1111/j.1365-4632.2004.02004.x.
- Folkman, J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, *3*(7), 643–651.
- Fong, Y., Shen, K. H., Chiang, T. A., & Shih, Y. W. (2010). Acacetin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expressions of human lung cancer cells through inactivating JNK signaling pathway and reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1. *Journal of food science*, *75*(1), H30-8. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01438.x.
- Fong, Y., Shen, K. H., Chiang, T. A., & Shih, Y. W. (2010). Acacetin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expressions of human lung cancer of NF-kappaB and AP-1. *J Food Sci*, *75*(1), H30-8. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01438.x.
- Fuchs, S. Y., Dolan, L., Davis, R. J., & Ronai, Z. (1996). Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene*, *13*(7), 1531–1535.
- Fuse, N., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Yoshizawa, M., Usono, T., (1999). Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *J Biochem*, *126*(6), 1043–1051.

- Garbe, C., & Blum, A. (2001). Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14(5), 280–290.
- Garbe, C., Terheyden, P., Keilholz, U., Kolbl, O., & Hauschild, A. (2008). Treatment of melanoma. *Dtsch Arztebl Int*, 105(49), 845–851. doi:10.3238/arztebl.2008.0845.
- Goding, C. R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the. *Genes Dev*, 14(14), 1712–1728.
- Goodall, J., Martinozzi, S., Dexter, T. J., Champeval, D., Carreira, S., Larue, L., & Goding, C. R. (2004). Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by beta-catenin. *Mol Cell Biol*, 24(7), 2915–2922.
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(1), a002576. doi:10.1101/cshperspect.a002576.
- Grau, R., Punzon, C., Fresno, M., & Iniguez, M. A. (2006). Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. *Biochem J*, 395(1), 81–88. doi:10.1042/BJ20050964.
- Guba, M., Bosserhoff, A. K., Steinbauer, M., Abels, C., Anthuber, M., Buettner, R., & Jauch, K. W. (2000). Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *British journal of cancer*, 83(9), 1216–1222. doi:10.1054/bjoc.2000.1424.
- Gumbiner, B. M. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *The Journal of cell biology*, 148(3), 399–404.
- Haass, N. K., Smalley, K. S., & Herlyn, M. (2004). The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol*, 35(3), 309–318.
- Hajra, K. M., & Fearon, E. R. (2002). Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 34(3), 255–268. doi:10.1002/gcc.10083.
- Hakem, A., Sanchez-Sweetman, O., You-Ten, A., Duncan, G., Wakeham, A., Khokha, R., & Mak, T. W. (2005). RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes & development*, 19(17), 1974–1979. doi:10.1101/gad.1310805.
- Halaban, R., Kwon, B. S., Ghosh, S., Delli, B. P., & Baird, A. (1988). bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res*, 3(2), 177–186.
- Hall, A. (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer metastasis reviews*, 28(1-2), 5–14. doi:10.1007/s10555-008-9166-3.
- Hall, J. P., & Davis, R. J. (2002). Analysis of c-Jun N-terminal kinase regulation and function. *Methods Enzymol*, 345, 413–425.
- Handsuh, G., Candidus, S., Lubber, B., Reich, U., Schott, C., Oswald, S., ... (1999). Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene*, 18(30), 4301–4312. doi:10.1038/sj.onc.1202790.
- Hegyesi, H., Horvath, B., Pallinger, E., Pos, Z., Molnar, V., & Falus, A. (2005). Histamine elevates the expression of Ets-1, a protooncogene in human melanoma cell

