

Multipler Einfluß des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls
E-Cadherin
auf Invasion und Metastasierung des
malignen Melanoms



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silke Kuphal
aus Steinheim/Westf.
April 2005

Promotionsgesuch eingereicht am 17.07.2002

Die Arbeit wurde angeleitet von Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Karl Kunzelmann

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Deutzmann
2. Gutachterin: Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff
3. Prüfer: Prof. Dr. Charlotte Förster

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Das maligne Melanom	4
1.1.1 Definition des malignen Melanoms	4
1.1.2 Inzidenz des malignen Melanoms	4
1.1.3 Klassifikation des malignen Melanoms	5
1.1.4 Die Pathogenese des malignen Melanoms	6
1.2 Molekulare Grundlagen der Entstehung des malignen Melanoms	7
1.2.1 Wachstumsfaktoren für die Proliferation	8
1.2.2 Transkriptionsfaktoren	12
1.2.3 Matrixdegradation zur Förderung der Invasion	18
1.2.4 Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade	21
1.2.5 Moleküle der Zelladhäsion	23
1.3 Das membranständige Molekül E-Cadherin in der Haut	28
1.3.1 Verlust von E-Cadherin im malignen Melanom	31
1.3.2 Der transkriptionelle Repressor Snail verhindert die E-Cadherin Expression im malignen Melanom	32
1.4 Beteiligung von Cadherinen an Zelladhäsion, Signaltransduktion und Genexpression	33
1.4.1 beta-Catenin/Wnt Signalweg und E-Cadherin Zelladhäsion	33
1.4.2 Rho GTPasen und E-Cadherin Zelladhäsion	36
1.4.3 Rezeptor Tyrosin Kinasen und Cadherin vermittelte Zelladhäsion	37
2 ZIELSETZUNG	40
3 EIGENE ERGEBNISSE UND DISKUSSION	41
3.1 Etablierung von drei Modellsystemen zur Untersuchung des Verlustes der E-Cadherin Expression	41
3.2 E-Cadherin und weitere Zielgene des Transkriptionsfaktors Snail	47
3.2.1 E-Cadherin Regulation durch MIA	52
3.3 Untersuchung E-Cadherin abhängiger Regulationsmechanismen im malignen Melanom	54
3.3.1 NFkappaB Aktivität im malignen Melanom	55
3.3.2 Durch E-Cadherin regulierte zytoplasmatische Moleküle	59
3.3.3 Einfluß von beta-Catenin	65
3.4 Untersuchung von N-Cadherin, als ein Zielgen der E-Cadherin Signalkette	67
4 AUSBLICK	72
5 ANHANG	73
5.1 Material und Methoden	73
5.1.1 Material	73
5.1.2 Methoden	85
5.2 Literaturverzeichnis	102

Anhang I Kuphal, S., Poser, I., Jobin, C., Hellerbrand, C., and Bosserhoff, A. K. (2004). Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* 23, 8509-8519.

Anhang II Poser, I., Tatzel, J., Kuphal, S., and Bosserhoff, A. K. (2004). Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene* 23, 6115-6124.

Anhang III Kuphal, S., and Bosserhoff, A. K. (2005). Influence of the cytoplasmic domain of E-Cadherin on endogenous N-Cadherin Expression in malignant melanoma. JBC zur Veröffentlichung eingereicht.

Anhang IV Kuphal, S., Palm, H. G., Poser, I., and Bosserhoff, A. K. (2005). Snail regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma research* zur Veröffentlichung eingereicht.

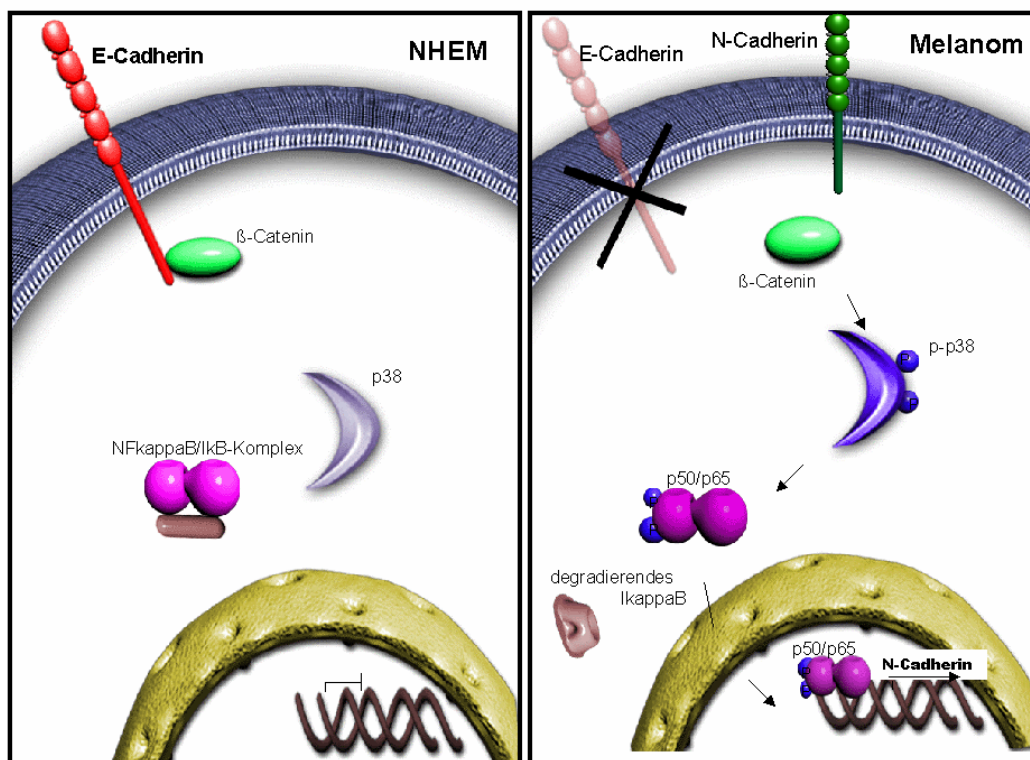
Abkürzungen _____ 121

DANKSAGUNG _____

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte auf molekularbiologischer Ebene ein Beitrag zum Verständnis der Entstehung des malignen Melanoms erbracht werden. Aufgrund von Untersuchungen der veränderten Zell-Zell Adhäsion und dem Vergleich der Ergebnisse aus der Tumorforschung mit Zelladhäsionsbedingungen während der Embryogenese, konnte ein Verlust der E-Cadherin Expression in entarteten Melanozyten bereits seit langem für das große Metastasierungspotential des malignen Melanoms verantwortlich gemacht werden. Durch den Verlust des E-Cadherin Moleküls entziehen sich die veränderten Melanozyten der Adhäsions- und Wachstumskontrolle der sie umgebenden Keratinozyten.

Welche Signaltransduktionen durch den Verlust der E-Cadherin Zelladhäsion entstehen, wurde im Rahmen meiner Dissertation geklärt (siehe Abbildung).



Schematische Darstellung der Ergebnisse der Dissertation. Die Expression von E-Cadherin in Melanozyten und der Verlust der E-Cadherin Expression in Melanomzellen führt zu signifikanten Unterschieden in der Signalkaskade. Im Melanom führt ungebundenes beta-Catenin zur Phosphorylierung von der MAP Kinase p38, der Aktivitätssteigerung von NFkappaB und der transkriptionellen Aktivierung des N-Cadherin Promotors und der anschließenden Etablierung von N-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül. Verändert nach Kuphal et al., 2004.

Melanomzellen, die kein endogenes E-Cadherin mehr produzieren, zeigten in Immunfluoreszenz und Western Blot Daten eine erhöhte beta-Catenin Ansammlung im Zytoplasma. Im Gegensatz zum Kolon- bzw. Mammakarzinom bleibt das beta-Catenin ungebunden im Zytoplasma lokalisiert und transloziert nicht in den Zellkern. Durch das zytoplasmatische beta-Catenin kommt es zu einer Aktivitätssteigerung der MAP Kinase p38. Im weiteren wurde, durch bisher noch ungeklärte Signalweiterleitungen, eine Aktivierung von NFkappaB festgestellt. Die Untereinheiten p50/p65 von NFkappaB translokierten vermehrt in den Zellkern und das führte zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität. Wir konnten auch zeigen, dass N-Cadherin ein neu entdecktes Zielmolekül von NFkappaB ist. Die gesteigerte Transkription von N-Cadherin korrelierte direkt mit der erhöhten NFkappaB Aktivität. Ferner zeigten EMSA (*electromobility gelshift assays*) Daten eine Bindung von NFkappaB an den N-Cadherin Promotor.

Durch die Reexpression von *full-length* E-Cadherin wurde hinsichtlich der E-Cadherin Zelladhäsion in Melanomzellen eine ähnliche Situation simuliert, wie sie in Melanozyten vorzufinden ist. Danach wurde eine Verringerung der p38 Phosphorylierung, NFkappaB Aktivität und der N-Cadherin Expression in Melanomzellen erzielt. Desweiteren wurde nicht nur durch die Expression des *full-length* E-Cadherin der im vorherigen Absatz beschriebene aktive Signaltransduktionsprozess in Melanomzellen revertiert. Auch nach Transfektion von dem ausschließlich zytoplasmatischen Bereich von E-Cadherin wurde die Signalkette unterbunden.

Nach weiteren Ergebnissen dieser Dissertation wird der E-Cadherin Verlust in Melanomzellen nicht nur durch den transkriptionellen Repressor Snail reguliert, sondern auch das Molekül MIA (*melanoma inhibitory activity*) verminderte die E-Cadherin Expression. Auf welcher funktionellen Weise diese Regulation stattfindet, ob MIA dabei einen Einfluß auf Snail besitzt oder den E-Cadherin Promotor direkt reprimiert, muß allerdings in weiteren Experimenten noch geklärt werden.

Die mit der Expression von Snail einhergehende epitheliale mesenchymale Transition (EMT) beruht nicht nur auf einer veränderten Genexpression von E-Cadherin. Auch weitere Marker der EMT sind durch Snail beeinflusst. Wir fanden MMP-2 (Matrixmetalloproteinase 2, GelatinaseA), EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer, basigin, CD147), SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteins, BM40, Osteonectin), TIMP-1 (tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase 1), Notch4, RhoA (GTPase RhoA) und t-PA (tissuetype plasminogen activator system) durch Snail reguliert. Allerdings fungiert Snail bei diesen Genen nicht als Repressor,

wie bei E-Cadherin, sondern als Aktivator. Alle Gene zeigten gesteigerte Expression in Abhängigkeit von Snail.

Zusammenfassend konnte diese Promotion klären, dass E-Cadherin nicht ausschließlich Zelladhäsionsprozesse reguliert, sondern auch Signalfunktionen in der Melanomzelle übernehmen kann. Zudem konnte diese Signalkaskade zum Teil aufgeklärt werden und es zeigte sich, dass es nach dem Verlust der E-Cadherin Expression zu einer Aktivitätssteigerung von NFkappaB kommt, welches die Expression von N-Cadherin stimuliert. Damit haben wir nicht nur die Signalfunktion von E-Cadherin charakterisiert, sondern auch den Cadherin Wechsel, von E-Cadherin zu N-Cadherin im Melanom aufklären können.

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

1.1.1 Definition des malignen Melanoms

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist ein bösartiger Tumor, der vom melanozytären Zellsystem der Haut ausgeht und sich überwiegend in der Haut manifestiert. Selten kommt er auch am Auge (Uvea und Retina), an den Hirnhäuten und an Schleimhäuten verschiedener Lokalisation vor. Die meisten Melanome setzen die Pigmentbildung fort, so dass der Tumor an seiner schwarzen, unregelmäßigen Oberfläche auf der Haut auffällt. Im Verhältnis zur Tumormasse besteht eine frühe Tendenz zur Metastasierung und damit eine ungünstige Prognose. Im Gegensatz zum Basaliom (Basalzellkarzinom), das ebenfalls eine maligne Hauterkrankung ist, aber kaum oder nur im Spätstadium zur Metastasierung neigt, gehört das maligne Melanom zur Gruppe der hochmalignen Tumore und ist etwa für 90% der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich.

1.1.2 Inzidenz des malignen Melanoms

Das maligne Melanom weist eine schnelle Häufigkeitszunahme auf. Hellhäutige Bevölkerungsgruppen in Ländern mit hoher UV-Einstrahlung, wie z.B. Australier und Neuseeländer, sind dabei besonders betroffen (Grin-Jorgensen et al., 1992; Marks und Kopf, 1995). Die aktuelle Inzidenz liegt in Deutschland zwischen 10 und 15 Fällen/100.000 Einwohner und Jahr. Es wird in Zukunft mit einer Verdopplung der Inzidenz alle 10 Jahre gerechnet. In Australien, Neuseeland und den Südstaaten der USA beträgt die Inzidenz in der weißen Bevölkerung 30-50 Fälle/100.000 Einwohner und Jahr. Weltweit nehmen die Erkrankungsfälle um 6% pro Jahr zu. Die Ursache der steigenden Inzidenz ist multifaktoriell: höheres Durchschnittsalter, genetische Disposition (FAMMM: familiar atypical multiple mole melanoma syndrome (Albert et al., 1990; Garbe et al., 1994; Greene et al., 1985)), immunsuppressive Faktoren, geänderte- soziale Verhaltensweisen und Reisegewohnheiten, die Zahl erlittener Sonnenbrände sowie das Lebensalter, in dem erstmals eine starke Sonnenexposition

erfolgte. Insgesamt ist die Bedeutung von UVA- und UVB- Licht bis heute nicht gänzlich geklärt, bei genetisch disponierten Individuen wird UV-Licht allgemein als Promotor angesehen (Garbe et al., 1989; Weiss et al., 1990). Ungefähr die Hälfte aller Melanompatienten sind jünger als 50 Jahre. Es erkranken mehr Frauen als Männer (w/m: 55%/45%). Bei Frauen mittleren Alters entwickeln sich Melanome bevorzugt an den Beinen, bei Männern eher am Rumpf. Grundsätzlich kann ein Melanom jedoch an jeder Körperstelle, auch an Schleimhäuten und im Auge, auftreten. In der weißen Bevölkerung liegt die Inzidenz 10- bis 100- fach höher als bei Afrikanern und Asiaten. Bei Auftreten des malignen Melanoms in diesen Bevölkerungsgruppen sind nahezu ausschließlich der Schleimhautbereich oder die palmoplantaren Flächen betroffen. Dermatologen sahen im Jahr 2004 nach aktuellsten Angaben einen deutlichen Anstieg der Hautkrebsinzidenz in Deutschland mit einem Nord-Süd-Gefälle. Maligne Melanome werden inzwischen bei mehr als 11.400 Menschen im Jahr neu diagnostiziert. Die Häufigkeit ist in Norddeutschland höher als im Süden, was auf eine genetische Disposition zurückgeführt wird. Schätzungen der WHO (world health organization) zufolge kommt es jährlich weltweit zu ca. 200.000 neuen Melanomerkrankung. Dieser Tumor gehört damit zu den häufigsten Krebserkrankungen (Ärzte-Woche, 15. Jg., Nr. 17, 2001).

1.1.3 Klassifikation des malignen Melanoms

Klinisch und histopathologisch lassen sich vier verschiedene Melanomtypen voneinander unterscheiden. Einige Typen (5%) sind jedoch nicht klassifizierbar oder repräsentieren Mischformen. Zu den klassifizierten Melanomen gehört das superfiziell spreitende Melanom (SSM: 57,4%). Dieses ist das am häufigsten vorkommende Melanom. Das SSM bildet eine scharf begrenzte Zone von brauner bis schwarzer Farbe. Es wächst meistens relativ langsam in horizontaler Richtung. Am häufigsten kommt das SSM am Rücken, an der Brust und an den Extremitäten vor. Meistens sind Menschen um das 50. Lebensjahr betroffen. Wird das SSM früh erkannt, besteht eine gute Heilungschance. Das knotige (primär noduläre) Melanom (NM: 21,4%) entsteht auf gesunder Haut, oder durch eine Entwicklung aus einem Muttermal vom Typ Nävuszellnävus. Die bevorzugten Gebiete sind auch hier der Rücken, die Brust und die Extremitäten. Das Alter der Betroffenen liegt durchschnittlich bei 55 Jahren. Anders als beim SSM, wächst die knotige Form des Melanoms in die Breite und in die Tiefe. Außerdem klassifiziert ist das *Lentigo maligna*, wobei es sich um eine zunächst gutartige Hautveränderung handelt, die aufgrund eines chronischen Lichtschadens entsteht. Sie äußert sich in flachen, unregelmäßig gefärbten, braunen bis schwarzen

Flecken. Diese Hautveränderung kann Jahre bis Jahrzehnte bestehen und gutartig sein. Sie kann aber auch in eine bösartige Wachstumsform übergehen, das *Lentigo-maligna-Melanom* (LMM: 8,8%). Der bei den dunklen Rassen häufigste Melanom-Typ ist das akrolentigiöse Melanom (ALM: 4%). Der Wortteil "akren" bedeutet "an den Extremitäten" und Lentigo ist umgangssprachlich ein Leberfleck. Das ALM befindet sich vorwiegend an den Fingern, Handinnenflächen und Fußsohlen, sowie im Bereich der Schleimhäute.

1.1.4 Die Pathogenese des malignen Melanoms

Unter den bösartigen Hauttumoren ist das maligne Melanom, wie bereits erwähnt, dasjenige mit der größten Malignität. Die Bildung eines bösartigen Hauttumors wird aufgrund histopathologischer Merkmale und anlehnend an ein Modellsystem von Clark *et al.*, in 5 Phasen gegliedert (siehe auch Abbildung 1), die genetische und morphologische Veränderungen beinhalten (Clark, 1991; Clark *et al.*, 1984; Meier *et al.*, 1998): (1) Normale und angeborene (kongenitale) Nävi mit normalen Melanozyten werden als benigne Neoplasmen von Melanozyten angesehen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass kongenitale Nävi mittlerer Größe nur sehr selten entarten. Bei kongenitalen Nävi mit einer Größe von über 20mm wird die Wahrscheinlichkeit, im Verlauf des Lebens in ein malignes Melanom überzugehen, mit etwa 5% angegeben. (2) Dysplastische (fehlentwickelte) Nävi mit strukturellen Veränderungen stellen die Vorläufer des Melanoms dar. Die Melanozyten dieser Nävi weisen eine epithelartige Struktur auf und ihr anomales Wachstum führt zur Bildung von Nestern, in denen die Nävuszellen bereits ihre typisch dendritischen Ausläufer verlieren (Hsu *et al.*, 2000a; Hsu *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2000b). (3) Zellen des primären Melanoms, die noch nicht metastasiert haben, befinden sich in der sogenannten frühen radialen Wachstumsphase (RGP). (4) Davon gliedern sich entartete Melanozyten ab, die ein primäres Melanom in fortgeschrittener vertikaler Wachstumsphase (VGP) entwickeln, dessen Zellen bereits in die Dermis eingedrungen sind und zu metastasieren beginnen. (5) Das metastasierende Melanom, welches sich sowohl auf dem Blutweg, als auch auf dem Lymphweg im Körper verbreitet, grenzt die letzte Entwicklungsphase des Melanoms ab.

Die Prognose für den Patienten richtet sich nach der Tumordicke (TD). Bei einer TD von kleiner als 0,75mm liegt die 10-Jahres-Überlebensrate bei 97% und nimmt dann mit steigender Tumordicke stetig ab. Bei einer TD größer als 4mm liegt sie nur noch bei 50%. Eine kurative Behandlung durch operative Entfernung des Melanoms ist nur im frühen Stadium des Primärtumors möglich. Fortgeschrittene Tumore erweisen sich

als sehr resistent gegenüber konventionellen Chemo- oder Radiotherapien. Auch bei der operativen Entfernung des Melanoms in frühen Stadien ist es anschließend dennoch häufig zur Metastasierung des Tumors gekommen. Falls bereits Metastasen in den Lymphknoten oder sogar Fernmetastasen in Geweben vorhanden sind, sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate auf ca. 5%. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung neuer Therapiemodalitäten notwendig, wozu ein molekulares Verständnis des Wachstums maligner Melanomzellen beitragen könnte.

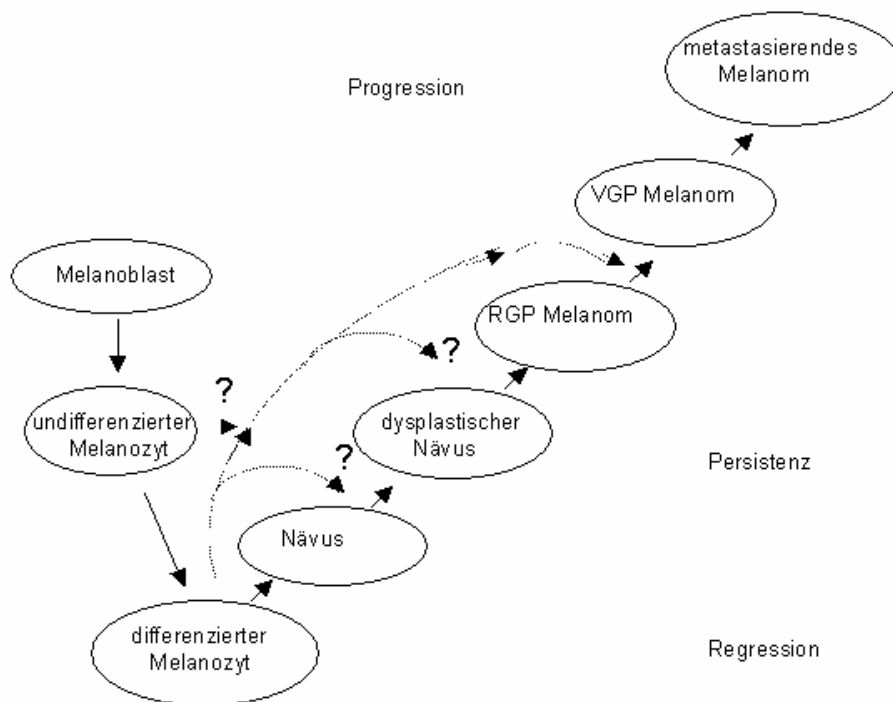


Abbildung 1: Modell der Tumorphysik bei Melanomen nach Clark et al., 1984. Melanome entwickeln sich gewöhnlich in verschiedenen Schritten vom Nävus zum metastasierenden Melanom. Die Entwicklung beginnt entweder mit normalen Melanozyten oder aus melanozytären Dysplasien. RGP=radial growth phase; VGP=vertical growth phase

1.2 Molekulare Grundlagen der Entstehung des malignen Melanoms

Trotz intensiver Forschung sind die Ursachen der Melanomentstehung noch unbekannt. Allerdings konnte mittlerweile eine Kausalität zwischen der Melanomentstehung und der Sonnenbelastung der Haut hergestellt werden. Häufige Intervalle intensiver Sonnenexposition und häufige Sonnenbrände führen zur Melanomentstehung. Wenn die Haut sich nicht langsam an die Sonneneinstrahlung gewöhnen kann, ist die Melaninproduktion der Melanozyten nicht ausreichend, um sie selbst und umliegende Keratinozyten vor DNA Schäden durch UV-Licht zu schützen.