- lines through H2 receptor. *FEBS letters*, 579(11), 2475–2479. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.053.
- Herlyn, M., Berking, C., Li, G., & Satyamoorthy, K. (2000). Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma research*, 10(4), 303–312.
- Hess, J., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 117(Pt 25), 5965–5973. doi:10.1242/jcs.01589.
- Hill, C. S., Wynne, J., & Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 81(7), 1159–1170.
- Hirohashi, S. (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *The American journal of pathology*, 153(2), 333–339.
- Hoek, K. S., Schlegel, N. C., Eichhoff, O. M., Widmer, D. S., Praetorius, C., Einarsson, S. O., (2008). Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21(6), 665–676. doi:10.1111/j.1755-148X.2008.00505.x.
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., & Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347(6288), 44–49. doi:10.1038/347044a0.
- Hsu, M., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J. L., & Herlyn, M. (2000). Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication. *J Cell Sci*, 113 (Pt 9), 1535–1542.
- Hsu, M., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J. L., & Herlyn, M. (2000). Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *Journal of cell science*, 113 (Pt 9), 1535–1542.
- Hsu, M. Y., Meier, F., & Herlyn, M. (2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation*, 70(9-10), 522–536. doi:10.1046/j.1432-0436.2002.700906.x.
- Hsu, M. Y., Meier, F. E., Nesbit, M., Hsu, J. Y., Van, B. P., Elder, D. E., & Herlyn, M. (2000). E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *The American journal of pathology*, 156(5), 1515–1525.
- Hsu, M. Y., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., & Herlyn, M. (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *The journal of investigative dermatology*, 1(2), 188–194.
- Huang, C. C., Wang, J. M., Kikkawa, U., Mukai, H., Shen, M. R., Morita, I., ... (2008). Calcineurin-mediated dephosphorylation of c-Jun Ser-243 is required for c-Jun. *Oncogene*, 27(17), 2422–2429. doi:10.1038/sj.onc.1210888.
- Huang, C. C., Wang, J. M., Kikkawa, U., Mukai, H., Shen, M. R., Morita, I., ... (2008). Calcineurin-mediated dephosphorylation of c-Jun Ser-243 is required for c-Jun protein stability and cell transformation. *Oncogene*, 27(17), 2422–2429. doi:10.1038/sj.onc.1210888.

- Hulsken, J., Birchmeier, W., & Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *The Journal of cell biology*, 127(6 Pt 2), 2061–2069.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 11–25.
- Ivanov, A. I., McCall, I. C., Babbin, B., Samarin, S. N., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2006). Microtubules regulate disassembly of epithelial apical junctions. *BMC cell biology*, 7, 12. doi:10.1186/1471-2121-7-12.
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 247–269. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
- Jimbow, K., Quevedo, W. C., JR, Fitzpatrick, T. B., & Szabo, G. (1976). Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *The Journal of investigative dermatology*, 67(1), 72–89.
- Jochum, W., Passegue, E., & Wagner, E. F. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, 20(19), 2401–2412. doi:10.1038/sj.onc.1204389.
- Johnson, J. P. (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer metastasis reviews*, 18(3), 345–357.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry*, 270(28), 16483–16486.
- Karin, M., Takahashi, T., Kapahi, P., Delhase, M., Chen, Y., Makris, C., (2001). Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. *Biofactors*, 15(2-4), 87–89.
- Kee, S. H., Jang, S. I., Ahvazi, B., Larsen, M., Yamada, K. M., & Steinert, P. M. (2002). Cell-cell adhesion and RhoA-mediated actin polymerization are independent phenomena in microtubule disrupted keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 119(2), 440–448. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.01826.x.
- Keefe, M., & Mackie, R. M. (1991). The relationship between risk of death from clinical stage 1 cutaneous melanoma and thickness of primary tumour: no evidence for steps in risk. Scottish Melanoma Group. *British journal of cancer*, 64(3), 598–602.
- Kim, T. Y., Vigil, D., Der, C. J., & Juliano, R. L. (2009). Role of DLC-1, a tumor suppressor protein with RhoGAP activity, in regulation of the cytoskeleton and cell motility. *Cancer metastasis reviews*, 28(1-2), 77–83. doi:10.1007/s10555-008-9167-2.
- Kissin, M. W., Simpson, D. A., Easton, D., White, H., & Westbury, G. (1987). Prognostic factors related to survival and groin recurrence following therapeutic. *Br J Surg*, 74(11), 1023–1026.
- Knirsh, R., Ben-Dror, I., Spangler, B., Matthews, G. D., Kuphal, S., Bosserhoff, A. K., & Vardimon, L. (2009). Loss of E-cadherin-mediated cell-cell contacts activates a novel mechanism for up-regulation of the proto-oncogene c-Jun. *Mol Biol Cell*, 20(7), 2121–2129. doi:10.1091/mbc.E08-12-1196.

- Kolomeichuk, S. N., Terrano, D. T., Lyle, C. S., Sabapathy, K., & Chambers, T. C. (2008). Distinct signaling pathways of microtubule inhibitors--vinblastine and Taxol induce JNK-dependent cell death but through AP-1-dependent and AP-1-independent mechanisms, respectively. *The FEBS journal*, *275*(8), 1889–1899. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06349.x.
- Konstantinopoulos, P. A., VANDOROS, G. P., Karamouzis, M. V., Gkermepesi, M., Sotiropoulou-Bonikou, G., & Papavassiliou, A. G. (2007). EGF-R is expressed and AP-1 and NF-kappaB are activated in stromal myofibroblasts surrounding colon adenocarcinomas paralleling expression of COX-2 and VEGF. *Cell Oncol*, *29*(6), 477–482.
- Kovacs, E. M., & Yap, A. S. (2002). The web and the rock: cell adhesion and the ARP2/3 complex. *Developmental cell*, *3*(6), 760–761.
- Kowalczyk, A. P., Bornslaeger, E. A., Norvell, S. M., Palka, H. L., & Green, K. J. (1999). Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *International review of cytology*, *185*, 237–302.
- Krengel, S., Groteluschen, F., Bartsch, S., & Tronnier, M. (2004). Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the. *J Cutan Pathol*, *31*(1), 1–7.
- Kumar, S. M., Yu, H., Edwards, R., Chen, L., Kazianis, S., Brafford, P., (2007). Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in. *Cancer Res*, *67*(7), 3177–3184. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3312.
- Kuphal, S., & Bosserhoff, A. K. (2006). Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin. *Oncogene*, *25*(2), 248–259. doi:10.1038/sj.onc.1209054.
- Kuphal, S., Palm, H. G., Poser, I., & Bosserhoff, A. K. (2005). Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res*, *15*(4), 305–313.
- Kuphal, S., Poser, I., Jobin, C., Hellerbrand, C., & Bosserhoff, A. K. (2004). Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene*, *23*(52), 8509–8519. doi:10.1038/sj.onc.1207831.
- Laine, A., & Ronai, Z. (2005). Ubiquitin chains in the ladder of MAPK signaling. *Sci STKE*, *2005*(281), re5. doi:10.1126/stke.2812005re5.
- Lallemand, D., Ham, J., Garbay, S., Bakiri, L., Traincard, F., Jeannequin, O., (1998). Stress-activated protein kinases are negatively regulated by cell density. *The EMBO journal*, *17*(19), 5615–5626. doi:10.1093/emboj/17.19.5615.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., & Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(17), 8263–8267.
- Lehmann, J. M., Riethmuller, G., & Johnson, J. P. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(24), 9891–9895.

- Leve, F., de, S. W., & Morgado-Diaz, J. A. (2008). A cross-link between protein kinase A and Rho-family GTPases signaling mediates cell-cell adhesion and actin cytoskeleton organization in epithelial cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *327*(3), 777–788. doi:10.1124/jpet.108.140798.
- Li, G., & Herlyn, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Molecular medicine today*, *6*(4), 163–169.
- Li, G., Schaidler, H., Satyamoorthy, K., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., & Herlyn, M. (2001). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene*, *20*(56), 8125–8135. doi:10.1038/sj.onc.1205034.
- Loercher, A. E., Tank, E. M., Delston, R. B., & Harbour, J. W. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by. *J Cell Biol*, *168*(1), 35–40. doi:10.1083/jcb.200410115.
- Lopez-Bergami, P., Habelhah, H., Bhoumik, A., Zhang, W., Wang, L. H., & Ronai, Z. (2005). RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]. *Mol Cell*, *19*(3), 309–320. doi:10.1016/j.molcel.2005.06.025.
- Lopez-Bergami, P., Huang, C., Goydos, J. S., Yip, D., Bar-Eli, M., Herlyn, M., (2007). Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell*, *11*(5), 447–460. doi:10.1016/j.ccr.2007.03.009.
- Lopez-Bergami, P., Kim, H., Dewing, A., Goydos, J., Aaronson, S., & Ronai, Z. (2010). c-Jun regulates phosphoinositide-dependent kinase 1 transcription: implication for Akt and protein kinase C activities and melanoma tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*, *285*(2), 903–913. doi:10.1074/jbc.M109.075630.
- Mackenzie, G. G., Keen, C. L., & Oteiza, P. I. (2006). Microtubules are required for NF-kappaB nuclear translocation in neuroblastoma IMR-32 cells: modulation by zinc. *Journal of neurochemistry*, *99*(2), 402–415. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04005.x.
- Mackie, R. M. (2000). Malignant melanoma: clinical variants and prognostic indicators. *Clinical and experimental dermatology*, *25*(6), 471–475.
- Maeno, K., Masuda, A., Yanagisawa, K., Konishi, H., Osada, H., Saito, T., (2006). Altered regulation of c-jun and its involvement in anchorage-independent growth. *Oncogene*, *25*(2), 271–277. doi:10.1038/sj.onc.1209018.
- Malliri, A., & Collard, J. G. (2003). Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Current opinion in cell biology*, *15*(5), 583–589.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology*, *155*(3), 739–752.
- Mariani, O., Brennetot, C., Coindre, J. M., Gruel, N., Ganem, C., Delattre, O., (2007). JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in. *Cancer Cell*, *11*(4), 361–374. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.007.