Das UV-B Licht wird dabei in erster Linie für die DNA Läsionen verantwortlich gemacht (Perlis und Herlyn, 2004). Besonders Sonnenbrände im Kindesalter sind ein Risikofaktor für späteren Hautkrebs.

Aus molekularbiologischer Sicht ist über die Entstehung des Melanoms wenig bekannt. Die unkontrollierte **Proliferation** der Zellen des malignen Melanoms wird bereits seit langem untersucht, indem verschiedene Aspekte der Krebsentwicklung zunächst einzeln betrachtet werden. Für die Proliferation können sowohl Defekte in der Reaktion auf Wachstumsfaktoren und Zytokine verantwortlich gemacht werden, was zum autonom gesteuerten Zellwachstum führt. Veränderte Signaltransduktionen oder auch deregulierte Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren können aber ebenso die ungehemmte Proliferation der entarteten Zellen ermöglichen. Signalwege und Transkriptionsfaktoren, die ihre ursprüngliche Funktion in der Entwicklung von Melanozyten während der Embryogenese haben, werden im Rahmen der Melanomforschung immer häufiger beleuchtet. Es ist nach neueren Forschungsergebnissen klar geworden, dass diese bekannten Signalwege während der Transformation und Progression von Tumoren in deregulierter Form ebenfalls eine wichtige Rolle übernehmen können. Außerdem werden die Expression von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen untersucht. Damit es schließlich zur **Metastasierung** der Melanomzellen kommen kann, müssen weitere Faktoren, die bei der **Migration** von Zellen, dem **Adhäsionsverhalten** und der **Invasion** (Matrixdegradation) wichtig sind, ebenfalls verändert sein.

Die folgenden Punkte untergliedern wichtige Aspekte der Melanomentstehung nach äußeren Faktoren (Signalmolekülen) die die Melanomzelle beeinflussen, Signalwegen die äußere Reize weiterleiten, Vorgängen im Zellkern die Transkriptionsfaktoren einschließen, veränderten Zelladhäsionseigenschaften durch Integrine und Cadherine und Matrixdegradation durch proteolytische Enzyme.

1.2.1 Wachstumsfaktoren für die Proliferation

Melanomzellen sezernieren viele Wachstumsfaktoren und Zytokine, die es durch autokrine und parakrine Effekte ermöglichen, die autonome Kontrolle des Wachstums von Melanomzellen zu gewährleisten. Dafür müssen die Melanomzellen nicht nur den jeweiligen Wachstumsfaktors produzieren, sondern auch den dafür notwendigen Rezeptor exprimieren. Melanomzellen können des Weiteren auch auf Faktoren von Nachbarzellen reagieren. Autokrine Wachstumsfaktoren sind z.B. bFGF (basic fibroblast growth factor), MGSA/GRO (melanoma growth stimulatory activity), IL-8, IL-6, IL-10 (Interleukin-8; -6; -10) und PDGF-A (platelet-derived growth factor), die von

Melanomzellen produziert werden, um die eigene Proliferation und Migration anzuregen. Parakrine Wachstumsfaktoren sind PDGF, EGF (epidermal growth factor), TGF-beta (transforming growth factor), IL-1, VEGF (vascular endothelial growth factor) und GM-CSF (granulocyte /macrophage colony stimulating factor), die auf die Umgebungszellen (Endothelzellen, Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten, Keratinozyten und Fibroblasten) der Tumorzellen stimulierend wirken und die umliegenden Zellen zur Produktion weiterer tumorrelevanter Faktoren anregen (Lazar-Molnar et al., 2000) (siehe Abbildung 2). Zu parakrinen Effekten gehören Angiogenese, Stromaformation, Veränderung der Immunantwort und die Aktivierung proteolytischer Enzyme. Einige Wachstumsfaktoren wirken sogar zunächst inhibierend auf Melanozyten, später im malignen Melanom erlangen sie dann wachstumsstimulierende Funktion. Dazu gehören IL-1, IL-6, TGF-beta, und IFN (Interferon), die von Nachbarzellen der Melanozyten produziert werden.

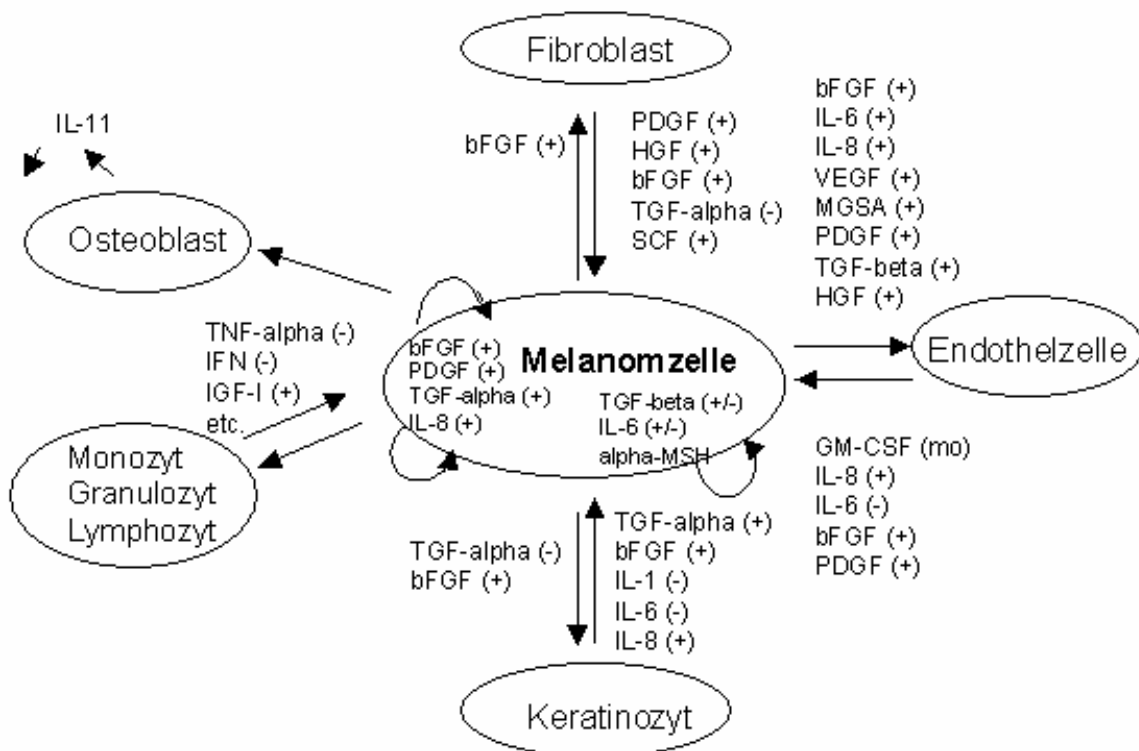


Abbildung 2: Wachstumsregulation von Melanomzellen durch autokrine und parakrine Wachstumsfaktoren und Zytokine. +=Stimulator; -=Inhibitor; mo=Motilitätsfaktor
 TGF, transforming growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; PDGF, plateled-derived growth factor; MGSA, melanoma growth stimulatory activity; HGF, hepatocyte growth factor; IGF, insulin-like growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; IL, Interleukin; IFN, Interferon; alpha-MSH, alpha-melanocyte-stimulating hormone; GM-CSF, granulocyte /makrophage colony stimulating factor. Abbildung verändert nach Lazar-Molnar et al., 2000.

Bereits seit langer Zeit ist bekannt, dass viele Tumorzelllinien in Zellkulturmedium mit wenig oder sogar ohne Zusätze von Serumfaktoren wachsen können. Melanozyten aber können nur in Gegenwart von bFGF (basic fibroblast growth factor), TPA (Tetradecanoylphorbolacetat, Synonym: PMA, Phorbol-12myristat-13-acetat) und weiterer Faktoren in Kultur gehalten werden (Herlyn et al., 1985; Lazar-Molnar et al., 2000). Die Tabelle 1 zeigt ein Beispiel an Wachstumsfaktoren und Mitogenen, die für Melanozyten im Vergleich zu Melanomzellen vorhanden sein müssen.

normale Melanozyten	Primärtumor		Metastase
	frühes und mittleres Stadium	fortgeschrittenes Stadium	
Insulin oder IGF-I	Insulin oder IGF-I	Insulin oder IGF-I*	--
alpha-MSH	--	--	--
bFGF	--	--	--
TPA	--	--	--

Tabelle 1: Wachstumsfaktoren und Mitogene, die *in vitro* von Melanozyten und Melanomzellen benötigt werden. Die Tabelle ist nach Lazar-Molnar et al., 2000 verändert: *= wenig Abhängigkeit; IGF-I=insulin growth factor I; alpha-MSH=alpha-melanocyte stimulator hormone; bFGF=basic fibroblast growth factor; TPA=12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate

Als Beispiel der Wachstumsfaktoren wird **bFGF** (basal fibroblast growth factor) hervorgehoben, der der meist exprimierte Wachstumsfaktor der Melanomzellen ist. Von Melanozyten kann bFGF nicht exprimiert werden, was diese von externer bFGF Zufuhr abhängig macht. Melanomzellen exprimieren neben dem FGF-Rezeptor4 auch den FGF-Rezeptor1. Unterdrückung der bFGF Expression durch *antisense* Oligonukleotide oder durch Antikörper gegen bFGF führt zu einer Inhibition des Melanomzellwachstums (Becker et al., 1989; Lazar-Molnar et al., 2000). Transfektion muriner Melanozyten mit bFGF-Expressionsplasmid führt zu einem autonomen Wachstum. Die transfizierten Zellen bleiben aber nicht-tumorigen in den Mäusen, ein Hinweis darauf, dass bFGF nicht zur Transformation der Mausmelanozyten führt (Dotto et al., 1989). bFGF hat nicht nur autokrine Funktion, sondern regt auch umliegende Zellen zur Produktion von PDGF und VEGF an. Zu der FGF Superfamilie gehören auch Wachstumsfaktoren wie FGF-7 (=KGF, keratinocyte growth factor), der von

Fibroblasten, Melanomzellen und Melanozyten exprimiert wird (Lazar-Molnar et al., 2000).

PDGF-A und **PDGF-B** (platelet-derived growth factor) werden von Melanomzellen exprimiert; PDGF-A wird sehr selten auch von Melanozyten exprimiert, die aber kein PDGF-B exprimieren. In erster Linie wirkt dieser Faktor parakrin, da Melanomzellen den Rezeptor für diesen Wachstumsfaktor nicht besitzen (Forsberg et al., 1993). PDGF induziert in Fibroblasten die Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix und IGF-I für die Stimulation von den Melanomzellen, die den IGF-I Rezeptor besitzen. Von **IGF-I** (insulin like growth factor) wurde gezeigt, dass es die Motilität von Melanomzellen steigert (Stracke et al., 1989).

TGF-beta (transforming growth factor beta), vor allen Dingen TGF-beta2, wird von Melanomzellen sezerniert, jedoch nicht von Melanozyten, (Reed et al., 1994; Rodeck et al., 1994), beeinflusst die umgebenden Fibroblasten positiv und hat immunsuppressive Funktion (Berking et al., 2001).

TGF-beta kann generell stimulatorische, als auch inhibitorische Funktionen besitzen. TGF-beta1 und TGF-beta3, welche in Melanozyten gefunden wurden, üben im Gegensatz zum TGF-beta2 des Melanoms bei der Entwicklung der Melanozyten inhibitorische Funktionen aus, und TGF-beta1 führt zur Apoptose von Melanozyten. TGF-beta ist normalerweise ein negativer Regulator für Endothelzellen und normale Melanozyten und verhindert die Proliferation (Massague et al., 2000).

Melanomzellen sind jedoch resistent gegenüber antiproliferative Effekte von TGF-beta, weil sie ihre Sensibilität für TGF-beta verlieren und die Zellen TGF-beta im fortgeschrittenen Stadium des malignen Melanoms sogar als autokrinen Stimulator für sich nutzen (Shih und Herlyn, 1993). In dem Fall der Entwicklung eines malignen Melanoms hat TGF-beta dann auch parakrine Effekte auf die Angiogenese. Außerdem hilft es den Melanomzellen durch Stimulation von IL-11 in den Osteoblasten, Tumorzellen auch in den Knochen wandern zu lassen (Morinaga et al., 1997). Dieser Wachstumsfaktor dient daher als biologischer Marker für die Melanomprogression *in situ*.

Die konstitutive Expression von **TGF-alpha** (transforming growth factor alpha) ist ein Phänomen von humanen Melanomzellen. TGF-alpha weist hohe Homologien in der Rezeptorbindenden Domäne zu EGF auf. Beide Proteine binden an den EGF-Rezeptor und aktivieren ihn. Die Expression des EGF Rezeptors korreliert mit dem Stadium der Tumorprogression: der Rezeptor wird in hohem Maß in der VGP (89%) und im metastasierenden Melanomen (80%) gefunden (Lazar-Molnar et al., 2000).

1.2.2 Transkriptionsfaktoren des malignen Melanoms

Der Einfluß einer veränderten Expression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird im malignen Melanom eher selten diskutiert, obwohl hier ein Grundstein veränderter Genaktivität bei der Tumorentstehung gelegt wird. Transkriptionelle Aktivierung oder Reprimierung einer Vielzahl von Genen kann die Tumorentstehung und Metastasierung beeinflussen. Es treten außerdem weitere Modifikationen in der Zelle auf, wenn die Expression eines Transkriptionsfaktors verändert wird, da hierdurch weitere Moleküle von Signalwegen reguliert werden können. Im folgenden wird auf die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2alpha, CREB, ETS-1, HMGB1, LEF/TCF, MITF, STAT und NFkappaB näher eingegangen.

Die **AP-1** (activation protein 1) Familie der Transkriptionsfaktoren besteht aus c-Jun, JunD, JunB, c-Fos, Fra-1, Fra-2 und FosB. Die Mitglieder der Jun und Fos Familien bilden Heterodimere, um an die DNA Sequenz 5`-TGA(C/G)TCA-3` zu binden und die Transkription ihrer Zielgene zu aktivieren (Nakabeppu et al., 1988). Die AP-1 Dimer-Kombinationen üben variablen Einfluß auf ihre Zielgene aus. So ist der Einfluß von c-Jun bei der Aktivierung von Zielgenen größer, als der von JunB. JunB kann die Funktion von c-Jun auch unterbinden, wenn es ein Heterodimer mit c-Jun formt (Deng und Karin, 1993). Generell wurde für das maligne Melanom festgestellt, dass eine hohe Expression des *fos* Onkogens eine Progression der Tumorzellen zur Folge hat. Ein Zielgen von AP-1 ist z.B. MMP-7 (Urabe et al., 1992).

Die Bildung eines Homodimers von **AP-2** (activating enhancer-binding protein 2) führt zur Bindung an die DNA-Bindesequenz 5`-GCCNNNGGC-3` in Promotorbereichen verschiedener Zielgene (Hilger-Eversheim et al., 2000). Zu der AP-2 Transkriptionsfaktorfamilie gehören AP-2alpha, AP-2beta, AP-2gamma, AP-2delta und AP-2epsilon. Studien zeigten, dass AP-2 beim Übergang der Tumorzellen von der RGP in die VGP transkriptionell aktiv ist. Die Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors c-KIT ist im stark metastasierenden Melanom unterbunden. Die Expression des Adhäsionsmoleküls Mel-CAM/MUC18 ist im metastasierenden Melanom hochreguliert, da der Transkriptionsfaktor AP-2 in dieser Phase der Melanomentwicklung verloren geht und beide Gene von ihm unterschiedlich reguliert werden (Bar-Eli, 2001; Huang et al., 2001). Weitere Zielgene von AP-2 sind, wie E-Cadherin, an der Zelladhäsion beteiligt oder regulieren wie das Gen p21^{WAF} den Zellzyklus. Desweiteren werden Bcl-2 und FAS/APO1, welche wie c-KIT an der Apoptose beteiligt sind, von AP-2 reguliert. HER2/neu, beteiligt an Proliferation, IGF-R und VEGF aus der Angiogenese sind drei weitere Zielgene. Der Thrombin Rezeptor PAR-1 wird durch AP-2 reprimiert, denn der

Verlust von AP-2 im metastasierenden Melanom führt zur Expression von PAR-1. Generell unterdrückt die Expression der AP-2 Familienmitglieder eher die Metastasierung (Poser und Bosserhoff, 2004).

In der RGP Phase des malignen Melanoms spielt der Transkriptionsfaktor **CREB1** (cAMP-responsive element binding protein1) eine wichtige Rolle. Zu dieser Familie gehören auch weitere Untergruppen von Transkriptionsfaktoren: CREM, CRE-BP1 (=ATF2), ATF-1, ATF3, ATF4, ATF6 und B-ATF. Diese Transkriptionsfaktoren erkennen die Sequenz 5`-TGANNTCA-3`, die als CRE-Element (cAMP responsive element) bekannt ist (Hai und Hartman, 2001). Die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 führt zur Bindung des CREB-Bindungsprotein (CBP), welches die direkte Interaktion mit der DNA herstellt. Zielgene dieser Transkriptionsfaktorfamilie sind Somatostatin, Proenkephalin, fos, Mel-CAM/MUC18 und cyclinD1. Zellen mit einer verminderten CREB Aktivität zeigen auch eine verminderte MMP-2 Expression, was zu einer reduzierten Invasivität der Zellen führt.

ETS-1, ETS-2, ERG, ELK1 und ELK2 gehören zur Familie der **ETS** Transkriptionsfaktoren, die an die Sequenz 5`-GGAA/T-3`binden. Dadurch werden Gene positiv reguliert, die an der Tumorprogression beteiligt sind. Dazu gehören auch MMP-1, MMP-3, MMP-9, uPA und beta3 integrin. ETS-1 ist im malignen Melanom hochreguliert (Poser und Bosserhoff, 2004; Rothhammer et al., 2004).

Eine weitere wichtige Gruppe von Proteinen wird in **HMG-1/-2** (high mobility group proteins), HMG-14/-17 und HMG-I/-Y unterteilt. Die wichtige Domäne der Proteine trägt den Namen "HMG-Box" (Namensgeber ist das high mobility group Molekül) und ist für die DNA-Bindung verantwortlich. Diese "HMG-Box" wird auch in weiteren Proteinen, wie LEF-1 oder dem Faktor SRY (sex determining region Y, Differenzierungsfaktor bei der Hodenentwicklung) gefunden. HMG Proteine sind keine klassischen Transkriptionsfaktoren und binden vornehmlich unspezifisch an die Linker-DNA zwischen zwei benachbarten Nukleosomen oder wie HMG-14/-17 an den Nukleosomen Kern. Dadurch wird das Chromatin zur Ausbildung von ungewöhnlichen dreidimensionalen Strukturen gezwungen. HMG ist damit zwar nicht generell für die Struktur des Chromatins verantwortlich, aber es bestimmt die Regulation der Transkription der DNA durch andere Transkriptionsfaktoren mit. Zusätzlich kann HMG-1 auch spezifische Promotorregionen in Genen der Melanomzellen binden. Es erkennt im Promotor des Moleküls MIA (Melanoma inhibitory activity protein) spezifisch die Sequenz 5`-GGCATT-3` und steigert dessen Expression, was die Melanominvasion fördert (Poser und Bosserhoff, 2004; Poser et al., 2003).

Die Transkriptionsfaktorfamilie **LEF/TCF** (lymphoid enhancer factor/T-cell specific factor) vermittelt die Regulationsereignisse des Wnt Signalweges. Vier Mitglieder

dieser Familie von Transkriptionsfaktoren sind bekannt: LEF-1, TCF-1, TCF-3 und TCF-4. Diese besitzen wie bereits erwähnt die sogenannte "HMG-Box"-DNA-Bindedomäne und erkennen die DNA-Bindungssequenz 5`-AGATCAAAGGG-3` (van de Wetering et al., 1991). Durch den Koaktivator beta-Catenin (Armadillo in *Drosophila melanogaster*) wird die Transkription diverser Zielgene, wie c-myc und cyclinD1, aktiviert. Hier sei nur kurz erwähnt, dass in Abwesenheit des Wnt Signals beta-Catenin im Zytoplasma durch den GSK3beta (glycogen synthase kinase 3 beta)/Axin/APC (adenomatous polyposis coli)-Komplex der Degradation zugänglich gemacht wird. Bei aktivem Wnt Signal ist der Komplex inhibiert und beta-Catenin sammelt sich im Zytoplasma an und kann bei vielen Krebsarten, vor allen Dingen dem Kolonkarzinom, in den Zellkern translozieren und hier die transkriptionelle Aktivität von LEF/TCF positiv beeinflussen (Polakis, 2000) (siehe auch Kapitel 1.4.1). Das CREB-Bindungsprotein (CBP), CtBP (C-terminal binding protein) und Groucho (alternativer Name: TLE1=transducin-like enhancer of split1 oder ESG1) können an TCF binden und verhindern damit die Transkription von Zielgenen. In *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass dCBP direkt an TCF bindet, hierdurch eine Acetylierung eines konservierten Lysins an der spezifischen beta-Catenin TCF Bindestelle erfolgt, und beta-Catenin deshalb nicht mehr TCF koaktivierend binden kann (Brantjes et al., 2002). Generell sind die Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF Familie Tumorinduktoren. Allerdings wird im malignen Melanom die Aktivierung von LEF/TCF durch in den Zellkern translokiertes beta-Catenin noch diskutiert, denn in vielen Melanomzelllinien kann beta-Catenin bisher nicht im Zellkern nachgewiesen werden.