- Marinissen, M. J., Chiariello, M., Tanos, T., Bernard, O., Narumiya, S., & Gutkind, J. S. (2004). The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Molecular cell*, *14*(1), 29–41.
- Marrs, J. A., & Nelson, W. J. (1996). Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. *International review of cytology*, *165*, 159–205.
- McGill, G. G., Horstmann, M., Widlund, H. R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E. K., ... (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage. *Cell*, *109*(6), 707–718.
- Meier, F., Nesbit, M., Hsu, M. Y., Martin, B., Van, B. P., Elder, D. E., (2000). Human melanoma progression in skin reconstructs: Biological significance of bFGF. *The American journal of pathology*, *156*(1), 193–200.
- Meier, F., Schittek, B., Busch, S., Garbe, C., Smalley, K., Satyamoorthy, K., (2005). The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, *10*, 2986–3001.
- Miller, A. J., & Mihm, M. C., JR (2006). Melanoma. *N Engl J Med*, *355*(1), 51–65. doi:10.1056/NEJMra052166.
- Minden, A., & Karin, M. (1997). Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta*, *1333*(2), F85-104.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I., & Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, *113*(3), 329–342.
- Molina-Ortiz, I., Bartolome, R. A., Hernandez-Varas, P., Colo, G. P., & Teixido, J. (2009). Overexpression of E-cadherin on melanoma cells inhibits chemokine-promoted invasion involving p190RhoGAP/p120ctn-dependent inactivation of RhoA. *The Journal of biological chemistry*, *284*(22), 15147–15157. doi:10.1074/jbc.M807834200.
- Morita, K., Tsukita, S., & Miyachi, Y. (2004). Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *The British journal of dermatology*, *151*(2), 328–334. doi:10.1111/j.1365-2133.2004.06029.x.
- Morton, S., Davis, R. J., McLaren, A., & Cohen, P. (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J*, *22*(15), 3876–3886. doi:10.1093/emboj/cdg388.
- Mucha, S. R., Rizzani, A., Gerbes, A. L., Camaj, P., Thasler, W. E., Bruns, C. J., ... (2009). JNK inhibition sensitises hepatocellular carcinoma cells but not normal hepatocytes to the TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Gut*, *58*(5), 688–698. doi:10.1136/gut.2008.154625.
- Nagafuchi, A., & Takeichi, M. (1988). Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *The EMBO journal*, *7*(12), 3679–3684.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., & Rini, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, *380*(6572), 360–364. doi:10.1038/380360a0.

- Näher H., E. A. (2006). *Malignes Melanom: Standards und Innovationen in Diagnostik und Therapie: Prognostische Faktoren beim malignen Melanom.* (Hengge U.R., D. R., Ed.): Deutscher Ärzte-Verlag.
- Narumiya, S. (1996). The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *Journal of biochemistry*, 120(2), 215–228.
- Niessen, C. M., & Gottardi, C. J. (2008). Molecular components of the adherens junction. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(3), 562–571. doi:10.1016/j.bbamem.2007.12.015.
- Nollet, F., Kools, P., & van, R. F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of molecular biology*, 299(3), 551–572. doi:10.1006/jmbi.2000.3777.
- Nose, A., Nagafuchi, A., & Takeichi, M. (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell*, 54(7), 993–1001.
- Oikawa, M., Abe, M., Kurosawa, H., Hida, W., Shirato, K., & Sato, Y. (2001). Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(1), 39–43. doi:10.1006/bbrc.2001.5927.
- Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M. T., Hodgkinson, C. A., Pavan, W. J., & Arnheiter, H. (1997). Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development*, 124(12), 2377–2386.
- Oren, A., Herschkovitz, A., Ben-Dror, I., Holdengreber, V., Ben-Shaul, Y., Seger, R., & Vardimon, L. (1999). The cytoskeletal network controls c-Jun expression and glucocorticoid receptor transcriptional activity in an antagonistic and cell-type-specific manner. *Molecular and cellular biology*, 19(3), 1742–1750.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853–6866. doi:10.1038/sj.onc.1203239.
- Palmieri, G., Capone, M., Ascierto, M. L., Gentilcore, G., Stroncek, D. F., Casula, M., ... (2009). Main roads to melanoma. *J Transl Med*, 7, 86. doi:10.1186/1479-5876-7-86.
- Panka, D. J., Atkins, M. B., & Mier, J. W. (2006). Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of. *Clin Cancer Res*, 12(7 Pt 2), 2371s-2375s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2539.
- Peinado, H., Portillo, F., & Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International journal of developmental biology*, 48(5-6), 365–375. doi:10.1387/ijdb.041794hp.
- Pfarr, C. M., Mehta, F., Spyrou, G., Lallemand, D., Carillo, S., & Yaniv, M. (1994). Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell*, 76(4), 747–760.
- Polak, P., Oren, A., Ben-Dror, I., Steinberg, D., Sapoznik, S., Arditi-Duvdevany, A., & Vardimon, L. (2006). The cytoskeletal network controls c-Jun translation in a UTR-dependent manner. *Oncogene*, 25(5), 665–676. doi:10.1038/sj.onc.1209114.

- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14(15), 1837–1851.
- Pollard, T. D. (2004). Formins coming into focus. *Developmental cell*, 6(3), 312–314.
- Poser, I., & Bosserhoff, A. K. (2004). Transcription factors involved in development and progression of malignant. *Histol Histopathol*, 19(1), 173–188.
- Poser, I., Dominguez, D., de, H. A. G., Varnai, A., Buettner, R., & Bosserhoff, A. K. (2001). Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the. *J Biol Chem*, 276(27), 24661–24666. doi:10.1074/jbc.M011224200.
- Poser, I., Dominguez, D., de, H. A. G., Varnai, A., Buettner, R., & Bosserhoff, A. K. (2001). Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *The Journal of biological chemistry*, 276(27), 24661–24666. doi:10.1074/jbc.M011224200.
- Posern, G., Miralles, F., Guettler, S., & Treisman, R. (2004). Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *The EMBO journal*, 23(20), 3973–3983. doi:10.1038/sj.emboj.7600404.
- Recio, J. A., & Merlino, G. (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK, ATF-2 and cyclin D1. *Oncogene*, 21(7), 1000–1008. doi:10.1038/sj.onc.1205150.
- Reisfeld, S., & Vardimon, L. (1994). Cell to cell contacts control the transcription activity of the glucocorticoid receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*, 8(9), 1224–1233.
- Reynolds, A. B. (2007). p120-catenin: Past and present. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(1), 2–7. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.09.019.
- Rothhammer, T., Hahne, J. C., Florin, A., Poser, I., Soncin, F., Wernert, N., & Bosserhoff, A. K. (2004). The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of. *Cell Mol Life Sci*, 61(1), 118–128. doi:10.1007/s00018-003-3337-8.
- Ruth, M. C., Xu, Y., Maxwell, I. H., Ahn, N. G., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2006). RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. *The Journal of investigative dermatology*, 126(4), 862–868. doi:10.1038/sj.jid.5700211.
- Rutter, J. L., Mitchell, T. I., Buttice, G., Meyers, J., Gusella, J. F., Ozelius, L. J., & Brinckerhoff, C. E. (1998). A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter. *Cancer Res*, 58(23), 5321–5325.
- Ryseck, R. P., & Bravo, R. (1991). c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE. *Oncogene*, 6(4), 533–542.
- Sahai, E., & Marshall, C. J. (2002). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nature cell biology*, 4(6), 408–415. doi:10.1038/ncb796.
- Sanders, D. S., Blessing, K., Hassan, G. A., Bruton, R., Marsden, J. R., & Jankowski, J. (1999). Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Molecular pathology : MP*, 52(3), 151–157.