MITF (microphthalmia associated transcription factor) erkennt die DNA-Sequenz 5`-AGTCATGTG-3`, die auch "M-Box" genannt wird. Bisher sind sechs Isoformen bekannt: MITF-A-D, MITF-H und MITF-M. MITF-M ist spezifisch in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert. In Melanozyten und weiteren Zellen, die aus der Neuralleiste stammen, wird MITF als Hauptgen für die Entwicklung der pigmentbildenden und wenig weiterer Zelltypen gesehen. Mäuse ohne MITF Expression besitzen keine Melanozyten mehr. Ferner gilt MITF als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Protein Expression des Melanoms. Im Verlauf der Entwicklung wird die Expression von MITF-M durch verschiedene Transkriptionsfaktoren (Sox10, Pax3, CREB, LEF-1) reguliert (Tachibana, 2000). Durch LEF-1 ist MITF auch mit dem Wnt/beta-Catenin-Signalweg verknüpft, speziell mit Wnt3alpha und Wnt5alpha. Diese Faktoren spielen alle eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der Melanozyten (Widlund und Fisher, 2003). Zielgene von MITF sind Tyrosinase TRP1, TRP2 (tyrosinase related proteins 1 / 2) und DCT (dopachrome tautomerase), die alle an der Melaninsynthese beteiligt sind.

STAT (signal transducers and activators of transcription) Proteine fungieren als Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren. Im Zellkern binden sie an die Konsensussequenz 5'-TTCNNGAA-3'. Als Signalmoleküle werden sie durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert, wenn die Proteintyrosinkinase 2 und die Januskinase (JAK) aktiviert sind. Resistenzen im malignen Melanom gegenüber Interleukin-6 (IL-6) und Interferon-alpha entstehen anscheinend durch einen defekten JAK-STAT Signalweg. Weitere Studien besagen, dass STAT3 im malignen Melanom konstitutiv aktiv ist (Niu et al., 2002).

Für meine Arbeit von besonderer Bedeutung ist der Transkriptionsfaktor **NFkappaB** (nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells). NFkappaB wurde zuerst als konstitutiver Transkriptionsfaktor an einer charakteristischen DNA Region, dem Immunglobulin-kappa-Ketten Enhancer, in reifen B-Lymphozyten der Maus beschrieben (Edbrooke et al., 1989). Die weiteren Analysen ergaben, dass NFkappaB sowohl in vielen immunologisch kompetenten Zellen, als auch in Keratinozyten, Neuronen, ja fast allen Körperzellen durch unterschiedliche Stimuli reguliert wird und dadurch äußerst schnell zahlreiche Gene aktiviert werden können. Die Stimuli, die NFkappaB aktivieren, reichen von physikalischem Stress (z.B. UV-Strahlung) über infektiöse Agentien (wie Viren, Bakterien, Parasiten und ihre Produkte) bis hin zu biochemischen Reizen und zellulären Botenstoffen wie den Zytokinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren (Baeuerle und Henkel, 1994). Der Vielfalt an Stimuli, die NFkappaB aktivieren können, steht eine nicht minder große Anzahl an Genen gegenüber, die durch NFkappaB reguliert werden. Diese noch nicht abgeschlossene Reihe reicht von Interleukin (IL), Tumornekrosefaktor (TNF), Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) über Proteine wie alpha1-acid-Glykoprotein bis hin zu den T-Zellrezeptoren. NFkappaB Zielgene gehören in verschiedene funktionelle Kategorien: Immun- und Entzündungsreaktionen, Anti-Apoptose und Zellproliferation (Karin et al., 2002).

In seiner aktiven Form liegt NFkappaB beim Mensch als Homo- oder Heterodimer vor. Die Untereinheiten zeichnen sich durch die sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD) aus, eine ca. 300 Aminosäuren lange Region. Innerhalb dieser Domäne befindet sich die DNA-Bindestelle, das Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie die Dimerisierungsregion und die Transkription modulierende Region. Bisher sind fünf Mitglieder der NFkappaB/Rel-Familie bekannt: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52 und p105/p50. Am häufigsten ist NFkappaB aus den Untereinheiten p50/p65 zusammengesetzt. RelA, RelB und c-Rel werden direkt synthetisiert. Den heutigen Vorstellungen nach wird p52 als 100kDa Vorläuferprotein synthetisiert, das anschließend in eine 52kDa schwere transkriptionell aktive Form prozessiert wird. P50

kann entweder auch auf diese Art generiert werden, indem das Vorläuferprotein p105 am C-Terminus, welches Ankyrin-Wiederholungen besitzt, signalabhängig degradiert wird, bis ein 50kDa schweres p50 Molekül entstanden ist. Der C-Terminus wird dabei zunächst phosphoryliert und dann durch ubiquitin-abhängige Proteolyse degradiert. Die andere Möglichkeit der p50 Prozessierung liegt für die Zelle in einem kotranslationalen signalunabhängigen Prozeß, in dem abhängig von der Faltung einer glyzinreichen Region des *nfkb1*-Genproduktes p105 oder p50 gebildet wird. p100 und p105 haben eher inhibitorische Funktion.

NFkappaB bindet an verschiedene Erkennungsmotive der DNA, entsprechend der DNA-Konsensussequenz 5`-GGGRNNYYCC-3` (R=Purin, Y=Pyrimidin) (Janssen-Heininger et al., 2000). Konsensussequenz bedeutet hierbei, dass NFkappaB mit unterschiedlich hoher Affinität auch von dieser Konsensussequenz gering abweichende DNA-Sequenzen binden kann.

An der Kernlokalisierungssequenz (NLS) können die Untereinheiten der IkappaB Familie binden. Damit ist das NLS Signal maskiert und die NFkappaB Untereinheiten können nicht in den Zellkern translozieren. Neben IkappaB alpha, IkappaB beta, IkappaB gamma, IkappaB epsilon und Bcl-3 können auch p100 und p105 inhibitorisch auf NFkappaB einwirken. IkappaB alpha kann NFkappaB auch aus dem Zellkern exportieren.

IKK alpha, IKK beta (I-kappaB-Kinase) und IKK gamma (NEMO=NFkappaB essential modulator) regulieren die IkappaB Untereinheiten, wenn sie durch Zytokine oder bakterielle Infektion stimuliert werden. IKK alpha und IKK beta besitzen eine N-terminale Domäne mit Kinaseaktivität, die spezifische Serine (IkappaB alpha: Serin 32 und 36; IkappaB beta: Serin 19 und 23) von IkappaB Untereinheiten phosphoryliert. Dieses ist die Voraussetzung für Ubiquitinierung und anschließender Degradation der IkappaB Untereinheiten (siehe Abbildung 3).

Durch LymphotoxinB (LT-beta) oder BAFF (B cell survival factor) wird spezifisch IKK alpha aktiviert, welches p100 phosphoryliert, dass an RelB komplexiert ist. Durch die Phosphorylierung und anschließende Ubiquitinierung wird p100 soweit degradiert, bis seine p52 Form vorliegt. Der Heterodimer RelB/p52 kann dann in den Zellkern translozieren und befindet sich in transkriptionell aktiver Form. Genauso gelangen auch die anderen Hetero- oder Homodimere von NFkappaB in den Zellkern, wenn die IkappaB Untereinheiten degradiert werden (Karin et al., 2002). Weitere vermittelnde Moleküle in dieser Signalkaskade sind ebenfalls bekannt. Vor IKK werden die sogenannten NIK Kinase (NFkappaB inducing kinase), MEK Kinasen (MAP Kinasen Kinasen) oder AKT Kinasen aktiviert.

Im malignen Melanom ist NFkappaB konstitutiv aktiv (Dhawan und Richmond, 2002). Vor allem die Expression der Chemokine CXCL1, CXCL8 werden im malignen Melanom für die hohe Aktivität von IKK verantwortlich gemacht, wodurch Heterodimere aus p65/p50 besonders stark in den Zellkern translozieren können (Yang und Richmond, 2001). Auch die Kinase NIK und die gesamte Signalkaskade der MAP Kinasen (ERK1/ERK2, p42/p44, extracellular signal-regulated protein kinase) ist im Melanom sehr aktiv, was zur Aktivierung von NFkappaB und zur Tumorgenese führt. Mittlerweile sind unzählige Faktoren bekannt, die die transkriptionelle Aktivität von NFkappaB beeinflussen können. Die Abbildung 3 fasst in der Hinsicht nur einige an der NFkappaB Aktivierung beteiligte Moleküle schematisch zusammen.

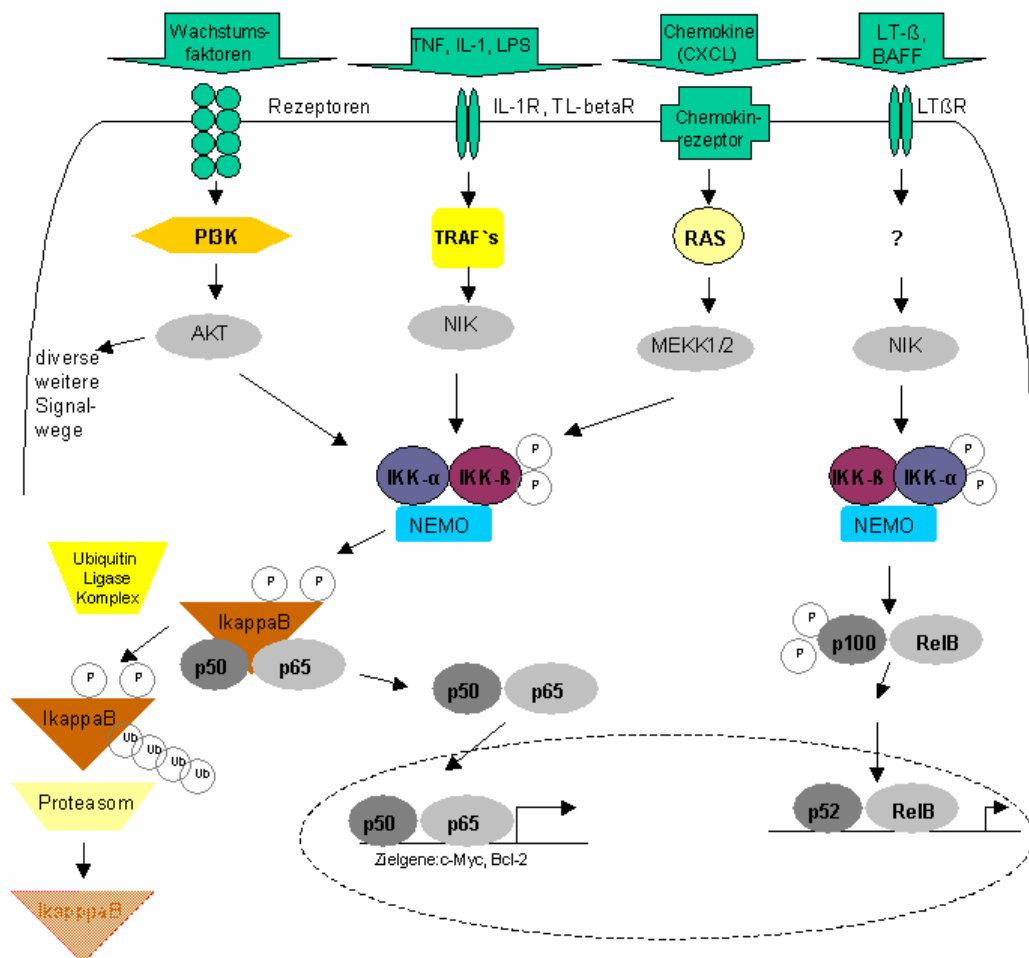


Abbildung 3: Schematische Darstellung des NFkappaB Signalweges. Dargestellt ist die Regulation in Abhängigkeit von diversen Stimuli. Dadurch werden verschiedene Proteinkinasen wie AKT, MAP Kinase Kinasen (MEKK1/2) oder NIK (NFkappaB inducing kinase) aktiviert. Diese Aktivierung führt zur Phosphorylierung (P) von IκappaB, welches an die Untereinheiten p50/p65 von NFkappaB bindet. Anschließend erfolgt die Ubiquitinierung (Ub) von IκappaB durch TrCP und der proteosomale Abbau von IκappaB. Nach der Degradation von IκappaB können die Untereinheiten von NFkappaB ebenfalls an verschiedensten Aminosäuren phosphoryliert werden und werden dadurch aktiviert. Nach ihrer Translokation in den Zellkern, binden p50/p65 an die DNA-Konsensussequenz und aktivieren Gene, die mit Immunantworten, Entzündungen und Ant-Apoptose in Verbindung gebracht werden. Ebenfalls dargestellt ist der im Text beschriebene Signalweg über RelB und p52. Die Abbildung ist verändert nach Poser und Bosserhoff, 2004.

1.2.3 Matrixdegradation zur Förderung der Invasion des malignen Melanoms

Wenn die Tumordicke des Melanoms eine Tiefe von 0,75mm übersteigt, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass Melanomzellen metastasieren, da sie beginnen den abgrenzenden Bereich der Basalmembran zu überschreiten. Für die Metastasierung des Melanoms, d.h. die Ablösung einzelner Melanomzellen vom Primärtumor, Migration dieser Zellen durch die Basalmembran, Blut- und Lymphgefäße bis hin zur Bildung von Fernmetastasen in Lunge, Leber und Gehirn, ist ein komplexes Zusammenspiel von Melanomzellen, extrazellulärer Matrix (ECM) und den tumorumgebenden Bindegewebszellen notwendig. Eine wichtige Rolle für den Tumor übernehmen proteolytische Enzyme, wie Aspartyl-, Cystein-, Serin- und Matrixmetalloproteinasen. Weitere Gruppen von Matrix degradierenden Proteinen sind BMP (bone morphogenetic proteins)-Typ-1 Metalloproteinasen und Heparanasen. Diese werden von Melanomzellen selbst oder durch ortsständige Fibroblasten des peritumoralen Bindegewebes gebildet und verbleiben membranständig oder werden sezerniert. Matrix-degradierende Enzyme sind an zahlreichen physiologischen Prozessen wie Embryogenese und Wundheilung sowie pathologischen Prozessen, u.a. Tumorzellinvasion und Angiogenese beteiligt (Hofmann et al., 2000b).

Von den Cysteinproteinasen sind insbesondere Cathepsin B und L beim Abbau von ECM beteiligt. Sie werden als Proenzyme synthetisiert und nachfolgend zu ihrer aktiven Form prozessiert. In der aktiven Form bauen sie fibrilläres Kollagen Typ I und II, Aggrekane sowie Kollagen IX und XI ab. Cathepsin L ermöglicht zusätzlich den Abbau intakter Basalmembranstrukturen, wodurch diese als physiologische Barriere von Tumorzellen durchbrochen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression und Aktivität von **Cathepsin D**, einer Aspartylproteinase, und **Cathepsin B, H** sowie **L**, dabei handelt es sich um Cysteinproteinasen, mit dem fortschreitenden Krankheitsverlauf des Melanoms kontinuierlich ansteigt (Frohlich et al., 1995).

Zu den Serinproteinasen gehören neben Plasmin und Thrombin das Plasminogenaktivierungssystem mit dem Urokinasetyp (**uPA**) und dem Gewebetyp (tissuetyp=**tPA**) Plasminogenaktivatoren. tPA wird von Endothelzellen, Fibroblasten und Tumorzellen sezerniert (Andreasen et al., 1997). Es bindet sowohl an Laminin, Fibronectin, Thrombospondin als auch an der Zelloberfläche von Endothelzellen. uPA wird auf der Zelloberfläche von Fibroblasten, Makrophagen und Tumorzellen präsentiert. Über die Bindung von uPA an den uPA-Rezeptor, der in der Zellmembran verankert ist, kommt es zur Aktivierung der Serinprotease Plasminogen zu Plasmin,

welches eine breite Substratspezifität aufweist. Es spaltet eine Vielzahl von Matrix-assoziierten Glykoproteinen wie Aggrecan, Fibronectin, Typ-IV-Kollagen, Laminin, Fibrin und aktiviert einige Pro-Metalloproteinasen. Untersuchungen an humanen Melanomzelllinien zeigten, dass der Abbau der ECM in aggressiv wachsenden Zelllinien durch uPA vermittelt wird, wohingegen dieser in weniger aggressiven Zelllinien tPA kontrolliert ist. Auch das Metastasierungsverhalten *in vivo* stimmt mit diesen *in vitro* Daten überein (Quax et al., 1991). Neben den Plasminogenaktivatoren uPA und tPA waren in fortgeschrittenen Melanomen und Metastasen zusätzlich spezifische Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 sowie der uPA-Rezeptor (uPAR) nachweisbar. Ein Ungleichgewicht in der Expression der Proteinase und ihrer spezifischen Inhibitoren ist für die Aggressivität der Tumorzellen entscheidend (de Vries et al., 1994). Die Bindung von Plasmin(ogen) und uPA an der Zelloberfläche reguliert auch die Aktivität der Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9. Außerdem stimulieren uPA und Plasmin das Tumorwachstum, weil sie die Wachstumsfaktoren SF/HGF, bFGF und TGF-beta proteolytisch aktivieren.

Die Familie der Matrixmetalloproteinasen umfasst derzeit ca. 20 Mitglieder, die in fünf Untergruppen unterteilt werden können. Die 1. Gruppe besteht aus 3 interstitiellen Kollagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13), die überwiegend fibrilläres Kollagen abbauen. Der 2. Gruppe gehören die Gelatinasen MMP-2 (GelatinaseA) und MMP-9 (GelatinaseB), die besonders Kollagen, Gelatin und Elastin der Basalmembran abbauen, an. Von allen bisher bekannten MMP besitzen die zur 3. Gruppe zählenden Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11) das vielfältigste Substratspektrum. Die 4. Gruppe beinhaltet die membranständigen Proteinase (MT1-MMP/MMP-14, MT2-MMP/MMP-15, MT3-MMP/MMP-16, MT4-MMP/MMP-17, MT5-MMP/MMP-24, MT6-MMP/MMP-25), die aufgrund ihrer transmembranen Domäne auf der Zelloberfläche lokalisiert sind und ebenfalls eine Reihe von Proteinen der ECM abbauen können (d'Ortho et al., 1997). Die 5. Gruppe umfasst weitere MMP, die sich keiner der oben genannten Gruppen zuordnen lassen. Zu diesen gehören u.a. MMP-19, MMP-23 und MMP-20. Die Matrixmetalloproteinasen und ihre spezifischen Inhibitoren (TIMP) haben eine wichtige Rolle bei der Progression von Tumorzellen. **MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13 und MT1-MMP** werden von Melanomzellen hauptsächlich exprimiert (Hofmann et al., 2000b). MMP-2 und MT1-MMP positive Tumorzellen fanden sich überwiegend im Bereich der Tumorinvasionsfront, was auf eine zellvermittelte, direkte Proteolyse schließen lässt. Auch die Induktion von MMP-1 korreliert mit der Progression von Melanomen (Wandel et al., 2000). Zu bemerken ist, dass UV-B-Strahlen eine erhöhte Expression von MMP-1, MMP-3 und MMP-9 in humanen Fibroblasten zur Folge hat (Fisher et al., 1999).

Heparansulfat-Proteoglykane sind Makromoleküle, die Barrierefunktion besitzen. So ist dieses Proteoglykan auch am Aufbau der Basalmembran, den Blutgefäßen und der Befestigung von vielen Molekülen an der Zelloberfläche beteiligt. **Heparanase** baut diese Makromoleküle vor allem aus metastasierenden Zellen proteolytisch ab, was zur Zerstörung der Gewebeintegrität führt und den Zellen die Metastasierung erleichtert. Neben Prostatakarzinomen, Pankreaskarzinom, Kolon- und Mammakarzinom exprimiert auch das maligne Melanom Heparanasen (Hulett et al., 1999).

Die wichtigsten proteolytischen Enzyme des Melanoms und ihre Inhibitoren sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Enzyme	kDa	Ursprung	Inhibitoren
<i>Aspartylproteinasen</i>			
CathepsinD	52/34 ^a	Melanomzellen, Makrophagen Fibroblasten	Pepstatin
<i>Cysteinproteinasen</i>			
CathepsinB	25	Melanomzellen, Endothelzellen, Fibroblasten	Cystatin
CathepsinL	24		Cystatin
CathepsinH	24		Cystatin
<i>Serinproteinasen</i>			
Plasmin	94	Fibroblasten, Endothelzellen	Aprotinin
tPA	70	Chondrozyten, Endothel- Melanomzellen	PAI-1, PAI-2
uPA	55	Chondrozyten, Fibroblasten Melanomzellen	PAI-1; PAI-2 PN-1
<i>Metalloproteinasen</i>			
MMP-1	52/43 ^a	Fibroblasten, Melanomzellen Chondrozyten	TIMPs
GelatinaseA (MMP-2)	72/62 ^a	Fibroblasten, Melanomzellen Chondrozyten, Leukozyten, Makrophagen	TIMPs
GelatinaseB (MMP-9)	92/86 ^a	Fibroblasten, Melanomzellen Chondrozyten, Makrophagen	TIMPs
Kollagenase3 (MMP-13)	52/42 ^a	Fibroblasten, Melanomzellen Chondrozyten	TIMPs
MT1-MMP	66/54 ^a	Fibroblasten, Leukozyten Melanomzellen	

Tabelle 2: Darstellung der wichtigsten proteolytischen Enzyme und Proteinaseinhibitoren des malignen Melanoms. ^akDa der aktivierten Proteinasen. (TIMP, *tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase*; PAI, Plasminogenaktivatorinhibitor; PN, Proteasen Nexin). Tabelle verändert nach Hofmann et al., 2000.

1.2.4 Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade im malignen Melanom

Der MAP Kinase Signalweg ist im malignen Melanom und bei der Differenzierung von Melanozyten ausgiebig analysiert worden. Vor allen Dingen der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg ist eine der wichtigsten Signalkaskaden im malignen Melanom (Peyssonnaud und Eychene, 2001). Er verknüpft alle in den vorherigen Kapiteln erwähnten Vorgänge. Dabei werden Wachstum, Zellzyklus, Differenzierung, Überleben, Apoptose, Zelladhäsion und Matrixdegradation über den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg reguliert.

Extrazelluläre Signale führen zu einer Änderung der Aktivität der Moleküle der Ras Familie (N-Ras, K-Ras, H-Ras) von einem inaktiven GDP gebundenen-, in einen aktiven GTP gebundenen Zustand. Aktivierte Ras Moleküle vermitteln Signale in das Innere der Zelle, indem die Phosphorylierungen an Serin oder Threonin von Raf übertragen werden (Mizutani et al., 2001). Raf existiert in drei Isoformen: A-Raf, B-Raf und C-Raf. Ist der Signalweg einmal aktiviert erfolgt die Phosphorylierung von MEK1 und MEK2. Die in der Signalkaskade folgenden Moleküle gehören zu der Familie der Mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAP Kinasen). Tyrosin und Threonin von ERK1 MAP Kinase und ERK2 MAP Kinase (p42/p44, extracellular signal-regulated protein kinase) werden im Folgenden phosphoryliert. Die ERK Moleküle können weitere zytoplasmatische Moleküle phosphorylieren oder translozieren in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren wie c-Fos oder Elk-1 aktivieren. ERK1 Kinase und ERK2 Kinase sind im malignen Melanom konstitutiv aktiv.

Mutationen im *Ras*-Gen werden im Melanom zu 9-15% gefunden, wohingegen Mutationen im *B-Raf*-Gen mit bis zu 80% weitaus häufiger vorkommen. Die häufigste Mutation führt im Protein zum Einfügen von Glutamat an Stelle von Valin (V599E) in der Kinase-Domäne von B-Raf (Zhang und Guan, 2000). Konstitutiv aktives V599E B-Raf führt zu einer Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges um das 12-fache. Aber nicht nur die Mutation im *B-Raf* Gen führt zu einem gesteigerten Wachstum der Melanomzellen, sondern auch die autokrinen Effekte der Wachstumsfaktoren, vermittelt durch Ras/Raf/MEK/ERK, sorgen für die Proliferation der Tumorzellen (siehe Kapitel 1.2.1).

Auch in Melanozyten wird das Wachstum und die Differenzierung der Zellen durch die Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade reguliert. Allerdings sind hierbei andere Effektormoleküle, wie die Transkriptionsfaktoren CREB und MITF betroffen. Es sei auch erwähnt, dass in Melanozyten keine ERK Aktivität zu detektieren ist, wenn die Zellen sich nicht gerade unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren wie bFGF oder

HGF befinden. Der Beweis, dass die B-Raf Mutation in benignen Nävi wirklich zu einem Prozeß der Malignität führt, ist allerdings noch nicht erbracht worden.

Dennoch wird die Expression und Aktivität von Matrixmetalloproteinasen und der Urokinase (uPA) durch MAP Kinasen kontrolliert (siehe Kapitel.1.2.3). Die Expression von MMP-1 kann von der MAP Kinase p38 oder ERK1/ERK2 reguliert sein. Die MMP-2 und MMP-9 Expression ist an eine gesteigerte Invasion der Melanomzellen geknüpft und wird durch JNK, p38 oder ERK1/ERK2 gesteuert. Die genauen Zusammenhänge zwischen der jeweiligen MAPKinase und der MMP Regulation müssen jedoch noch weiter untersucht werden.

Es gibt weitere Forschungsergebnisse, dass auch die Integrine durch MAP Kinasen beeinflusst werden und MAP Kinasen an der Weiterleitung von Integrinsignalen beteiligt sind. Insbesondere beta3 Integrine werden durch Ras/Raf/MEK/ERK in ihrer Expression beeinflusst. Weitere Zelladhäsionsmoleküle sind die in Kapitel 1.2.5 erwähnten Cadherine. Die Regulation der E-Cadherin Expression im malignen Melanom kann u.a. auch durch autokrine Sekretion von HGF (hepatocyte growth factor) gehemmt sein (Kapitel 1.2.1). HGF leitet Signale über ERK und PI3 Kinase weiter, was zum Verlust der Zelladhäsion führt. Die Beteiligung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges an der Regulation vieler Moleküle, die während der Melanom Entstehung und Metastasierung wichtig sind, ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

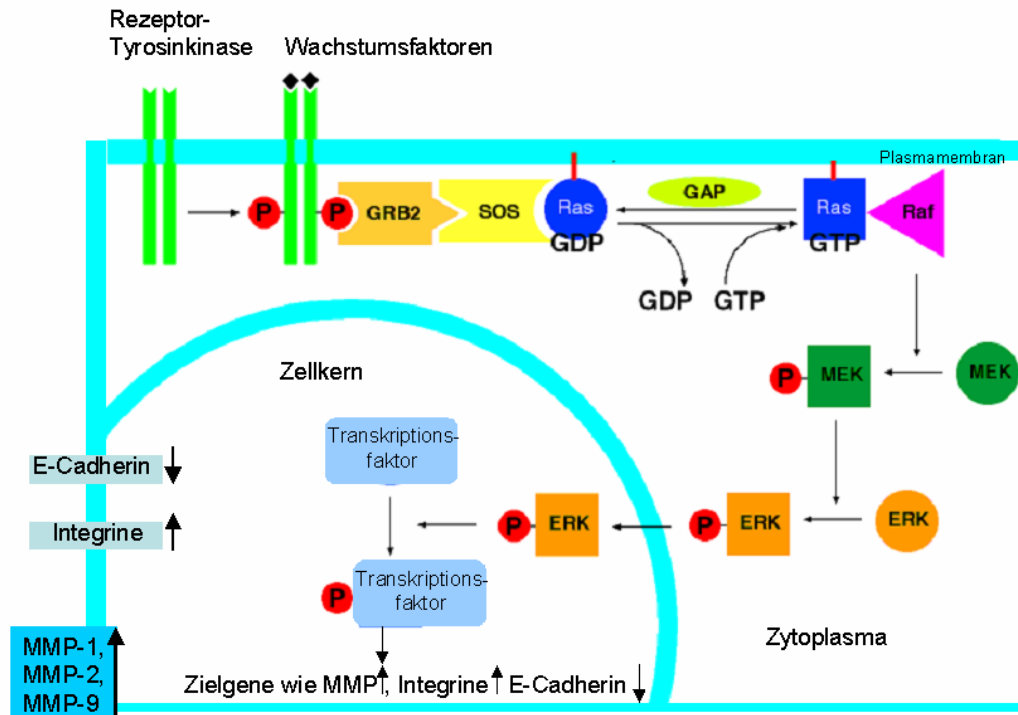


Abbildung 4: 1: Äußere Signale induzieren den Rezeptor, was zur Dimerisierung der Rezeptortyrosinkinase und zu der Autophosphorylierung von Tyrosinen des Rezeptors führt. Diese Phosphotyrosine fungieren als Anheftungsstellen für den Komplex aus den Signalmolekülen GRB2 und SOS, der das G-Protein Ras stimuliert. Ras-Guanindiphosphat (Ras-GDP) wird zu Ras-Guanintriphosphat (Ras-GTP) aktiviert. Das bewirkt eine Konformationsveränderung von Ras. Ras wird es dadurch möglich an Raf-1 zu binden und rekrutiert dieses aus dem Zytoplasma an die Zellmembran. An der Zellmembran werden Raf-1 Dimere aktiviert. Diese Aktivierung besteht aus einem komplexen, mehrschrittigen Prozess, an dem die Proteinphosphatase 2A (PP2A), PAK (p21-activated kinase), Src Kinase und weitere Kinasen beteiligt sind. Ras-GTP wird dabei zu Ras-GDP. Aktiviertes Raf-1 phosphoryliert und aktiviert MEK, MEK phosphoryliert ERK. ERK hat Zielmoleküle im Zytoplasma, kann im Zellkern aber auch, durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die Regulation weiterer Zielgene übernehmen. MMPs, Integrin- und E-Cadherin Expression werden durch diesen Signalweg reguliert. Mutiertes Raf ist nicht an ein aktives Ras-GTP gebunden, sondern agiert allein. Abbildung verändert nach www.oregonstate.edu.

1.2.5 Moleküle der Zelladhäsion des malignen Melanoms

Epitheliale Zellverbände grenzen eine Vielzahl von Organen und Geweben gegen die äußere Umgebung ab. Die geordnete Struktur epithelialer Gewebe beruht zum einen auf sehr engen Kontaktstellen zwischen zwei Epithelzellen unter Aneinanderlagerung der beiden Membranen und zum anderen auf adhärenente Verbindungen (adherens junctions), die sich zwischen zwei Epithelzellen oder einer Epithelzelle und der extrazellulären Matrix ausbilden. Dabei stellen adhärenente Oberflächenmoleküle einen Kontakt zwischen Aktinfilamenten in der Zelle und der spezifischen Oberfläche oder der Membran einer anderen Zelle her. Sie bestimmen ferner die Gewebs- und Organarchitektur multizellulärer Organismen. Außerdem regulieren

Zelladhäsionsmoleküle die dynamischen Prozesse der Morphogenese im Verlauf der Embryonalentwicklung, der Regeneration von Organen und den generellen Ablauf des Zellverhaltens (Wagener *et al.*, 1999).

1.2.5.1 Integrine

An adhärenen Kontaktstellen zwischen Epithelzellen und extrazellulärer Matrix sind Integrine wichtige Zellmembranrezeptoren. Während der Tumorzellausbreitung ist die Adhäsion durch Integrine an umliegende Strukturen ein entscheidender Schritt. Integrine sind Heterodimere, in denen eine alpha- und eine beta-Kette nicht kovalent miteinander assoziiert sind. Erst diese Verbindung ergibt einen funktionsfähigen Transmembranrezeptor. Bisher wurden 18 unterschiedliche alpha- und 8 unterschiedliche beta-Untereinheiten identifiziert (Seftor *et al.*, 1999). Erkannt werden kurze Peptidsequenzen in den Matrixproteinen, wie z.B. ein Tripeptid aus Arg-Gly-Asp (die sogenannte RGD-Sequenz), welche in Fibronectin, Vitronectin usw. vorkommen. Integrine sind multifunktionell, d.h. sie regulieren nicht nur die Adhäsion an Substrate der ECM, sondern ermöglichen auch die Expression von Genen und die Unterdrückung von Apoptose. In fokalen Adhäsionskontakten interagieren Integrine mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts über Bindung an Talin, Vinkulin, Tensin und alpha-Aktinin und darüber mit Elementen der Signaltransduktion, wie z.B. Tyrosinkinase der src-Familie oder FAK (focal adhesion kinases). Die Phosphorylierung von FAK ist wichtig, um die Funktion von Adhäsion und Migration zu gewährleisten und um Integrinsignale an die Kinasen Ras/Raf/MEK/ERK weiter zu leiten (Eliceiri *et al.*, 2002; Liotta und Kohn, 2001; Stupack *et al.*, 2000).

Integrine wie **alpha2 beta1**, das die Bindung an Typ-I und -II Kollagen, den Hauptbestandteilen des Bindegewebes, und **alpha3 beta1**, **alpha6 beta1** sowie **alpha7 beta1**, die die Bindung an Laminin, Typ-IV-Kollagen, den Hauptbestandteilen der Basalmembran, medieren, haben bei der Migration und Invasion von Melanomzellen eine wichtige Bedeutung (Friedl *et al.*, 1998). Die verstärkte Expression von **alpha4 beta1** ist ein interessantes Phänomen, da dieses Integrin nicht nur die Bindung an Fibronectin, sondern auch an VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) vermittelt. VCAM-1 wird von Interleukin-1 stimulierten Endothelzellen exprimiert. Diese Wechselwirkung könnte die Interaktion von Melanomzellen mit Endothelzellen stimulieren und so die Extravasation der Melanomzellen aus den Blutgefäßen fördern (Rice und Bevilacqua, 1989). Dem Vitronectinrezeptor **alphaV beta3** kommt ebenso eine zentrale Bedeutung bei der Melanomentstehung zu. Weder in dysplastischen Nävi

noch in Primärtumoren ist α V β 3 zu finden, dagegen exprimieren VGP Melanome und metastasierende Melanome dieses Integrin (Albelda et al., 1990). Neben der Matrixanheftung kann das Integrin α v β 3 aktive MMP-2 an der Zelloberfläche von invadierenden Melanomzellen und angiogenetischen Blutgefäßen binden (Hofmann et al., 2000a). Durch diesen über Adhäsionsrezeptoren vermittelten Mechanismus existiert eine weitere Zell-Matrix-Interaktion, die den gezielten Abbau der ECM begünstigt.

Diese Kolo­kalisierung trifft auch für andere MMP's und Adhäsionsfaktoren, z.B. dem Hyaluronsäurerezeptor CD44 und MMP-9 zu. CD44, welches in Melanomzellen in seiner Expression unverändert bleibt, ist sogar in der Lage in Melanomzellen die Expression von MMP-9 zu induzieren (Asai et al., 1999; Takahashi et al., 1999).

Weitere wichtige Integri­ne des Melanoms, die entweder stark hochreguliert sein können oder schwach exprimiert werden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Integrin	Synonym	ECM Liganden	Regulation
α 1 β 1	VLA-1, CD49a/CD29	Kollagen (I,II,IV), Laminin	+
α 2 β 1	VLA-2, GPIa-IIa ECMRII CD49b/CD29	Kollagen (I ;II,IV), Laminin Chondroadherin, α 3 β 1	+
α 3 β 1	VLA-3, VCA-2 ECMRI CD49c/CD29	Kollagen (I), Laminin, Thrombospondin Fibronectin, Epiligrin Nidogen/Entactin α 2 β 1	++
α 4 β 1	VLA-4, LPAM-2 CD49d/CD29	Fibronectin VCAM-1	++
α 5 β 1	VLA-5, FNR GPIc-IIA ECMRVI CD49e/CD29	Fibronectin Fibrin L1-CAM	+
α 6 β 1	VLA-6, EA-I CD49f/CD29	Laminin Merosin, Kalinin	--
α 7 β 1	VLA-7, CD29	Laminin	+
α IIb β 3	GPIIb-IIIa CD41/CD61	Fibrinogen, Fibronectin Von Willebrand's factor, Vitronectin	
α V β 3	VNR CD51/CD61	Vitronectin, Fibronectin, Laminin, Thrombospondin Tenascin, Del-1, MMP2, bFGF, Osteopontin Nicht-fibrilläres Kollagen Denaturiertes Kollagen von Willebrand's factor Thrombin, Fibrinogen, α IIb	
α V β 5	CD51	Vitronectin, Del-1 Osteopontin	--

Tabelle 3: Mit der Melanomprogression assoziierte Integri­ne. (++: stark hochreguliert; +: mäßig hochreguliert; -: vermindert exprimiert. Tabelle verändert nach Kuphal et al., 2004, im Druck.

1.2.5.2 Immunoglobulin Familie

Mitglieder der Immunoglobulin (Ig) Familie wie Mel-CAM/MUC18 (melanocytic cell adhesion molecule; CD146) und ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1) stellen eine weitere wichtige Gruppe an Oberflächenmolekülen dar, die im Gegensatz zu Integrinen und Cadherinen, eine Kationen unabhängige Zelladhäsion ermöglichen. Ihre Expression ist während der Melanomentstehung bei 80% der Melanome hochreguliert und geht mit der Trennung von Nävuszellen und Keratinozyten und dem Übergang von der radialen Wachstumsphase in die vertikale Wachstumsphase einher (Bogenrieder und Herlyn, 2003). Mit Hilfe dieser Moleküle können sich Zellen zu Gruppen zusammen schließen. Sie ermöglichen aber auch durch Interaktion ihres zyttoplasmatischen Teils mit Kinasen eine direkte Zellkommunikation und Regulation von Wachstum und Differenzierung. Mel-CAM/MUC18 agiert auch als Korezeptor für die N-Cadherin abhängige Ausbildung von "gap junctions". Wichtige Adhäsionsmoleküle, die an der Melanomprogression beteiligt sind, sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

Adhäsionsmoleküle während der Melanomprogression

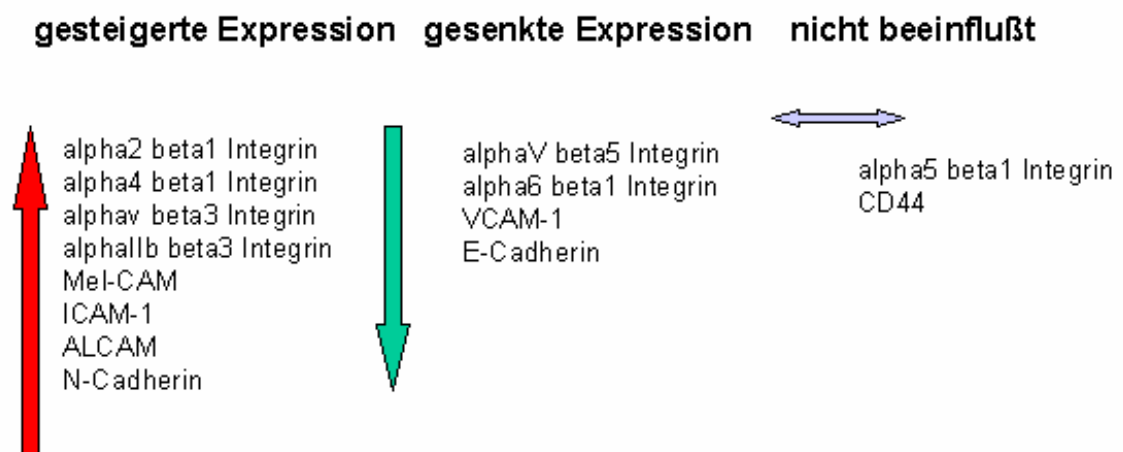


Abbildung 5: Regulation wichtiger Adhäsionsmoleküle, die bei der Entstehung des Melanoms entweder verstärkt oder vermindert exprimiert werden. Verändert nach www.upenn.edu/herlyn/homeostasis.htm

1.2.5.3 Cadherine

In der menschlichen Epidermis existiert eine geordnete Struktur des Gewebes durch Ausbildung spezifischer Adhäsion zwischen zwei Zelltypen. Es besteht eine Balance zwischen Keratinozyten und Melanozyten, die mit Hilfe verschiedener Membranmoleküle aufrecht erhalten wird.

Ein wichtiges Beispiel einer Zellmembranmolekül-Gruppe, die für die Adhäsion zwischen Zellen sorgt, ist die Superfamilie der Cadherine. Die Cadherin Superfamilie besteht für Invertebraten und Vertebraten mittlerweile aus mehr als 100 Mitgliedern (Nollet et al., 2000). Diese Superfamilie wird in fünf verschiedene Unterfamilien gruppiert: (1) klassische Cadherine (Typ 1), die in adhärennten Verbindungen lokalisiert sind, dazu zählen E-, N-, P- und R-Cadherine. (2) Dieser Gruppe sehr ähnlich sind die klassischen Cadherine des Types 2, die VE-, K- und H-Cadherine beinhaltet. (3) Desmosomale Cadherine formen desmosomale Verbindungen, dazu gehören Desmocollin und Desmoglein. (4) Protocadherine sind vor allen Dingen an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt (5) und es existieren Cadherin-verwandte Proteine, die die Zellmembran sieben mal passieren, wie das Protein Flamingo. Außerdem gibt es Cadherine, die keiner Unterfamilie exakt zugeordnet werden können, wie Fat und Dachous. (Nollet et al., 2000; Peinado et al., 2004). Generell ist die Struktur der Cadherin-Superfamilie sehr konserviert, lediglich die extrazelluläre Domäne setzt sich bei den Unterfamilien aus einer unterschiedlichen Anzahl Cadherindomänen zusammen (Takeichi, 1995).

Erwähnt sei an dieser Stelle das VE-Cadherin. Mary Hendrix und Mitarbeiter konnten zeigen, dass aggressive Melanomzellen endothelassozierte Gene exprimieren und endothelähnliche Funktionen ausüben können, um dreidimensionale Kanäle aus Laminin zu formen, die einen Flüssigkeitsstrom ermöglichen. Diese Eigenschaft bezeichnet man als "*vasculogenic mimicry*". Es bedeutet genauer, dass Krebszellen ihre Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sichern können, indem *de novo* gefäßartige Netzwerke aufgebaut werden, obwohl keine Endothelzellen oder Fibroblasten an dem Ort vorhanden sind. VE-Cadherin ist in aggressiven Melanomen besonders an dieser vaskulären Nachahmung beteiligt (Maniotis et al., 1999).

Cadherine der Embryogenese			
Name	typische Expressionsmuster	zelluläre Lokalisation	Funktion/Inaktivierung
<i>klassische Cadherine</i>			
E-Cadherin	Epithelien	Adherens Junction	lethal im Blastozystenstadium
N-Cadherin	Neuronen, Herz, Skelettmuskel, Linse	Adherens Junction, Synapse	embryonal lethal (Herzdefekte)
P-Cadherin	Plazenta, Epidermis	Adherens Junction	anormale Entwicklung der Brustdrüse
VE-Cadherin	Endothelzellen	Adherens Junction	embryonal lethal, Apoptose der Endothelzellen
R-Cadherin	Nerven		
<i>nicht-klassische Cadherine</i>			
desmosomale Cadherine	Haut	Desmosomen	Hautablösung, Hyperproliferation, abnorme Differenzierung
Typ-II Cadherine	ZNS, div. Organe	Synapsen	
Protocadherine			frühe Embryonalentwicklung von Xenopus und Zebrafisch
Flamingo-Cadherine	Epithelien		planare Zellpolarität
FAT	Epithelien		vergrößerte Imaginalscheiben, Tumorbildung

Tabelle 4: Aufstellung wichtiger Cadherine der embryonalen Entwicklung.

1.3 Das membranständige Molekül E-Cadherin in der Haut

Die menschliche Haut ist ein komplexes Organ, bestehend aus den zwei Zellschichten Epidermis und Dermis, die durch die Basalmembran voneinander getrennt werden. Die Dermis setzt sich aus mesenchymalen Komponenten, wie den Fibroblasten zusammen. Außerdem befinden sich in der Dermis die Endothelzellen der Blutgefäße, Nervenzellen und Strukturen der Matrix, die die Rigidität und die Dicke der Haut bestimmen. In der Epidermis befinden sich die Melanozyten auf der Basalmembran verteilt und von Keratinozyten umgeben. Mit dendritischen Ausläufern erreichen die Melanozyten die oberen Schichten der Epidermis, wohin sie Melanosome

transportieren, die synthetisiertes Melanin enthalten. So erreicht ein Melanozyt ca. 35 Keratinozyten mit seinen Dendriten, um diese mit dem Melaninpigment vor ultravioletter Strahlung zu schützen. Unter normalen physiologischen Umständen liegen die Melanozyten in einem Verhältnis von 1:5-1:8 zu den Keratinozyten vor (Li und Herlyn, 2000).

Verschiedene Studien konnten zeigen, daß Keratinozyten durch die Wechselwirkung mit Melanozyten einen Einfluß auf Proliferation und Lokalisation der Melanozyten ausüben, sowie auf die Ausbildung der 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 der Epidermis besonders wichtig. Es sorgt für die Aufrechterhaltung der geordneten Struktur des Gewebes. Es handelt sich um ein 120 kDa transmembranes Glykoprotein, das die Adhäsion durch Kalziumbindung aufrecht erhält und als epithelialer Marker von gesunden Melanozyten gilt. Melanozyten sind neuroektodermalen Ursprungs und wandern während der embryonalen Entwicklung von der Neuralleiste in die Epidermis der Haut ein. Dort knüpfen sie über E-Cadherin wichtige Kontakte zu den Keratinozyten (Silye et al., 1998). E-Cadherin wird im Verlauf der Embryonalentwicklung bereits im Blastomer-Stadium exprimiert und findet sich im weiteren Verlauf in allen Epithelien. Die Abwesenheit von E-Cadherin ist mit dem Leben nicht vereinbar, so sterben beispielsweise Embryonen von Knock-out-Mäusen im Stadium der Blastozyste ab (Larue et al., 1994; Marrs und Nelson, 1996).