- Sato, Y., Kashimoto, S., MacDonald, J. R., & Nakano, K. (2001). In vivo antitumour efficacy of MGI-114 (6-hydroxymethylacylfulvene, HMAF) in. *Eur J Cancer*, 37(11), 1419–1428.
- Sen, T., Dutta, A., & Chatterjee, A. (2010). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) down-regulates gelatinase-B (MMP-9) by involvement of FAK/ERK/NFkappaB and AP-1 in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anti-cancer drugs*, 21(6), 632–644.
- Shaulian, E., & Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20(19), 2390–2400. doi:10.1038/sj.onc.1204383.
- Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4(5), E131-6. doi:10.1038/ncb0502-e131.
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F., & Karin, M. (2000). The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*, 103(6), 897–907.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., ... (1995). Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *The Journal of cell biology*, 128(5), 949–957.
- Shimizu, Y., Kinoshita, I., Kikuchi, J., Yamazaki, K., Nishimura, M., Birrer, M. J., & Dosaka-Akita, H. (2008). Growth inhibition of non-small cell lung cancer cells by AP-1 blockade using a cJun dominant-negative mutant. *British journal of cancer*, 98(5), 915–922. doi:10.1038/sj.bjc.6604267.
- Silye, R., Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Poole, S., van, N. S., Batchelor, W., ... (1998). E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *The Journal of pathology*, 186(4), 350–355. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199812)186:4<350::AID-PATH181>3.0.CO;2-K.
- Smurova K.M., B. A. A. V. A. D. A. I. B. (1990). Dose-dependent effect of nocodazole on endothelial cell cytoskeleton. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series A: Membrane and Cell Biology*, 2(2), 119–127. doi:10.1134/S1190747808020049.
- Sreeramaneni, R., Chaudhry, A., McMahon, M., Sherr, C. J., & Inoue, K. (2005). Ras-Raf-Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor. *Molecular and cellular biology*, 25(1), 220–232. doi:10.1128/MCB.25.1.220-232.2005.
- Staddon, J. M., Smales, C., Schulze, C., Esch, F. S., & Rubin, L. L. (1995). p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *The Journal of cell biology*, 130(2), 369–381.
- Steingrimsson, E., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet*, 38, 365–411. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.092717.
- Stevens, A. P., Spangler, B., Wallner, S., Kreutz, M., Dettmer, K., Oefner, P. J., & Bosserhoff, A. K. (2009). Direct and tumor microenvironment mediated influences of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine on tumor progression of malignant melanoma. *Journal of cellular biochemistry*, 106(2), 210–219. doi:10.1002/jcb.21984.