Strukturell besteht E-Cadherin aus einer extrazellulären Domäne, die sich aus fünf homologen Einheiten zusammensetzt (EC1-EC5). Die extrazellulären Domänen der aggregierenden Cadherin Moleküle sind durch Kalzium aneinander gebunden, und so wird die Konformation des Moleküls und die Zelladhäsion stabilisiert. Jede Einheit von EC1-EC-5 besteht aus 110 Aminosäuren. Die extrazelluläre Domäne EC1 (N-terminal) spielt über eine Schlüsselrolle bei der homophilen Erkennung von zwei Cadherin Molekülen. Blashchuk *et al.* vermuteten, dass die Aminosäuresequenz His-Ala-Val, die am C-Terminus der Untereinheit EC1 des Moleküls lokalisiert ist, für die spezifische Erkennung zweier E-Cadherin Moleküle eine bedeutende Rolle spielt. His-Ala-Val ist eine spezifische Aminosäurenabfolge, die bei den klassischen Cadherinen, wie E- (epithelial), N- (neural), P- (placental), VE- (vascular endothelial) und R- (retinal) Cadherin homolog ist (Wheelock und Johnson, 2003). Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass extrazelluläre Cadherin Bausteine sich parallel aneinander lagern und Dimere bilden. Der genaue Ablauf der Dimerisierung ist bisher wenig verstanden.

N-Cadherin Dimere werden wahrscheinlich durch hydrophobe Interaktionen (Shapiro et al., 1995) und E-Cadherin Dimere durch Kalziumionen (Nagar et al., 1996) aufrecht gehalten. Wie bereits erwähnt stellt E-Cadherin eine homophile Interaktion mit einem weiteren E-Cadherin Molekül einer anderen Zelle her. Während der Kokultur verschiedener Zelltypen aggregieren zunächst die Zellen, die identische Cadherine in ihrer Zellmembran tragen (Nose et al., 1988).

Der intrazelluläre Teil der Cadherine ist über Catenine mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Beta-Catenin bindet direkt an den zytoplasmatischen Teil von E-Cadherin und zeigt starke Homologie (ca. 80%) zu dem Genprodukt Armadillo in *Drosophila melanogaster*. Alpha-Catenin stellt schließlich über beta-Catenin die Verbindung von E-Cadherin zum Zytoskelett her. Alpha-Catenin (102 kDa) ist strukturell mit Vinculin verwandt, einem Molekül, welches für die Bindung des Aktinzytoskeletts an Strukturen der inneren Plasmamembran von Bedeutung ist. Man weiß, dass gamma-Catenin ebenfalls starke Homologie zu Armadillo und beta-Catenin besitzt. Gamma-Catenin wurde zuerst in Desmosomen lokalisiert und Plakoglobin genannt, ehe die eindeutige Struktur des gamma-Catenin ermittelt wurde. Es kann die Position von beta-Catenin im Cadherin-Catenin Komplex substituieren, wobei die physiologische Rolle von gamma-Catenin bisher noch unbekannt ist (Hulsken et al., 1994; Sanders et al., 1999). Weitere zytoplasmatische Proteine, die an Cadherine binden, sind Tyrosinphosphatasen und p120, welches regulatorische Funktion besitzt (Reynolds et al., 1994; Shibamoto et al., 1995; Staddon et al., 1995).

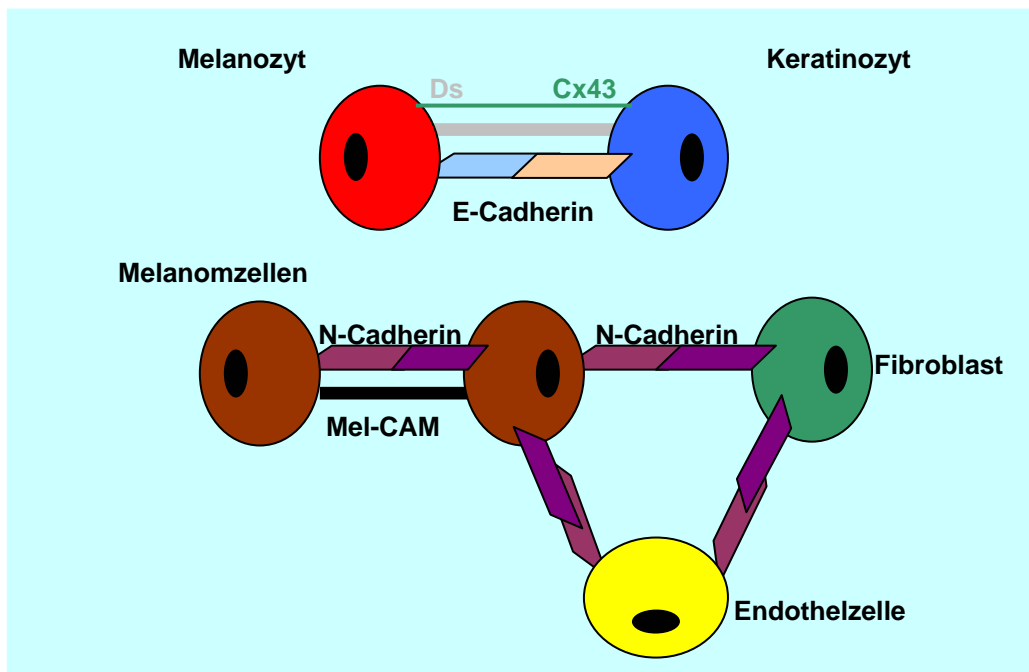


Abbildung 6: Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen der Epidermis und Dermis. Dargestellt sind die wichtigsten Adhäsionsmoleküle. Ds, Desmoglein; Cx43, Connexin. Verändert nach Li et al., 2003.

1.3.1 Verlust von E-Cadherin im malignen Melanom

Zelladhäsionsmoleküle sind nicht nur an Modifikationen der Zell-Zell Interaktion während der Embryonalentwicklung beteiligt, sondern auch an allen Schritten der malignen Progression. Durch Verlust und Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen geht die geordnete Gewebestruktur verloren, wodurch sich Zellen aus dem Gewebeverband lösen können (Behrens, 1999; Handschuh et al., 1999). Dieser Prozeß wird auch epitheliale mesenchymale Transition (EMT) genannt.

Eine Modifikation im Bereich der Zelladhäsion schließt zum Beispiel den Verlust des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin ein, welches bereits durch die Untersuchung vieler Tumorarten (Kolon-, Mamma- und Prostatakarzinom) publiziert worden ist. Auch für den Hautkrebs konnte in immunhistochemischen Studien gezeigt werden, dass E-Cadherin im Melanomgewebe, verglichen mit Melanozyten und benignen Nävi signifikant vermindert bzw. völlig verloren gegangen ist (Sanders et al., 1999; Silye et al., 1998). In der Epidermis der Haut dient E-Cadherin der Interaktion zwischen Keratinozyten und Keratinozyten bzw. Keratinozyten und Melanozyten (siehe Abbildung 6). Durch den Verlust der E-Cadherin Expression geht ein regulierender Einfluß der Keratinozyten verloren und die veränderten Melanozyten beginnen unkontrolliert zu wachsen (Hsu et al., 1996; Poser et al., 2001; Silye et al., 1998). Wird eine Reexpression von E-Cadherin in Melanomzellen, z. B. durch Transfektion eines E-Cadherin Expressionsplasmids initiiert, so wird die Tumorentwicklung *in vivo* gestoppt und die Melanomzellen kehren zu einem normalen melanozytären Phänotyp zurück (Hsu et al., 2000a). Diese Beobachtungen und Daten, die aus anderen Modellsystemen erhoben wurden, führten zu der Bezeichnung von E-Cadherin als Tumorsuppressor (Birchmeier und Behrens, 1994).

Zusätzlich zu dem Verlust von E-Cadherin, findet bei der Melanomentwicklung die Neuexpression von N-Cadherin statt, die das Adhäsionsverhalten der Melanomzellen verändert. Die Melanomzellen befinden sich durch den Verlust der E-Cadherin Expression und der nun vorhandenen N-Cadherin Expression in einem destabilisiertem Zell-Zell Verband zu den umgebenden Keratinozyten und werden invasiver und mobiler, wodurch sie sich von ihrem Primärtumor lösen. Dieser Cadherin "switch" führt zu einem neuen Bindungsvermögen der Zellen an Fibroblasten des Stromas, Endothelzellen und weiteren Zelltypen der Dermis, die ebenfalls N-Cadherin an ihrer Zelloberfläche tragen (siehe auch Abbildung 5) (Li et al., 2001).

Zudem sorgt N-Cadherin auch für Aktivierung von antiapoptotischen Signalen, wie der Aktivierung von Akt/PKB und ermöglicht den Tumorzellen so eine Vermeidung der

Apoptose durch Inhibition des proapoptotischen Moleküls Bad (Sanders et al., 1999). Die Inhibition der Zelladhäsion durch einen monoklonalen Antikörper gegen den extrazellulären Teil von N-Cadherin führt in Experimenten zu einem Stop der endothelialen Migration von Melanomzellen, weil die Zelladhäsion zwischen dem N-Cadherin der Melanomzellen und dem der Endothelzellen unterbunden wird.

Letztendlich ermöglicht die differenzierte Ausbildung von E- und N-Cadherinen die Metastasierung von Melanomzellen hauptsächlich in Lunge, Leber, Gehirn und Haut.

1.3.2 Der transkriptionelle Repressor Snail verhindert die E-Cadherin Expression im malignen Melanom

Snail, das erste Mitglied der Snail Familie wurde 1987 in *Drosophila melanogaster* gefunden, wo es bei der Bildung des Mesoderms eine Rolle spielt. Weitere Snail Homologe wurden beginnend bei Nematoden wie *Caenorhabditis elegans*, Anneliden, Mollusken, und Amphibien auch bei der Maus, dem Huhn und dem Menschen gefunden. Snail ist neben der Mesodermbildung auch an der Entwicklung der Neuralleiste beteiligt. Die Homologen der Snail-Familie z.B. Slug, Scratch, Smug, Escargot, Wormiu und Ces1, sind Transkriptionsfaktoren mit 4-6 Zinkfingermotiven im konservierten C-Terminus. Die DNA-Bindungsstelle, bestehend aus den sechs Basenpaaren 5'-CANNTG-3', wird durch die Mitglieder der Snail-Familie identifiziert und ist auch die klassische Konsensus-Bindesequenz für *basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren (Nieto, 2002). Diese sogenannte E-Box Sequenz ist zweimal auch im Promotorbereich des E-Cadherin Gens, nah am Transkriptionsstart, vorhanden. Ihre Bedeutung bei der Repression der Promotoraktivität konnte bereits bei verschiedenen Tumorarten (Prostatakarzinom und Brustkrebs) nachgewiesen werden. Auch im malignen Melanom verhindert der transkriptionelle Repressor Snail die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin. Melanomzelllinien weisen eine erhöhte Snail Expression im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) auf (Poser et al., 2001).

1.4 Beteiligung von Cadherinen an Zelladhäsion, Signaltransduktion und Genexpression

Zellen erhalten Informationen aus ihrer Umgebung und modulieren daher ihr Verhalten während der Embryogenese und während des Zusammenspiels verschiedenster Zellen von Organen. Die zelluläre Kommunikation über spezifische Signale in Form von chemischen Botenstoffen machen das Leben überhaupt erst möglich. Aber auch während abnormaler Prozesse, wie der Tumorentstehung spielt die Signalübertragung eine wichtige Rolle. Die Zellen kommen mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder anderen löslichen Signalmolekülen in Kontakt, die um sie herum zirkulieren, und haben diese Signale zu verarbeiten. Desweiteren werden Signalkaskaden aktiviert, wenn Zellen direkt miteinander in Kontakt stehen oder Kontakt zur extrazellulären Matrix haben. Cadherinen wurde zunächst lediglich eine statische Rolle während der stabilen Aufrechterhaltung der Zell-Zell Adhäsion zugesprochen. Aber Cadherine sind ebenso an dynamischen morphogenetischen Prozessen beteiligt. Daher haben diese Moleküle nicht nur ihre Aufgabe in der Adhäsion, sondern fungieren ebenso als Signalmoleküle.

1.4.1 beta-Catenin/Wnt Signalweg und E-Cadherin Zelladhäsion

Die Signal- oder Adhäsionsfunktionen des 92kDa großen Proteins beta-Catenin werden in der Zelle durch E-Cadherin reguliert. Dieser Signalweg hat seine besondere Funktion während der Entwicklung von Vertebraten und Invertebraten. Das intrazellulär an der Zytoplasmamembran an E-Cadherin gebundene beta-Catenin vollzieht zusammen mit alpha-Catenin die Zelladhäsion. Ungebundenes beta-Catenin wird in unstimulierten, "normalen" Zellen degradiert. Ist in diesem Fall der Wnt Signalweg nicht aktiv, wird beta-Catenin durch den Axin/APC-Komplex gebunden und durch eine Serin/Threonin Casein Kinase (CKI) und GSK3beta phosphoryliert und anschließend durch einen TrCP-Komplex (beta-transducin repeat- containing proteins) ubiquitiniert und für den 26S Proteosomen Komplex vorbereitet.

Beta-Catenin translokiert in den Zellkern, wenn der Wnt Signalweg in der Zelle aktiviert ist. Durch das stabilisierte beta-Catenin im Zellkern werden Signale von beta-Catenin initiiert, die zur Transkription von Genen des Zellwachstums und der Differenzierung führen. In diesem Signalweg formt beta-Catenin im Zellkern ein Heterodimer mit LEF (lymphoid enhancer binding factor)/TCF (T-cell factor)/ Transkriptionsfaktoren und wirkt als Koaktivator (siehe auch Kapitel 1.2.2). Durch Wnt Signale wird das

zytoplasmatische und nukleäre beta-Catenin stabilisiert, indem das Axin eines Degradationskomplexes mit dem sogenannten Dishevelled Protein interagiert und weitere Proteine (APC und GSK3beta) das beta-Catenin nicht mehr dem Proteasomenkomplex zugänglich machen können.

Die Schlüsselfunktion von E-Cadherin liegt in der Regulation des Wnt Signalweges, denn das an E-Cadherin gebundene beta-Catenin übernimmt eine Funktion in der Zelladhäsion und gelangt nicht mehr in den Zellkern. Ursprünglich wurde angenommen, dass E-Cadherin und LEF/TCF um beta-Catenin konkurrieren (Fagotto et al., 1996; Simcha et al., 2001). Nach neuen Erkenntnissen bindet vor allem ein Dimer aus beta-Catenin und alpha-Catenin an E-Cadherin. Außerdem ist Serin/Threonin phosphoryliertes E-Cadherin eher in der Lage beta-Catenin zu binden. Es ist auch gezeigt worden, dass phosphoryliertes beta-Catenin die Zelladhäsion stabilisiert. Die bisher vereinfachten Beschreibungen des Konkurrenzprinzips von E-Cadherin und LEF/TCF, um beta-Catenin, ohne Berücksichtigung weiterer Moleküleigenschaften und Konformationen der beteiligten Moleküle, wird durch diese Versuchsergebnisse erweitert (Gottardi und Gumbiner, 2004). Die Bindungskapazität von E-Cadherin an beta-Catenin während des aktiven Wnt Signales ist vor allem während der embryonalen Entwicklung wichtig, damit eine Zell-Zell Adhäsion überhaupt bestehen bleiben kann. So wird es möglich, Zelladhäsion und Zellsignale unabhängig voneinander zu regulieren. Während der Tumorentstehung ist die Regulation des Signalweges durch E-Cadherin gestört. Durch den Verlust von E-Cadherin kann vermehrt "freies" beta-Catenin vorliegen, dass im Zellkern Zielgene wie c-myc und cyclinD1 aktiviert.

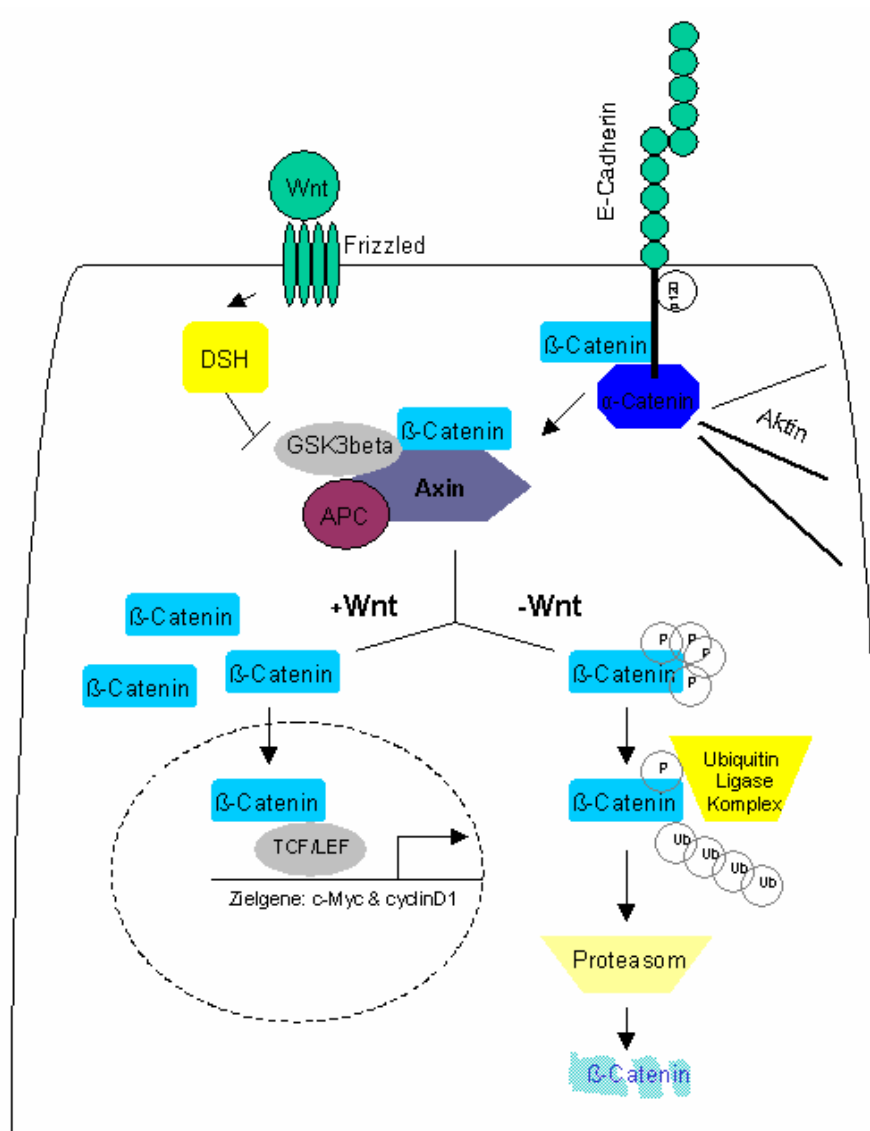


Abbildung 7: Übersicht über den Wnt/beta-Catenin Signalweg. Bei Fehlen des Wnt Signales (-Wnt) bildet beta-Catenin mit APC, GSK3beta und Axin einen Komplex und wird durch GSK3beta phosphoryliert (P). Phosphoryliertes beta-Catenin wird durch den TrCP Ubiquitin Ligase Komplex ubiquitiniert (Ub) und anschließend proteosomal degradiert. Durch diese Vorgänge wird ungebundenes beta-Catenin im Zytoplasma abgebaut. Bindet Wnt an den Rezeptor Frizzled (+Wnt) wird Dishevelled (DSH) aktiviert und der APC, GSK3beta Axin Komplex wird blockiert. Dadurch reichert sich ungebundenes beta-Catenin im Zytoplasma an und translokiert in den Zellkern, wo es als Koaktivator von den Transkriptionsfaktoren LEF/TCF fungiert. Durch die Koaktivierung werden Zielgene wie c-myc oder cyclinD1 transkribiert. Abbildung wurde verändert nach Poser und Bosserhoff, 2004.

Neben der verringerten Adhäsion kann es nach der Destabilisierung des Cadherin-Catenin Komplexes zu einem verstärkten Abbau der Proteine kommen. E-Cadherin besitzt im Bereich der beta-Catenin Bindungsstelle mit den Aminosäuren Prolin, Glutamin, Serin und Threonin (PEST) ein Sequenzmotiv, welches vom Ubiquitin-

Proteasomen Komplex erkannt wird und die Degradation des Proteins veranlasst (Huber et al., 2001).

1.4.2 Rho GTPasen und E-Cadherin Zelladhäsion

Rho GTPasen vermitteln viele Effekte in der Zelle (Evers et al., 2000). Das schließt die Regulation der Zellgröße, Proliferation, Apoptose, Zellpolarität und Zelladhäsion mit ein. Auch diese Proteine sind, wie die Wnt Proteine, an Prozessen der Gastrulation und Embryogenese beteiligt. RhoA, Rac1 und Cdc42 sind die am besten charakterisierten GTPasen. Rho GTPasen vermitteln Signale aus der Zelle zum E-Cadherin Molekül der Nachbarzelle (*inside-out signaling*). Außerdem sind GTPasen für das Weiterleiten von Signalen aus der Umgebung der Zelle, die durch E-Cadherin empfangen wurden, verantwortlich (*outside-in signaling*). Rac1 und Cdc42 GTPasen regulieren die adhäsiven Eigenschaften von E-Cadherin positiv, denn sie verhindern die Interaktionen zwischen IQGAP1 und beta-Catenin (Tabelle 5). IQGAP1 kompetitiert normalerweise mit alpha-Catenin um die Bindung an beta-Catenin. Damit würde IQGAP1 eigentlich eine Adhäsion an das Zytoskelett verhindern, wenn es die Bindungsstelle von alpha-Catenin am beta-Catenin besetzt (Yap und Kovacs, 2003) (siehe auch Abbildung 8).

Speziell RhoC ist nach Studien an der Entwicklung eines metastasierenden Phänotyps in Melanomzellen verantwortlich (Clark et al., 2000). Aber auch RhoA vermindert die adhärente Zelladhäsion durch E-Cadherin.

Außerdem vermitteln die Rho GTPasen Signale, die durch das Onkogen Ras initiiert werden. Allerdings existieren in dieser Hinsicht konträre Ergebnisse über die Vermittlung der Ras Signale. In epithelialen Zellen der Brust führte Ras zur Aktivierung von Rac1 und dieses zur Aufhebung der Zelladhäsion. In epithelialen MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Zellen führte das Ras Signal zu einer Aktivierung der Rac Aktivität und zu einer Stabilisierung der E-Cadherin Zelladhäsion, umgekehrt führte die Blockierung von RhoA und Rac1 in Keratinozyten und MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Zellen zu einer Störung der Zelladhäsion. Viele Ergebnisse zeigten in dieser Hinsicht aber auch, dass Rho GTPasen sehr in Abhängigkeit der Zellumgebung agierten. So kann Rac1 z.B. die Migration von Epithelzellen inhibieren, wenn diese Zellen auf Fibronectin oder Laminin kultiviert wurden. Wuchsen die Zellen jedoch auf Kollagen, dann stimuliert Rac1 die Invasion und Migration der Epithelzellen (Hordijk et al., 1997; Sander et al., 1998). In andere Studien wurde die unterschiedliche Regulation der Zelladhäsion durch Rac1 auf die Menge von aktivem Rac1 in der Zelle geschoben (Cavallaro und Christofori, 2001; Lozano et al., 2003). Bei der Regulation

durch RhoA scheint die Stabilisierung der Zelladhäsion über ein Molekül namens mDia reguliert zu sein. Die Destabilisierung der Zelladhäsion durch RhoA wird jedoch durch ein Molekül namens ROCK vermittelt.

Charakterisierung	RhoA	Rac1 und Cdc42	Literatur
Lokalisierung	zytoplasmatisch	ko-lokalisiert mit Cadherinen an der Zellmembran	(Nakagawa et al., 2001) (Kuroda et al., 1998) (Takaishi et al., 1997)
Einfluß auf Cadherin Aktivität	E-Cadherin Aktivität ist negativ reguliert	E-Cadherin Aktivität ist positiv reguliert	(Takaishi et al., 1997) (Kuroda et al., 1999)
Einfluß durch andere Moleküle	agiert ohne IQPAP1 und beta-Catenin	agieren durch IQGAP1 und beta-Catenin	(Kuroda et al., 1999)
Einfluß auf Zell-Zell Adhäsion	Cadherin Kontakte vermindern die RhoA Aktivität	Cadherin Kontakte steigern die Rac1 und Cdc42 Aktivität	(Nakagawa et al., 2001) (Noren et al., 2003) (Noren et al., 2001)
Beteiligung von p120 Catenin	p120 inaktiviert RhoA	p120 aktiviert Rac1 und Cdc42	(Noren et al., 2000) (Grosheva et al., 2001) (Anastasiadis et al., 2000)

Tabelle 5: Aufstellung der Beteiligung von Rho GTPasen an der Zelladhäsion im Melanom. Rac1 und Cdc42 zeigen eher gleiche Funktionen bei der Cadherin-Zelladhäsion, während RhoA separate Funktionen übernimmt. Tabelle von Wheelock und Johnson, 2003.

1.4.3 Rezeptor Tyrosin Kinasen und Cadherin vermittelte Zelladhäsion

Einige Studien bearbeiten auch den Zusammenhang zwischen Rezeptor Tyrosin Kinasen und Cadherinen, die sich gegenseitig beeinflussen können. So ist gezeigt worden, dass N-Cadherin während des Wachstums von Neuriten für die Dimerisierung des FGF-Rezeptors (fibroblast growth factor receptor) sorgt, und so über diesen Rezeptor Signale weiter geleitet werden, obwohl der Wachstumsfaktor FGF nicht vorhanden ist (Doherty et al., 2000; Williams et al., 2001). Auch das Tumorstadium wird durch N-Cadherin reguliert, indem dieses über den FGF-Rezeptor Signalwirkung erlangt. Die extrazelluläre Domäne 4 des N-Cadherin Moleküls ist für diese Aktivierung des FGF-Rezeptors verantwortlich (Kim et al., 2000).

Der VEGF Rezeptor (vascular endothelial growth factor receptor) wird von endothelialen Zellen exprimiert und kann durch VE-Cadherine beeinflusst werden. VE-Cadherin, beta-Catenin, VEGF und PI3-Kinase bilden einen Komplex mit dem VEGF-Rezeptor, der dann Signale in Form von Phosphorylierungen über ein Adapterprotein namens Shc weiter leitet (Zanetti et al., 2002).

Es wird spekuliert, dass extrazelluläres E-Cadherin einen Komplex mit dem **EGF**-Rezeptor formt, somit die Bindung des EGF-Liganden vermieden wird und folglich die

Signalverarbeitung durch den EGF-Rezeptor unterbunden ist. Bei einer hohen Zelldichte und starker Zelladhäsion verhindert E-Cadherin ein weiteres Wachsen der Zellen, indem es den EGF-Rezeptor inhibiert. Das würde in Tumoren, die einen Verlust der E-Cadherin Expression zeigen, zu einer Aktivierung der Rezeptor Tyrosin Kinase EGFR durch ihren Liganden und einer weiteren Wachstumssteigerung führen (Qian et al., 2004).

In umgekehrter Weise kann die starke Aktivität der Rezeptor Tyrosin Kinasen **EGFR/Neu**, **IGF-1R** und **HGF/c-Met** zu einer Verminderung der E-Cadherin abhängigen Zelladhäsion führen, was in der sogenannten epithelialen zu mesenchymalen Transition der Fall ist (Fujita et al., 2002). HGF/c-Met signalisiert durch Aktivierung von MAPKinasen und Phospho-Inositol3-Kinase (PI3K) in Melanozyten, die hierdurch ihre E-Cadherin Adhäsion verlieren.

Vor kurzem konnte auch gezeigt werden, dass die HGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von E-Cadherin zur Bindung des Moleküls Hakai an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin führt. Hakai katalysiert als E3-Ubiquitin-Ligase die Ubiquitinierung von E-Cadherin und bewirkt somit eine verringerte Halbwertszeit von E-Cadherin (Fujita et al., 2002). Hiermit wurde bewiesen, dass nicht nur die Zelladhäsion durch Tyrosin Kinasen beeinflusst wird, sondern auch die Degradation von E-Cadherin.

Die IGF-1/IGF-R Aktivierung verhindert die Degradation von beta-Catenin durch die Aktivierung der Akt Kinase, die GSK3beta inhibiert (Abbildung 8). Dadurch kann stabiles beta-Catenin vermehrt in den Zellkern translozieren.

Rezeptor Tyrosin Kinasen und E-Cadherin können sich also in bidirektionaler Weise beeinflussen. Generell führt im malignen Melanom die Aktivierung von Tyrosin Kinasen zu einem Verlust der E-Cadherin gesteuerten Zell-Zell-Adhäsion und zu einem Anstieg von ungebundenem beta-Catenin. Die zytoplasmatische Tyrosinkinase Src destabilisiert durch Phosphorylierung ebenfalls den E-Cadherin beta-Catenin Zelladhäsionskomplex.

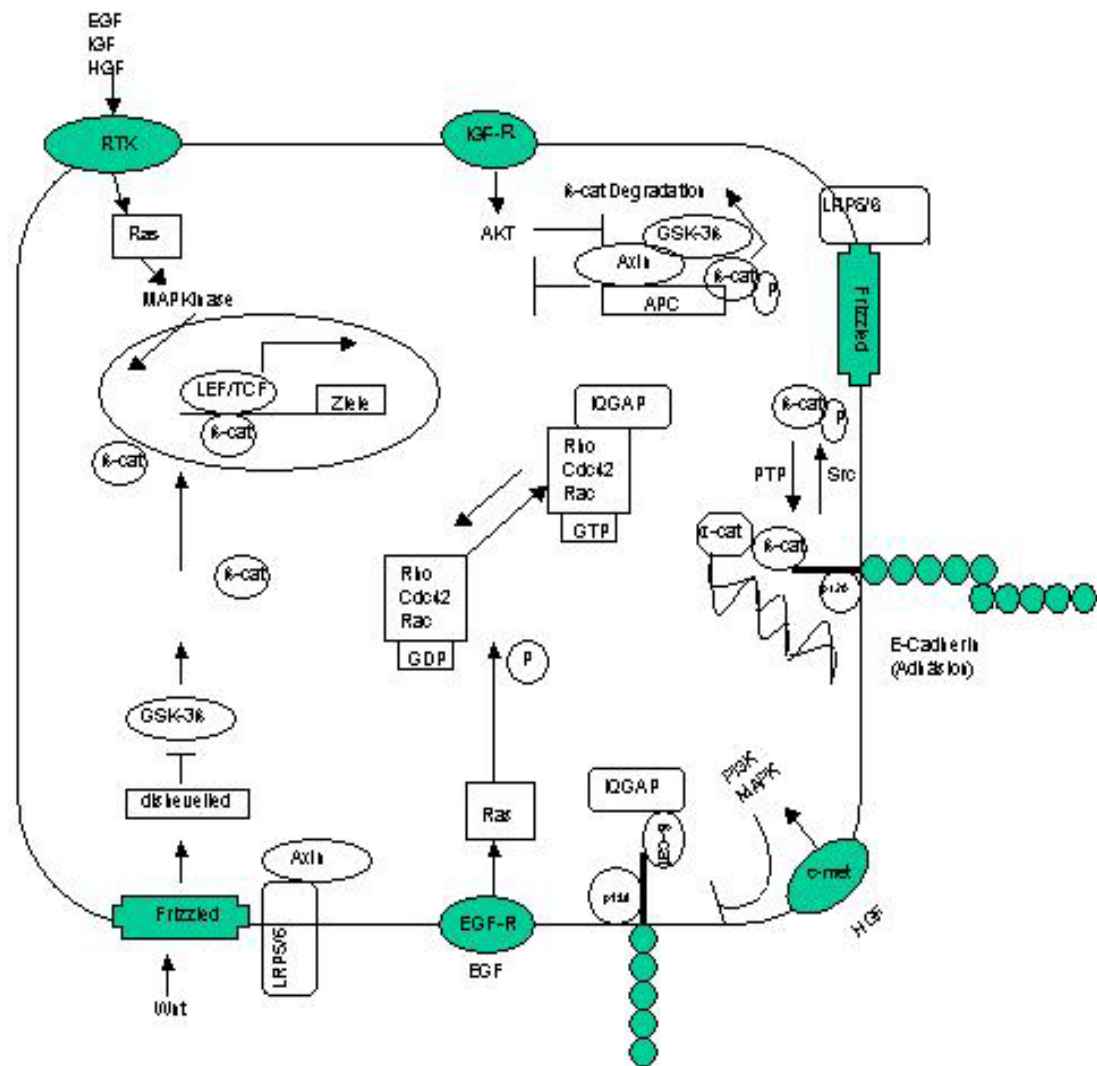


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Interaktion von E-Cadherin Zelladhäsion, Rho GTPasen, Wachstumsfaktoren und beta-Catenin/Wnt Signalwegen. Abbildung verändert nach Hsu et al., 2002.

Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) verhindert Phosphorylierung von beta-Catenin, während Src beta-Catenin phosphoryliert und damit die Zelladhäsion schwächt. Aktiviertes Rho/Cdc42/Rac1 mit GTP stabilisiert Zelladhäsion und inhibiert IQGAP. Aktivierung von Rac1 und Cdc42 kann durch EGF/EGF-R unterstützt werden.

Im Melanom ist EGF-R aber häufig verloren und damit die Zelladhäsion destabilisiert. Inaktiviertes Rho/Cdc42/Rac1 mit GDP destabilisiert Zelladhäsion, weil IQGAP an beta-Catenin bindet. HGF/c-met reduziert die E-Cadherin Zelladhäsion durch PI3K (Phospho-Inositol3-Kinase) und MAPKinase abhängige Signalwege.

Der beta-Catenin/Wnt Signalweg ist in Kapitel 1.4.1 beschrieben. IGF-1/IGF-R Aktivierung verhindert die Degradation von beta-Catenin durch Akt medierte Inhibierung von GSK3beta.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum molekularen Verständnis der Entstehung des malignen Melanoms beim Menschen beizutragen. Die Untersuchung der veränderten Expression des Membranmoleküls E-Cadherin bei der Entstehung des malignen Melanoms, stand dabei im Vordergrund. Die Arbeit kann in dieser Hinsicht in drei Punkte untergliedert werden.

(1) Das sezernierte Molekül MIA (melanoma inhibitory activity) und der Transkriptionsfaktor Snail wurden bezüglich ihrer E-Cadherin Regulation charakterisiert. Es fanden in unserer Arbeitsgruppe in vorherigen Studien bereits Analysen zum MIA Molekül und dem transkriptionellen Repressor Snail statt, auf die sich die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit stützen konnten.

(2) Desweiteren sollte im Rahmen der Arbeit nach weiteren Zielgenen von dem Transkriptionsfaktor Snail gesucht werden, da E-Cadherin bisher das einzige bekannte Zielgen von Snail ist.

(3) Meine weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit bezogen sich auf die molekularbiologischen Folgen, die durch den Verlust der E-Cadherin Expression entstehen. So sollte geklärt werden, welchen Einfluß der E-Cadherin Verlust in Melanomzellen auf die Aktivität verschiedener Signalwege hat. Die Arbeit sollte klären, ob NFkappaB ein Zielmolekül der E-Cadherin Signalkaskade ist, welche vermittelnden zytoplasmatischen Moleküle an der Signalübertragung beteiligt sind, welche Zielgene von dem E-Cadherin Verlust betroffen sind und welche Domäne von E-Cadherin Signalfunktionen übernehmen kann.

3 Eigene Ergebnisse und Diskussion

Der Großteil, der im Rahmen der Promotion erbrachten Daten, konnte bereits publiziert werden. Die durch den Verlust der E-Cadherin Expression veränderte Signaltransduktion im malignen Melanom konnte aufgeklärt werden. Die Melanomzellen zeigten nach E-Cadherin Verlust eine erhöhte Phosphorylierung der MAP Kinase p38 und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkappaB (Kuphal et al., 2004, Anhang I).

Desweiteren wurde publiziert, dass das Protein MIA, neben Snail, die E-Cadherin Expression verhindert (Poser et al., 2004, Anhang II).

Die im Rahmen der Promotion entstandenen Ergebnisse, dass N-Cadherin ein Zielmolekül der durch E-Cadherin Verlust initiierten Signalkaskade ist und der zytoplasmatische Bereich von E-Cadherin für die Regulation der N-Cadherin Expression im malignen Melanom verantwortlich gemacht werden konnte, wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht (Kuphal und Bosserhoff, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang III).

Auch weitere Zielgene des Transkriptionsfaktors Snail konnten im Melanom zum Teil charakterisiert werden. Die Daten wurden ebenfalls bereits zur Veröffentlichung eingereicht (Kuphal *et al.*, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang IV).

Im Folgenden werden die Daten ausführlich dargestellt und diskutiert. Ferner wurden neu gewonnene oder unveröffentlichte Daten in die Diskussion mit einbezogen.

3.1 Etablierung von drei Modellsystemen zur Untersuchung des Verlustes der E-Cadherin Expression

Es ist bereits seit langem bekannt, dass die N-Cadherin Expression im malignen Melanom hochreguliert und die E-Cadherin Expression vermindert ist oder gar ganz verloren geht (siehe Kapitel 1.3.1). Als Grundlage für den Beginn der Arbeit wurde zunächst der N-Cadherin und E-Cadherin Status von neun im Labor vorhandenen Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) untersucht. Die Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho, SK Mel 28 und Mel Juso stammen aus einem Primärmelanom, während die Zelllinien Mel Im, Mel Ju, SK Mel 3 und HTZ19d aus Metastasen des malignen Melanoms generiert wurden. Die Expression des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls N-Cadherin war in allen Melanomzelllinien, im Vergleich zu NHEM, signifikant hochreguliert. Die E-Cadherin Expression ist in den Melanomzelllinien, im Vergleich zu NHEM, jedoch fast vollständig

unterdrückt (Abbildung 9). Für die Untersuchung der E-Cadherin Expression wurden zwei verschiedene NHEM Zellkulturpassagen in die quantitative Echtzeit PCR eingesetzt.

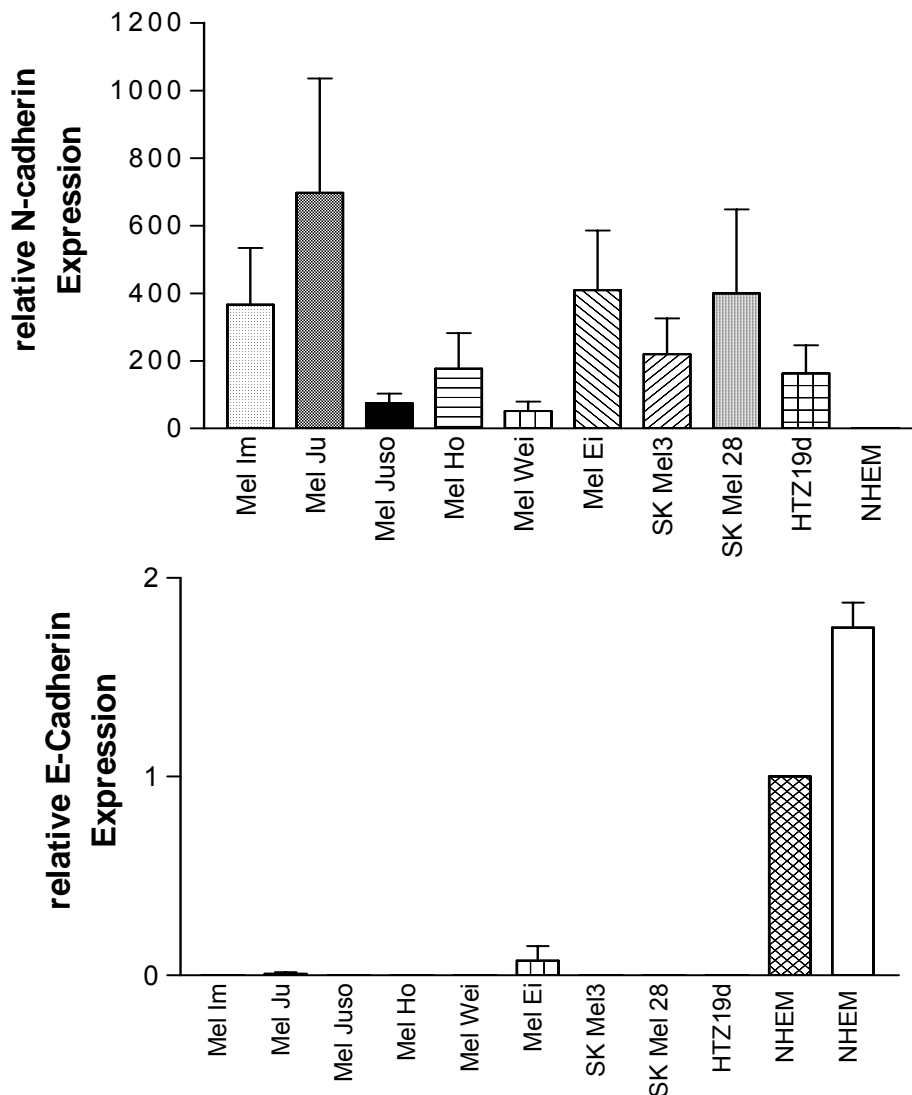


Abbildung 9: Relative Expression von N-Cadherin und E-Cadherin in neun Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM), die bei der Berechnung auf eins gesetzt wurden. Die Ermittlung der Expression erfolgte mittels quantitativer Echtzeit PCR. (Kuphal und Bosserhoff, 2005, zur Veröffentlichung eingereicht).

Wir hätten für einen molekularbiologischen Vergleich von E-Cadherin exprimierenden Zellen mit Melanomzelllinien, die einen E-Cadherin Verlust verzeichnen, eigentlich Melanozyten einsetzen können. Allerdings können die aus Vorhäuten isolierten Primärzellen nicht in großen Mengen, die für umfangreiche Versuche notwendig wären, gewonnen werden. Desweiteren gestaltete es sich schwierig alle Experimente mit den primären Melanozyten durchzuführen, da eine effektive Transfektion der NHEM nicht möglich war.

Daher generierten wir drei Modellsysteme, bei denen Melanomzellen E-Cadherin reexprimierten und verglichen diese Zellen mit den ursprünglichen Melanomzelllinien. Das erste Modellsystem führte zu einer Induktion der E-Cadherin Expression, indem der transkriptionelle E-Cadherin Repressor Snail ausgeschaltet wurde. Bei dem zweiten Modellsystem handelte es sich um die Generierung von transienten Melanomzellklonen, die durch Transfektion eines Expressionsplasmids das vollständige E-Cadherin Molekül exprimieren. Durch stabile Transfektion von zwei verschiedenen Expressionsplasmiden für die Translation des zytoplasmatischen Bereich von E-Cadherin konnte ein drittes Modellsystem für die Untersuchungen am malignen Melanom etabliert werden.

Das erste Modellsystem beinhaltet zwei Zellklone, die durch eine stabile antisense cDNA Transfektion den transkriptionellen Repressor Snail ausgeschaltet haben und wieder E-Cadherin exprimierten. In Kapitel 1.3.1.1 wurde die Funktion des transkriptionellen Repressors Snail im malignen Melanom genauer erklärt: Snail bindet an den E-Cadherin Promotor und ist für den Verlust der E-Cadherin Expression verantwortlich. Die asSNAIL (as, antisense) Zellklone wurden in meiner Arbeitsgruppe bereits teilweise charakterisiert (Poser et al., 2001). Es wurden zwei Zellklone, asSNAIL4 und asSNAIL5 ausgewählt, die eine erhöhte E-Cadherin Reexpression aufwiesen, wie in quantitativer Echtzeit PCR und mit dem Western Blot Verfahren gezeigt werden konnte (Kuphal et al., 2004, Anhang I, Seite 8511). Zwar wurde der physiologische E-Cadherin Status der NHEM nicht erreicht, aber dennoch konnte eine signifikante Erhöhung der E-Cadherin Expression gemessen werden (Abbildung 10).

Im zweiten Modellsystem kam eine direkte Methode zum Einsatz, um E-Cadherin Expression in Melanomzelllinien zu induzieren, indem ein E-Cadherin Expressionsplasmid (pBAT E-Cadherin), welches die vollständige E-Cadherin cDNA enthält, in die Melanomzelllinie Mel Im transient transfiziert wurde (Abbildung 10). Auch hier wurde stets die Expression von E-Cadherin nach transienter Transfektion in quantitativer Echtzeit PCR und im Western Blot überprüft (Kuphal et al., 2004, Anhang I, Seite 8511). Diese Transfektion blieb trotz mehrmaliger Versuche sie zu stabilisieren transient, da die Melanomzellen bei diesem Versuch der E-Cadherin Expression dazu neigten, dass E-Cadherin Expressionsplasmid schnell zu "verlieren". Auch der Selektionsdruck mit Geneticin führte nach kurzer Zeit wieder zu einem Verlust der E-Cadherin Expression. Letztendlich standen daher ein stabiles antisense Snail und ein transientes E-Cadherin System für die Untersuchung der Signalaufgaben von E-Cadherin und Snail zur Verfügung.