- Stevenson, B. R. (1999). Understanding tight junction clinical physiology at the molecular level. *The Journal of clinical investigation*, 104(1), 3–4. doi:10.1172/JCI7599.
- Tada, A., Pereira, E., Beitner-Johnson, D., Kavanagh, R., & Abdel-Malek, Z. A. (2002). Mitogen- and ultraviolet-B-induced signaling pathways in normal human. *J Invest Dermatol*, 118(2), 316–322. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01694.x.
- Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews*, 81(1), 153–208.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science (New York, N, 251(5000)*, 1451–1455.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology*, 7(5), 619–627.
- Talotta, F., Mega, T., Bossis, G., Casalino, L., Basbous, J., Jariel-Encontre, I., ... (2010). Heterodimerization with Fra-1 cooperates with the ERK pathway to stabilize c-Jun. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2010.211.
- Tatzel, J., Poser, I., Schroeder, J., & Bosserhoff, A. K. (2005). Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells. *Pigment Cell Res*, 18(2), 92–101. doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00212.x.
- Tatzel, J., Poser, I., Schroeder, J., & Bosserhoff, A. K. (2005). Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 18(2), 92–101. doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00212.x.
- Tunggal, J. A., Helfrich, I., Schmitz, A., Schwarz, H., Gunzel, D., Fromm, M., ... (2005). E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *The EMBO journal*, 24(6), 1146–1156. doi:10.1038/sj.emboj.7600605.
- van, d. W. M., & Clevers, H. (1992). Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *The EMBO journal*, 11(8), 3039–3044.
- van, d. W. M., Oosterwegel, M., Dooijes, D., & Clevers, H. (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J*, 10(1), 123–132.
- van, E. A., van, D. E., Wielders, R., van, d. B.-B. C., & Schrier, P. I. (1994). ras oncogene activation does not induce sensitivity to natural killer cell-mediated lysis in human melanoma. *J Invest Dermatol*, 103(5 Suppl), 117S-121S.
- Verma, S., Shewan, A. M., Scott, J. A., Helwani, F. M., den, E. N. R., Miki, H., ... (2004). Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *The Journal of biological chemistry*, 279(32), 34062–34070. doi:10.1074/jbc.M404814200.
- Vleugel, M. M., Greijer, A. E., Bos, R., van, d. W. E., & van, D. P. J. (2006). c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive. *Hum Pathol*, 37(6), 668–674. doi:10.1016/j.humpath.2006.01.022.

- Wagener C (1999). *Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren*. Stuttgart; New York: Thieme.
- Wagner, E. F. (2001). AP-1--Introductory remarks. *Oncogene*, *20*(19), 2334–2335. doi:10.1038/sj.onc.1204416.
- Wagner, E. F., & Eferl, R. (2005). Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev*, *208*, 126–140. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00332.x.
- Wei, W., Jin, J., Schlisio, S., Harper, J. W., & Kaelin, W. G., JR (2005). The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and. *Cancer Cell*, *8*(1), 25–33. doi:10.1016/j.ccr.2005.06.005.
- Wellbrock, C., & Marais, R. (2005). Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma. *J Cell Biol*, *170*(5), 703–708. doi:10.1083/jcb.200505059.
- Weston, C. R., & Davis, R. J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev*, *12*(1), 14–21.
- Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. *Current opinion in cell biology*, *15*(5), 509–514.
- Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annual review of cell and developmental biology*, *19*, 207–235. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.011102.111135.
- Xu, L. Y., & Koo, J. (2006). Predictive value of phenotypic variables for skin cancer: risk assessment beyond. *Int J Dermatol*, *45*(11), 1275–1283. doi:10.1111/j.1365-4632.2006.02999.x.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., & Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*, *123*(5), 889–901. doi:10.1016/j.cell.2005.09.020.
- Yamazaki, D., Oikawa, T., & Takenawa, T. (2007). Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *Journal of cell science*, *120*(Pt 1), 86–100. doi:10.1242/jcs.03311.
- Yang, S., McNulty, S., & Meyskens, F. L., JR (2004). During human melanoma progression AP-1 binding pairs are altered with loss of c-Jun in vitro. *Pigment Cell Res*, *17*(1), 74–83.
- Yao, K. S., Xanthoudakis, S., Curran, T., & O'Dwyer, P. J. (1994). Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29. *Mol Cell Biol*, *14*(9), 5997–6003.
- Zhang, F. L., Kirschmeier, P., Carr, D., James, L., Bond, R. W., Wang, L., ... (1997). Characterization of Ha-ras, N-ras, Ki-Ras4A, and Ki-Ras4B as in vitro substrates. *J Biol Chem*, *272*(15), 10232–10239.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP-1	activating protein-1
AS	antisense
ATF	activation transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bZIP	basic leucin zipper domain
cDNA	copy DNA
CRE	cyclic AMP responsive element
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	Doppelstrang
E-cadherin	epithelial cadherin
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E-coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
et al.	et alii
FGF	Fibroblast growth factor
FKS	fötales Kälberserum
h	Stunden
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen (-paare)
kDA	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LM	lentigo-maligna Melanom
MAPK	mitogen activated protein kinase
MIA	melanoma inhibitory activity
min	Minuten
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA

N-cadherin	neuronal cadherin
NFκB	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-Cells
NHEM	normale humane epidermale Melanozyten
OD	optische Dichte
PAA	Poly-Acrylamid
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKC	Protein Kinase C
Poly dIdC	Poly-desoxy-Cytosin-desoxy-Inosin
RGP	radial growth phase
RIPA	radio-immunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
S	sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate
VGP	vertical growth phase
U	Unit
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
(v/v)	Volumenverhältnis
(w/v)	Masse pro Volumen

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei all denjenigen bedanken, die mich beim Entstehen dieser Arbeit unterstützt haben:

Zuerst möchte ich mich ganz besonders bei meiner Chefin Prof. Dr. Anja Bosserhoff für ihre Betreuung, Unterstützung, für ein immer offenes Ohr und ständige Diskussionsbereitschaft bedanken. Vielen, vielen Dank, dass du mir auch die Möglichkeit gegeben hast, in andere Bereiche des wissenschaftlichen Arbeitens (Kongressorganisation) reinschnuppern zu können. Auch durch die Mitarbeit im Melanomverbund, die du mir ermöglicht hast, habe ich ganz neue Einblicke in die Welt der Wissenschaft bekommen. Für deinen Einsatz und deine Unterstützung bei meinem zukünftigen Vorhaben, dem Medizinstudium, werde ich dir immer dankbar sein!

Mein Dank gilt auch meinem Doktorvater Prof. Dr. Dirk Haller, der sich bereit erklärt hat, mich und meine Arbeit als „Externe“ an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der TU München zu vertreten.

Dem Institutsleiter der Pathologie, Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter danke ich, dass ich diese Arbeit an seinem Institut anfertigen durfte, und auch für die finanzielle Unterstützung bei Kongressreisen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Silke Kuphal. Für ihre unermüdliche Hilfe bei der Durchführung von Versuchen als auch beim Erstellen und Korrigieren dieser Arbeit bin ich ihr unendlich dankbar. Silke, ohne dich hätte ich das nie so hinbekommen. Danke, dass du die ganzen Jahre über immer an mich geglaubt hast und in Krisensituation immer versucht hast mich zum Weitermachen zu motivieren. Auch privat bist du eine so gute Freundin geworden, die ich nicht mehr missen will.

Mein Dank gilt auch der gesamten AG Bosserhoff. Besonders bedanken möchte ich mich bei Susi. Als meine „Labor-Mitbewohnerin“, hast du hin und wieder mal meinen Frust zu spüren bekommen. Danke, dass du das ausgehalten hast! Vielen Dank auch für die kleinen, netten Gespräche zwischen zwei Versuchen. Ohne dich wäre es ganz schön fad im Labor gewesen.

Vielen Dank auch dir Eva. Ich konnte immer zu dir kommen, wenn ich wieder mal Hilfe beim Rechnen brauchte. Aber auch in allen anderen labortechnischen Dingen

konnte ich dich um Rat fragen. Unsere gemeinsamen Busfahrten werde ich echt vermissen. Auch du bist für mich eine so tolle Freundin geworden!

Der gesamten Kaffeegang danke ich für die schönen und lustigen Stunden im Kaffeeraum, auch nach Feierabend. Das Highlight der Woche!

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Ihr habt mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht. Ohne eure Hilfe wäre ich nie so weit gekommen. Auch in schwierigen Zeiten standet ihr immer hinter mir und habt alle meine Entscheidungen toleriert. Vielen, vielen Dank!

Einem Mitglied meiner Familie, nämlich Stefan, danke ich besonders für seine unermüdliche Hilfe bei computertechnischen Fragestellungen. Danke, dass du jederzeit bereit warst, meine rudimentären Computerkenntnisse zu verbessern. Ohne dich würde es die Doktorarbeit in dieser Form nicht geben!