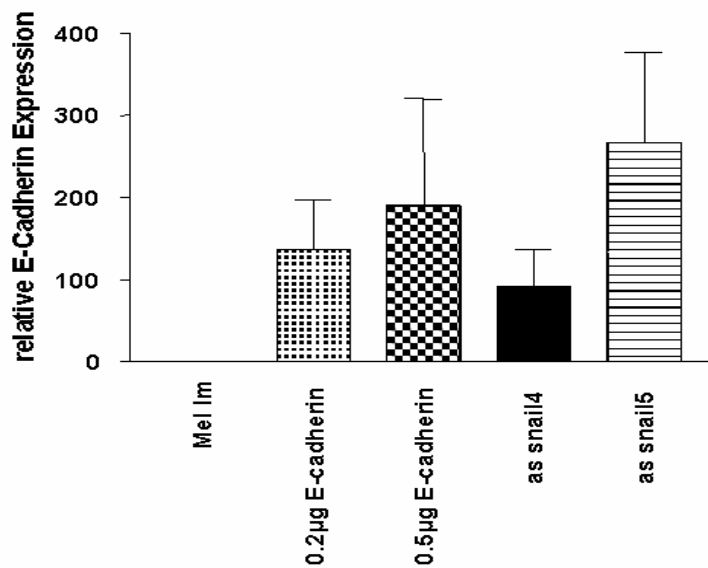


Abbildung 10: Relative Expression von E-Cadherin nach transients Transfektion des Expressionsplasmids von E-Cadherin (in Konzentrationen von 0.2µg und 0.5µg) und nach Ausschalten des transkriptionellen Repressors Snail durch eine antisense Strategie (asSNAIL 4 und asSNAIL 5). Die vier Zellklone standen im Vergleich zu der E-Cadherin Expression in der Ursprungszelllinie Mel Im (auf 1 gesetzt). Die Ermittlung der Expression erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (Kuphal et al., 2004).

Das dritte Modellsystem diente der Untersuchung des zytoplasmatischen Teils von E-Cadherin. Es sollte ermittelt werden, ob der zytoplasmatische Bereich von E-Cadherin ähnliche Signaltransduktionen im Melanom auslöst, wie das vollständige E-Cadherin. Die zwei Plasmidkonstrukte, die jeweils in die Melanomzelllinie Mel Im transfiziert wurden, führten zum Einen zu einer Expression des ungebundenen, sich "frei" im Zytoplasma befindenden, C-terminalen Teil von E-Cadherin [E-Cadherin CD (cytoplasmic domain)]. Das zweite Plasmid führte zu der Expression der vollständigen zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin [E-Cadherin M (membrane anchored domain)], die durch spezielle Modifikationen an die Zytoplasmamembran der Zelle binden konnte (Abbildung 11). Die Plasmidkonstrukte wurden uns, zusammen mit den Kontrollplasmiden freundlicherweise von Margaret J. Wheelock und Keith R. Johnson (Department of Biology, University of Toledo, USA), zur Verfügung gestellt. Um die intrazelluläre Domäne von E-Cadherin nach der Translation lipophil an die Membran zu binden, wurde ein Myristilierungssignal aus dem Vektor "M" (Aronheim et al., 1994) vor die vollständige zytoplasmatische cDNA Sequenz von E-Cadherin kloniert. Das Myristilierungssignal (MGSSKSKPKDPSQR) stammt von dem Molekül Src.

Während der Translation des E-Cadherin M wird das N-terminale Methionin abgespalten, wodurch Glycin das letzte Molekül am N-Terminus wird. Glycin wird durch Anbindung von Myristinsäure modifiziert und wird so lipophil, dass das zyttoplasmatische E-Cadherin in der Zellmembran verankert bleibt (Nieman et al., 1999).

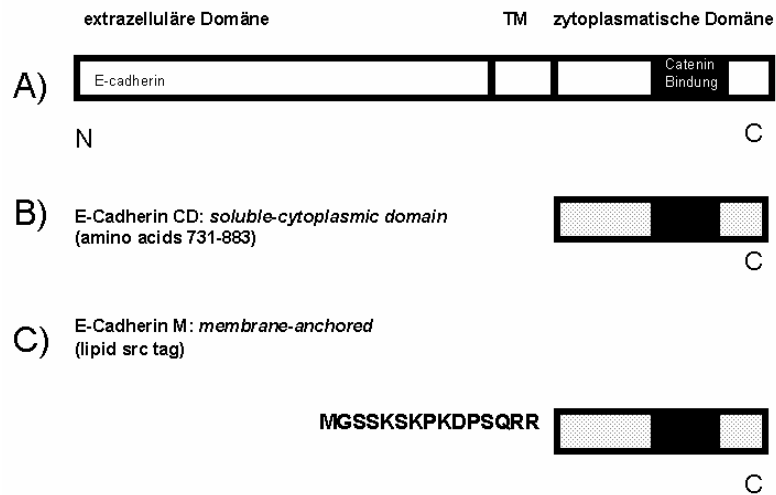


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Expressionsvektorkonstrukte von E-Cadherin. A) Darstellung des gesamten E-Cadherin Proteins. Eingezeichnet sind die beta-Catenin Bindungsstelle (schwarz), die zytoplasmatische und extrazelluläre Domäne und der transmembrane Bereich (TM). B) Der ungebundene zytoplasmatische Bereich von E-Cadherin wird als E-Cadherin "CD" bezeichnet (*soluble cytoplasmic domain*). Das Protein umfasst die Aminosäuren 731-883 vom C-terminalen E-Cadherin. C) E-Cadherin "M" steht für *membrane-anchored* E-Cadherin und hat die lipophile Aminosäuresequenz am N-terminalen Bereich. Auch dieses Protein entspricht den Aminosäuren 731-883 vom C-terminalen E-Cadherin. Die Darstellung ist verändert nach Niemann et al., 1999.

Zunächst wurden stabil transfizierte Mel Im Zellklone generiert, die die jeweiligen zytoplasmatischen Domänen von E-Cadherin exprimierten. Die Expressionen der zytoplasmatischen Domänen wurden durch Western Blots und quantitative Echtzeit PCR überprüft. Nach diesen Experimenten konnten drei Zellklone ausgewählt werden, E-Cadherin-CDc, -CDd, -CDe, die nur den ungebundenen zytoplasmatischen Teil exprimierten. Die Zellklone E-Cadherin-M2, -M3 und -M7 wurden ausgewählt, da sie das an die Zellmembran gebundene E-Cadherin exprimierten. Selbst das Myristilierungssignal dieser drei Zellklone konnte durch quantitative Echtzeit PCR nachgewiesen werden. Außerdem wurde durch serielle Extraktion von Proteinen, die Lokalisation der E-Cadherin Proteindomänen untersucht. Mit dem *ProteoExtract™ Kit* der Firma Calbiochem wurden zytoplasmatische Proteinextrakte von Membran-, Kern- und Zytoskelett- Proteinextrakten getrennt. Der membranverankerte Teil befand sich nach dieser Analyse in der Membran- und zu einem geringeren Teil auch in der Zytoplasmafraktion, und der ungebundene Teil E-Cadherins befand sich nur in der Fraktion der Proteine des Zytoplasmas (Abbildung 12) (Kuphal und Bosserhoff, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang III, Seite 5, Abbildung 3).

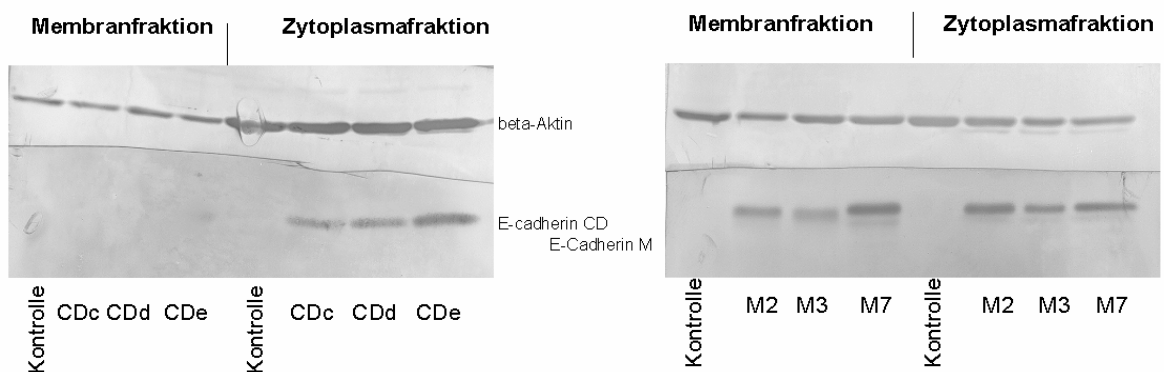


Abbildung 12: Western Blot mit dem Antikörper anti-E-Cadherin, der den zytoplasmatischen Bereich des E-Cadherin detektiert. Der ungebundene zytoplasmatische Bereich von E-Cadherin wird als E-Cadherin "CD" bezeichnet (*soluble cytoplasmic domain*). Diese E-Cadherin CDc, CDd, CDe Zellklone exprimieren E-Cadherin nur in der Zytoplasmafraktion. E-Cadherin "M" steht für *membrane-anchored* E-Cadherin und hat die lipophile Aminosäuresequenz am N-terminalen Bereich. Die E-Cadherin Zellklone E-Cadherin M2, M3, M7 exprimieren zytoplasmatisches und membran-gebundenes E-Cadherin (Kuphal und Bosserhoff, 2005, zur Veröffentlichung eingereicht).

Damit waren zunächst drei Modellsysteme für die Arbeit generiert, die bei der Untersuchung des Einflusses des E-Cadherin Zell-Zell Adhäsionsmoleküls bei der Entstehung des Melanoms helfen sollten.

3.2 E-Cadherin und weitere Zielgene des Transkriptionsfaktors Snail

In meiner Arbeit erfolgte eine Charakterisierung der asSNAIL Zellklone, um den Einfluß des Transkriptionsfaktors Snail auf die Expression diverser Zielgene im Melanom zu untersuchen.

Die Beteiligung von Snail während der Entwicklung eines Embryos sind seit langem bekannt. Das Produkt des *snail*-Gens, welches als Transkriptionsrepressor agiert, ist mit anderen Molekülen wie z.B. Wnt, FGF, Cadherin und BMP (bone morphogenetic protein) an komplexen räumlichen Prozessen, und auch zeitlich streng kontrollierten Zellwanderungen und Zellorganisationen der Embryogenese beteiligt. Speziell während der Gastrulation und der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) der Neuralleistenentwicklung hat Snail besondere Aufgaben, da es die Expression von E-Cadherin unterdrückt. Durch den Verlust von E-Cadherin ändert sich das Adhäsionsverhalten der Zellen, was zu einer Zellwanderung aus dem epithelialen Zellverband führt, damit sich das Mesoderm und daraus die unterschiedlichen Zelltypen des Körpers entwickeln können. Der Verlust der E-Cadherin Expression durch Snail ist also ein Beispiel der Beteiligung beider Moleküle an Prozessen der Embryogenese.

Diese epitheliale-mesenchymale Transition, die durch Snail reguliert wird, findet allerdings nicht nur während der Ausbildung der Körperanlagen statt, sondern hat auch Ähnlichkeiten zu Metastasierungsprozessen während der Tumorentstehung. Es ist bekannt, dass durch die Expression von Snail eine transkriptionelle Inhibierung des **E-Cadherin** Promotors im malignen Melanom erfolgt und somit die E-Cadherin Expression verhindert wird (Poser et al., 2001) (siehe Kapitel 1.3.2). E-Cadherin ist bisher als einziges bekanntes Zielgen von Snail bestimmt worden.

Mithilfe der asSNAIL Zellklone sollte es also möglich sein, noch weitere Zielgene, außer E-Cadherin, zu identifizieren, die bei der EMT während der Entwicklung des malignen Melanoms durch Snail reguliert werden. Die im folgenden beschriebenen Zielgene von Snail haben tatsächlich alle direkt oder indirekt mit wichtigen Prozessen der EMT zu tun, tragen zur Entartung der Melanomzellen bei und fördern die Entstehung von Krebs.

Für die Analyse wurden zwei der oben genannten Modellsysteme verwendet. Das Expressionsmuster der Melanomzellklone Mel Im asSNAIL, die durch stabile Expression von antisense Snail cDNA wieder E-Cadherin exprimierten, wurde mit dem Expressionsmuster der Ursprungszelllinie Mel Im, die kein E-Cadherin exprimierte,

über einen humanen cDNA *Array* (Clontech, *Cancer Array*) verglichen. Der cDNA *Array* mit tumorrelevanten Genen lag zu Beginn meiner Arbeit bereits vor. Die signifikanten Unterschiede des Expressionsmusters wurden jedoch während meiner Arbeit analysiert (Kuphal *et al.*, 2005; zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang IV). Die semiquantitativ im *Array* entdeckten Unterschiede zwischen Mel Im und asSNAIL Mel Im wurden mittels quantitativer Echtzeit PCR validiert.

Zunächst war der Einfluß von Snail auf proteolytische Enzyme auffällig. Die Expression verschiedener Matrixmetalloproteinasen für die Förderung der Metastasenbildung des Melanoms wurde bereits in der Einleitung erwähnt. Die Expression von **MMP-2** (GelatinaseA), ein wichtiges Molekül für die Prozesse in der EMT, aber auch während der Proliferation, Angiogenese, Tumorinvasion und Metastasierung von Krebszellen (Kapitel 1.2.3), wurde in den Zellklonen asSNAIL4 und asSNAIL5 im cDNA *Array* in signifikant verminderter Expressionsstärke detektiert. Diese Ergebnisse konnten in der quantitativen Echtzeit PCR bestätigt werden. Dieses bedeutet im Umkehrschluß, dass Snail im malignen Melanom an der Hochregulation von MMP-2 Expression beteiligt ist. Publierte Daten zeigten bereits, dass in A431 (humane epidermale Karzinomzelllinie) Zellen die MMP-2 Promotor Aktivität durch Snail angeregt wurde. Luciferase-Assays bewiesen in dieser Veröffentlichung, dass die MMP-2 Promotor Region von den Nukleotiden -262 bis -411, relativ zu der transkriptionellen Startsequenz, für die Bindung von Snail verantwortlich ist (Yokoyama *et al.*, 2003). Unsere Daten und die der vorherigen Publikation weisen darauf hin, dass die EMT von Krebszellen nicht nur durch den Verlust eines Moleküls der Zelladhäsion, wie E-Cadherin, reguliert wird, sondern auch durch die Förderung der Expression des proteolytischen Enzyms MMP-2. So gehen die veränderte Zelladhäsion und die Degradation von Matrixmolekülen durch MMP-2 für die Metastasierung des Melanoms Hand in Hand.

Desweiteren in seiner Transkription beeinflusst zeigte sich das Molekül **EMMPRIN** (extracellular matrix metalloproteinase inducer, basigin, CD147), welches ebenfalls zum Matrixmetalloproteinase System gehört. Die Literatur wies bereits darauf hin, dass humane Melanomzellen mit einer erhöhten EMMPRIN Expression, die sich in einer Kokultur mit Fibroblasten befanden, eine Induktion von MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MT1-MMP in den Fibroblasten induzierten und die Melanomzellen invasiver eine künstliche Basalmembran durchdrangen. Ein Antikörper gegen EMMPRIN bewirkte eine Inhibition der MMP Produktion der Fibroblasten und verringerte die Invasionsfähigkeit der Melanomzellen. Die immunhistologischen Daten zeigten eine EMMPRIN Produktion in Melanomzellen und nicht in Fibroblasten (Biswas *et al.*, 1995). Die in der quantitativen Echtzeit PCR detektierte Expression von EMMPRIN war in den asSNAIL Zellklonen, im Vergleich zur Ursprungszelllinie Mel Im, vermindert. Das

bedeutet, dass Melanomzellen durch ihre endogene Expression von Snail eine erhöhte EMMPRIN Expression aufweisen und das wiederum zu einer erhöhten MMP Aktivität führt.

Auch die Transkription von **SPARC** (secreted protein acidic and rich in cysteins, BM40, Osteonectin), das MMP-2 aktivieren kann und für Angiogeneseprozesse verantwortlich gemacht wird, und TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1), waren nach Ausschalten von Snail vermindert.

SPARC wurde in einem cDNA Array einer anderen Arbeitsgruppe bereits als überexprimiert in Melanomzellen gefunden. Die Publikation zeigte auch, dass diese cDNA Daten durch Northern Blots bestätigt werden konnten (Rumpler et al., 2003). Auch weitere Publikationen berichten von einer Expression von SPARC in Melanomzellen (Heenen und Laporte, 2003). SPARC soll z.B. durch das Zinkfinger Protein PLZF (promyelotic leukemia zinc finger) in seiner Expression inhibiert werden (Felicetti et al., 2004). Unsere Daten weisen nun darauf hin, das SPARC Expression in den Melanomzellen offensichtlich durch Snail aktiviert wird.

Die Aktivierung von **TIMP-1** (tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases 1) durch Snail, schien zunächst schwer erklärbar. Da TIMPs Inhibitoren von MMPs sind, hätten wir erwartet, dass die TIMP Expression in den asSNAIL Zellklonen eigentlich hochreguliert ist, um Tumorwachstum zu verhindern. Allerdings ist seit langem bekannt, dass TIMPs multifunktionelle Proteine sind, die auch unabhängig von der MMP Regulation weitere Zellwachstumsfördernde Funktionen haben können. TIMP-1 induziert z.B. das Wachstum von normalen Keratinozyten, Chondrozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Außerdem wird das Wachstum von Brustkrebszellen, Hepatomzellen und Osteosarkomzellen angeregt. TIMP-2 reguliert, ebenso wie TIMP-3 und TIMP-4, spezifisch das Wachstum von weiteren Zelltypen (Lambert et al., 2003). Zum Teil besitzen TIMPs außerdem anti-apoptotische Wirksamkeit und fördern zudem die Invasion (Lambert et al., 2003). Für die Entwicklung von Krebs ist aber vor allem die Balance zwischen TIMP und MMP auf Proteinebene für die Funktion von TIMP verantwortlich (Nagase und Brew, 2003). Eine Unbalance resultiert in der Degradation der Moleküle der extrazellulären Matrix und fördert die Metastasierung. Eventuell ist zum Einen die von uns detektierte Regulation auf transkriptioneller Ebene in den Hintergrund zu stellen und eine Bestimmung der Proteinmenge müsste in den Zellklonen zudem noch erfolgen. Zum Anderen könnte TIMP-1 im Melanom die oben beschriebene Funktion der Zellwachstumsförderung ausüben und daher zur Proliferation und Invasion der Melanomzellen beitragen. Dieses müsste ebenfalls in weiteren Assays noch näher untersucht werden.

Das Plasminogenaktivator System ist ein weiteres Matrix degradierendes System im Melanom, welches in Kapitel 1.2.3 beschrieben wurde. Aus diesem System wurde die Expression von **t-PA** (tissuetype plasminogen activator system) im cDNA *Array* als auffällig bewertet und mit quantitativer Echtzeit PCR validiert. t-PA ermöglicht durch Matrixdegradation den Übergang der Melanomzellen von der radialen Wachstumsphase in die vertikale Wachstumsphase. Die Expression von t-PA war in den asSNAIL Zellklonen, im Vergleich zu der Kontrollzelllinie Mel Im, vermindert. Die Degradation von unterschiedlichen Matrixmolekülen müsste daher in den asSNAIL Zellklonen weiter unterbunden sein, um die Metastasenbildung zu vermeiden. In umgekehrter Weise ist t-PA in den Melanomzellen durch Snail aktivierbar und kann so zu der Degradation von Matrixmolekülen beitragen. Inwieweit Snail t-PA im Melanom reguliert und welche funktionellen Folgen daraus resultieren, muß in weiteren Experimenten bewiesen werden.

Auch die bereits beschriebene Rho GTPase **RhoA** wurde durch Snail reguliert. RhoA Expression war in den asSNAIL Zellklonen in quantitativer Echtzeit PCR vermindert detektiert worden. Im Umkehrschluß ist die RhoA Expression im malignen Melanom durch Snail erhöht. RhoA führt, wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, zu einer Zerstörung der adhärennten Verbindungen von E-Cadherin. Dieses wiederum hat direkt mit EMT Prozessen zu tun, da sich Zellen leichter aus dem epithelialen Verband lösen können, differenzieren und migrieren (Thiery, 2003). Obwohl RhoA und RhoB zu 85% in ihrer Sequenz identisch sind (Anastasiadis et al., 2000), konnte nur für RhoA eine Snail abhängige Regulation gezeigt werden.

Notch Signale regulieren Zellwanderungen während der Embryogenese, Stammzellerneuerungen und Differenzierung verschiedener Zellen des Prostatagewebes. Außerdem vermittelt das Notch System Signale während des Prozesses der EMT. Hierdurch ist auch bekannt, dass Notch Signale häufig in der humanen Krebsentstehung involviert sind, bei der Zellen einen mesenchymalen, mobilen Phänotyp erlangen. Während der *Drosophila melanogaster* Embryonalentwicklung kann Snail als Repressor oder indirekter Aktivator der Notch Signalkaskade gewertet werden. Snail greift dort zum Einen in die Expression von Notch Zielgenen ein, die in ihrer Expression reprimiert werden, zum Anderen wurden durch Snail Notch Signalwege stimuliert (Cowden und Levine, 2002; Morel et al., 2003). Daraufhin sollte untersucht werden, ob im malignen Melanom eine Notch4 Expression in Abhängigkeit von Snail zu finden ist. In unseren Experimenten konnte in den asSNAIL Zellklonen eine um 90% verminderte Notch4 Expression detektiert werden. Das lässt wiederum den Umkehrschluß zu, dass Snail im malignen Melanom für die Hochregulation von Notch4 verantwortlich ist.

Eine andere Publikation zeigte, dass Notch auch in umgekehrter Weise die Expression von Snail regulieren kann. Notch Expression führte bei diesen Analysen zur EMT während der Herzklappengenese, durch Induktion von Snail Expression und im Folgenden zur Reprimierung der E-Cadherin Expression (Grego-Bessa et al., 2004). Ob es in Melanomzellen auch diesen gegenseitigen Regulationsmechanismus von Notch4 und Snail gibt, wurde von uns bisher nicht untersucht.

Alle oben erwähnten Gene wurden in ihrer Expression in quantitativer Echtzeit PCR in den asSNAIL Zellklonen im Vergleich zu der Ursprungszelllinie Mel Im als inhibiert detektiert. Die Gene haben mit der Zellwanderung während der Entwicklung und EMT zu tun. Um den cDNA Array zu verifizieren, wurde die Expression der unregulierten Gene beta3, RhoB und NM23b auch in quantitativer Echtzeit PCR kontrolliert.

Um auszuschließen, dass das reexprimierte E-Cadherin in den asSNAIL Zellklonen einen Einfluß auf die untersuchten Gene besitzt, wurden quantitative Echtzeit PCR's mit Mel Im Zellen durchgeführt, die transient mit E-Cadherin transfiziert wurden. Hierdurch konnte ein Einfluß von E-Cadherin auf die Expression von MMP-2, EMMPRIN, TIMP-1, t-PA und RhoA ausgeschlossen werden. Die Expression von SPARC wurde leicht von E-Cadherin beeinflusst. Um daher sicher zustellen, dass Snail alleiniger Regulator von SPARC ist, wurden die asSNAIL Zellklone 4 und 5 wieder mit dem Expressionsplasmid von Snail transfiziert, was für eine Reinduktion von Snail in den Zellklonen sorgte. Da Snail in diesem Fall die SPARC Expression positiv beeinflusste, zogen wir den Rückschluß, dass vor allem Snail die SPARC Expression regulierte.

Zuletzt sei festzustellen, dass Snail bei allen untersuchten Genen aktivierende Funktionen ausübte, obwohl Snail bisher hauptsächlich als transkriptioneller Repressor bekannt war (Takahashi et al., 2004). Lediglich die Publikation von Yokoyama *et al.*, wies bisher darauf hin, dass Snail auch transkriptionell aktivierende Funktionen für den MMP-2 Promotor besitzen kann. In welcher Weise Snail zu einer Transkriptionssteigerung beitragen kann, und ob es dafür an die gleiche E-Box Sequenz [*basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH) Konsensussequenz] im Promotorbereich der Gene bindet, wie es bei E-Cadherin der Fall ist, bleibt noch zu klären. Es wird als nächstes nötig sein, nach möglichen Konsensussequenzen für Snail in den Promotorbereichen der jeweiligen Gene zu suchen. Promotoranalysen der Gene MMP-2, EMMPRIN, TIMP-1, SPARC, t-PA, RhoA und Notch4 könnten klären, ob Snail als Transkriptionsfaktor direkt oder indirekt durch andere Signaltransduktionen an der Regulation der Genaktivität beteiligt ist.

3.2.1 E-Cadherin Regulation durch MIA

Weitere im Rahmen dieser Promotion bereits publizierte Daten zeigten, dass das Molekül MIA ebenfalls eine Rolle bei der E-Cadherin Regulation ausüben kann (Poser et al., 2004), Anhang II.

Das Protein MIA (melanoma inhibitory activity) wurde in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits weitreichend untersucht. Der Name *melanoma inhibitory activity* bezieht sich auf den anfangs beobachteten wachstumshemmenden Effekt von MIA auf Melanomzellen. Publikationen unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass die Expression von MIA im malignen Melanom eine Bedeutung bei der Melanomprogression erlangt (Bosserhoff et al., 1996; Bosserhoff et al., 1999b). MIA konnte im Zellkulturüberstand von Melanomzellen nachgewiesen und isoliert werden. Ausschließlich maligne Melanome zeigten eine Expression des Moleküls, während Melanozyten kein MIA exprimierten. Zudem dient MIA bereits als klinischer Marker, der im Serum von Melanompatienten ansteigend mit dem Krankheitsstadium und dem Metastasierungsgrad nachgewiesen wird (Bosserhoff et al., 1997; Bosserhoff et al., 1999a). Funktionelle Analysen zeigten, dass MIA eine wesentliche Rolle bei der Zellanheftung spielt. *In vitro* konnte durch MIA eine Inhibition der Zell-Anheftung von Melanomzellen auf die extrazellulären Matrixmoleküle Fibronectin und Laminin nachgewiesen werden (Bosserhoff et al., 2003). Außerdem zeigte eine strukturelle Analyse des Moleküls (Stoll et al., 2003), dass MIA Homologien mit Bindedomänen von Integrinen besitzt und sezerniertes MIA die Bindungsepitope von Integrinen "maskieren" kann. In Hamster- und Mausmodellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass MIA *in vivo* wesentlich zur Migration des Tumors beiträgt (Bosserhoff et al., 2001; Guba et al., 2000).

Melanomzellklone, bei denen MIA durch die antisense Strategie ausgeschaltet wurde, wurden bereits vor Beginn meiner Arbeit generiert. Die stabilen Zellklone HMB2-5 und HMB2-8 exprimierten MIA nicht mehr und wiesen auch kein MIA in ihrem Zellkulturüberstand auf. Als Kontrolle diente die Ursprungszelllinie HMB2 und ein HMB2lacZ Kontrollzellklon, der mit einem Expressionsvektor für das beta-Galaktosidase Gen transfiziert wurde. Beide Kontrollen exprimierten MIA (Poser et al., 2004).

Quantitative Echtzeit PCR und Western Blots zeigten eine Korrelation zwischen der MIA Expression maligner Melanome und dem Verlust der E-Cadherin Expression. Die Kontrollzellklone HMB2 und HMB2lacZ, mit MIA Expression, produzierten kein E-Cadherin. Es erfolgte eine Reexpression von E-Cadherin in den Zellklonen HMB2-5

und HMB2-8, die kein MIA mehr exprimierten (Poser et al., 2004), im Anhang II, Seite 5. Die beiden Zellklone zeigten zudem eine Inhibierung der Expression des Adhäsionsmoleküls N-Cadherin, welches normalerweise von Melanomzellen in hohem Maße exprimiert wird (Poser et al., 2004), im Anhang II, Seite 5. Das weist darauf hin, dass MIA nicht nur einen Einfluß auf die Migration der metastasierenden Melanomzellen besitzt, sondern auch schon zu früheren Zeitpunkten der Melanomentstehung die Zelladhäsion der Zellen beeinflusst. Zusammenfassend zeigten die Daten, dass MIA einen Einfluß auf die Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin und N-Cadherin besitzt. Allerdings bleibt die Art der Regulation noch zu überprüfen. Es könnte sein, dass MIA intrazellulär einen relativ direkten Einfluß auf E-Cadherin ausübt oder durch extrazelluläre Signale und anschließende Signalkaskaden indirekt inhibitorisch auf den E-Cadherin Promotor wirkten. Dafür müssen erst noch E-Cadherin Promotor-Studien in Abhängigkeit von MIA durchgeführt werden. Gesichert ist aber der Beweis, dass nicht nur Snail inhibitorisch auf die E-Cadherin Expression wirkt, sondern auch MIA E-Cadherin reguliert (Poser et al., 2004).

Die Konsensussequenz der Bindung von Snail an den E-Cadherin Promotor ist bereits aufgeklärt (Nieto, 2002). Diese sogenannte E-Box Sequenz ist zweimal im Promotorbereich des E-Cadherin Gens, nah am Transkriptionsstart vorhanden, und nach Bindung von Snail kommt es zur Reprimierung des Gens.

Das Snail Expression wiederum von BMPs (bone morphogenetic proteins) reguliert wird, ist bereits durch Forschungen an Hühnerembryonen bekannt (Piedra and Ros, 2002). Auch der humane Snail Promotor ist bereits kloniert worden und Studien an diesem zeigten, dass ILK, Ha-ras, PKC-alpha, v-Akt und NFkappaB/p65 seine Aktivität regulieren können (Barbera et al., 2004). Auch TGF-beta1 und Twist regulieren die Snail Expression (Ip und Gridley, 2002; Peinado et al., 2003). Es könnte daher auch sein, dass MIA zunächst die Expression von Snail induziert und Snail anschließend die Expression von E-Cadherin unterbindet.

Zusammenfassend muß im Hinblick auf die Regulationsfähigkeit von MIA noch vieles geklärt werden. Vor allem ob durch MIA Signale an den E-Cadherin- oder Snail Promotor weiter geleitet werden.

3.3 Untersuchung E-Cadherin abhängiger Regulationsmechanismen im malignen Melanom

In Kapitel 1.4.1. wird der klassische Wnt/beta-Catenin Signalweg beschrieben, der vor allem bei dem Verlust von E-Cadherin in Tumorzellen seine dominierende Wirksamkeit erlangt und eine besondere Bedeutung bei der Entstehung von Krebs hat. Mit dem Verlust von E-Cadherin kommt es nicht nur zu einer Destabilisierung der epithelialen Zelladhäsion und einer Migration von Zellen, sondern auch zu einer Beeinflussung der ursprünglichen Signaltransduktion, weil ungebundenes beta-Catenin im Zytoplasma vorliegt. Bei gleichzeitig aktivem Wnt Signalweg zeigt sich die karzinogene Wirksamkeit von beta-Catenin als Koaktivator für die Transkriptionsfaktoren LEF/TCF im Zellkern. Untersuchungen verschiedener anderer Tumorarten, wie Kolon- und Prostatakarzinom ergaben, dass beim beta-Catenin-Gen (*CTNNB1*) oft Mutationen auftreten. Diese Mutationen wurden meist an den Aminosäuren Serin oder Threonin des beta-Catenin Proteins gefunden, die für die Phosphorylierung und anschließende Ubiquitinierung des Moleküls verantwortlich sind. Die Mutationen unterbinden die für die Degradation notwendige Phosphorylierung, wodurch das Protein stabilisiert wird, vermehrt in den Zellkern translozieren kann und dort Gene für die Differenzierung und Proliferation anregt (Behrens, 1999; Behrens et al., 1989). Weiter wurden Mutationen im Kolonkarzinom beschrieben, die bei Komponenten des APC/GSK3beta/Axin-Komplexes gefunden wurden, welche zu dessen Funktionsunfähigkeit führten, beta-Catenin zu phosphorylieren (Samowitz et al., 1999; Sparks et al., 1998). Alle bisher in anderen Tumorarten beschriebenen Mutationen führen also zu einer Stabilisierung von beta-Catenin im Zytoplasma und einer anschließenden Translokation in den Zellkern. Diese Mutation im beta-Catenin Gen und weiteren Bestandteilen des beta-Catenin Abbaukomplexes sind im Melanom nur selten gefunden worden (Doglioni et al., 2003; Pollock und Hayward, 2002; Worm et al., 2004). Weitere Arbeitsgruppen konnten beta-Catenin nicht die gleiche Funktion im malignen Melanom zuschreiben, wie sie in anderen Krebsarten vorzufinden war, obwohl die Grundlage des Signalweges mit dem Verlust von E-Cadherin auch im Melanom gegeben ist (Edmunds et al., 2002; Pollock und Hayward, 2002; Reifenberger et al., 2002; Reifenberger et al., 2005). Immunfluoreszenzexperimente für beta-Catenin und Luciferase-Aktivitätsassays von LEF/TCF (FOPFLASH und TOPFLASH) zeigten auch in unserer Arbeitsgruppe, dass beta-Catenin in verschiedenen Melanomzelllinien nicht als Koaktivator im Zellkern vorzufinden ist (Kuphal et al., 2004, Anhang I, Seite 8515).

In dieser Arbeit wurde daher nach alternativen Signalwegen gesucht, die mit dem Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin und eventuell auch dem Vorhandensein von beta-Catenin im Zytoplasma zusammen hängen.

Die Relevanz des Moleküls Snail bei der Entstehung des malignen Melanoms ist in dem Kapitel 3.2 ausgiebig erläutert worden. Das für diese Untersuchungen benötigte asSNAIL Modellsystem wurde auch in den folgenden Analysen am Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin angewandt, denn die asSNAIL Zellklone exprimieren E-Cadherin wieder und standen im Vergleich zu der Ursprungszelllinie Mel 1m, die kein E-Cadherin exprimierte.

3.3.1 NFkappaB Aktivität im malignen Melanom

Für den ersten Teil der Klärung der E-Cadherin Signaltransduktion war bereits seit langem bekannt, dass Signalwege, die mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkappaB enden, in vielen Tumorarten aktiviert sind (Dhawan und Richmond, 2002). Auch für das maligne Melanom konnte die gesteigerte Aktivität von NFkappaB von uns festgestellt werden. Die Daten zur konstitutiven NFkappaB Aktivität im Melanom wurden im Rahmen dieser Promotion bereits publiziert und befinden sich im Anhang I der Dissertation. Zunächst prüften wir die Aktivität von NFkappaB in sieben in unserem Labor zur Verfügung stehenden Melanomzelllinien im Vergleich zu NHEM. Ein Luciferase Assay zeigte die hohe transkriptionelle NFkappaB Aktivität in allen Melanomzelllinien (Kuphal et al., 2004, Anhang I, Seite 8510). Die Bindungsfähigkeit von NFkappaB Untereinheiten im Zellkern wurde durch einen *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) bestätigt. Es konnte anhand von Kernextrakten gezeigt werden, dass p50 und p65 an die radioaktiv markierte DNA Konsensussequenz gebunden haben und dieses in NHEM nicht der Fall war (Abbildung 13).

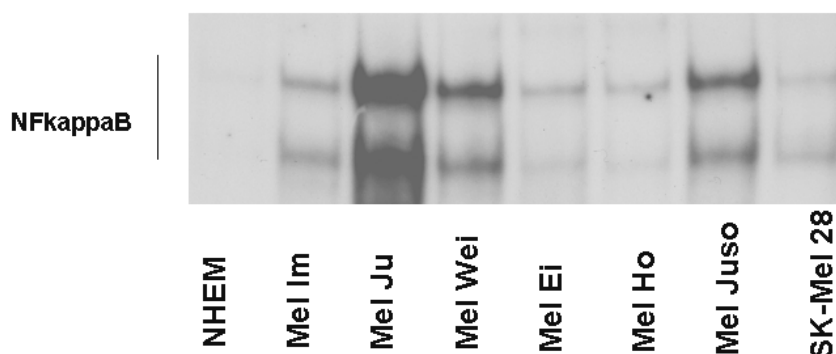


Abbildung 13: *Electrophoretic mobility shift Assay* (EMSA) zur Ermittlung der NFkappaB DNA-Konsensussequenzbindung. Proteine in Kernextrakten von sieben Melanomzelllinien zeigen eine hohe NFkappaB Bindungsfähigkeit an eine Nukleotidsequenz, die der klassischen humanen NFkappaB Bindungsstelle entspricht. NHEM besitzen hingegen kein aktives NFkappaB, welches an die Konsensussequenz binden könnte (Kuphal et al., 2004).

Beim Vergleich des E-Cadherin Expressionsmusters der Melanomzelllinien und den NHEM viel auf, dass das Expressionsmuster konträr zu der NFkappaB Aktivität war. Melanozyten mit einer hohen E-Cadherin Expression wiesen keine NFkappaB Aktivität auf, und alle Melanomzelllinien, die N-Cadherin stark exprimierten, aber kein E-Cadherin besaßen, zeigten eine hohe NFkappaB Aktivität. Es interessierte uns daher, ob der Verlust von E-Cadherin eine Rolle bei der Regulation von NFkappaB spielte. Um die Beteiligung von E-Cadherin oder besser des Verlustes von E-Cadherin, an der NFkappaB Regulation zu beurteilen, nutzen wir zunächst zwei der in vorherigen Kapiteln erwähnten Modellsysteme.

Die stabil antisense Snail transfizierten Zellklone, deren E-Cadherin Reexpression stetig kontrolliert wurde und auch die transient E-Cadherin transfizierten Zellen, zeigten im Vergleich zur Ursprungszelllinie Mel Im eine geringere NFkappaB Aktivität in Luciferase-Reporterassays. Auch die in der Konzentration abgestuften Transfektionen von E-Cadherin führten zu einem dosisabhängigen Aktivitätsverlust der NFkappaB Aktivität. Zudem konnte die Analyse von Kernextrakten der asSNAIL und E-Cadherin Zellen in EMSA Experimenten die geringere Bindung der Untereinheiten p50 und p65 an der NFkappaB DNA-Konsensussequenz detektiert werden (Kuphal et al., 2004, Anhang I, Seite 8512). Diese Ergebnisse konnten durch Immunfluoreszenz und Western Blot Experimente erweitert und bestätigt werden. Die Immunfluoreszenz verdeutlichte, dass die NFkappaB Untereinheit p65 in der Ursprungszelllinie Mel Im im Zellkern zu lokalisieren war und die asSNAIL Zellklone eine Färbung für p65 nur im Zytoplasma zeigten (Kuphal et al., 2004, im Anhang I, Seite 8512). Um dieses Ergebnis zu untermauern, extrahierten wir von den Zellklonen, die E-Cadherin reexprimierten, die Proteine des Zytoplasmas und des Kerns und testeten diese Fraktionen im Western Blot auf das Vorhandensein von p65 (Abbildung 14). Hierbei wurde zwischen dem phosphorylierten und damit aktivierten p65 Molekül und dem nicht aktivierten dephosphorylierten p65 Protein unterschieden. Wie zu erwarten, konnte die phosphorylierte, transkriptionell aktive Form der NFkappaB Untereinheit p65 nur im Kernextrakt von Mel Im Zellen detektiert werden (Kuphal et al., 2004, im Anhang I, Seite 8512). Die E-Cadherin exprimierenden Zellen besaßen kein aktiviertes p65 in ihrem Zellkern. Allerdings konnte mit einem Antikörper gegen unphosphoryliertes p65 in allen Kernextrakten NFkappaB nachgewiesen werden. Hierbei wiesen aber auch die Mel Im Zellen eine erhöhte Menge an p65, im Vergleich mit den E-Cadherin exprimierenden Zellen, auf. Im Zytoplasma verhielt sich die Situation für unphosphoryliertes p65 konträr. Die E-Cadherin exprimierenden Zellen besaßen in den zytoplasmatischen Proteinextrakten mehr unphosphoryliertes p65, als die Mel Im Zellen, die kein E-Cadherin exprimieren. Das heißt, die Zellen mit E-Cadherin besitzen

zwar NFkappaB, dieses liegt aber nur in inaktiver Form im Zytoplasma vor. Aktives NFkappaB wurde nur im Zellkern von Mel Im Zellen detektiert.

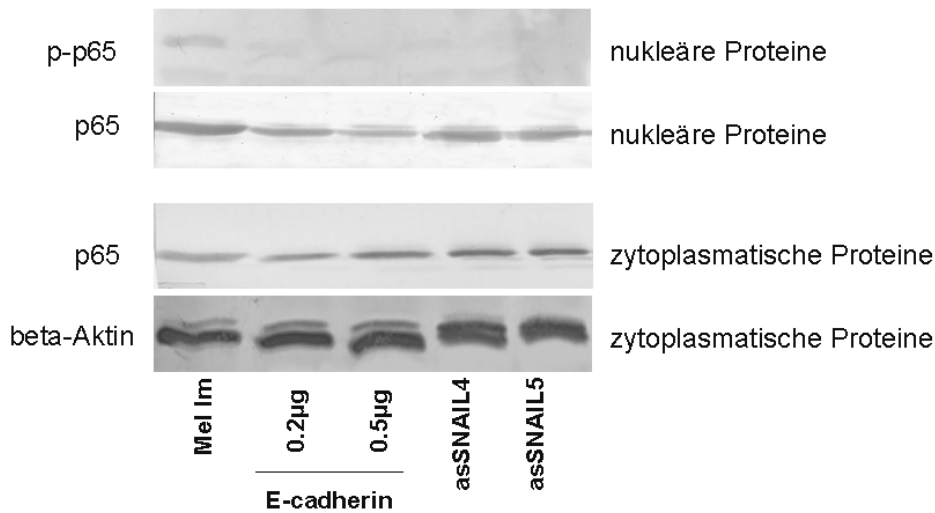


Abbildung 14: Western Blot für die Detektion der phosphorylierten und unphosphorylierten Untereinheit von NFkappaB: p65. Durch eine spezielle Methode der Extraktion wurden nukleäre Proteine und zytoplasmatische Proteine der Melanomzelllinie Mel Im und den E-Cadherin reexprimierenden Zellen (asSNAIL4, asSNAIL5, 0.2µg E-Cadherin und 0.5µg E-Cadherin), voneinander getrennt. Von oben nach unten: Phosphoryliertes p65 wird nur in der Ursprungszelllinie Mel Im im Kern detektiert. Unphosphoryliertes p65 besitzen alle Zelltypen im Kern, Mel Im Zellen jedoch in höherem Maß, als E-Cadherin exprimierende Zellen. Unphosphoryliertes p65 befindet sich vor allem in E-Cadherin reexprimierenden Zellen im Zytoplasma. Mel Im Zellen exprimieren inaktives p65 schwächer im Zytoplasma, weil es in den Zellkern transloziert ist. Beta-Aktin dient der Ladekontrolle (Kuphal et al., 2004).

Um die IkappaB gebundene Form von p65 zu analysieren, wurde ein weiterer Western Blot durchgeführt, der die Expression von IkappaB alpha in den asSNAIL Zellklonen detektierte. Die E-Cadherin exprimierenden Zellklone zeigten erhöhte Proteinmengen von IkappaB alpha im Vergleich zu Mel Im Zellen, was die Theorie bestätigte, dass IkappaB alpha in diesen Zellen das NFkappaB vermehrt im Zytoplasma zurück hält und dieses dadurch keine transkriptionelle Aktivität erlangt (Kuphal et al., 2004, im Anhang I, Seite 8512). Um die Inhibierung der NFkappaB Aktivität nach E-Cadherin Reexpression in Melanomzellen weiter zu bestätigen, überprüften wir die Expression des NFkappaB abhängigen Zielegens Interleukin 8 (IL-8). Dafür wurde der Überstand dieser Zellen im ELISA vermessen und es zeigte sich, dass IL-8 bei Mangel an NFkappaB Aktivität in den E-Cadherin Reexprimierenden Zellen in verminderten Mengen im Überstand zu detektieren war. Als Kontrolle für den ELISA wurde das NFkappaB unabhängige Zielgen TGF-beta2 analysiert. Es zeigte sich das dieses Molekül durch NFkappaB nicht reguliert wurde (Kuphal et al., 2004, im Anhang I, Seite 8513).

Die NFkappaB Aktivität in Abhängigkeit von E-Cadherin wurde auch in Melanozyten (NHEM) analysiert. Ein Antikörper gegen E-Cadherin verhinderte die Zelladhäsion von E-Cadherin und unterbrach gleichzeitig das von E-Cadherin ausgehende Signal an NFkappaB. Dieses Experiment zeigte, dass die blockierte E-Cadherin Funktion zu einer Erhöhung der NFkappaB Bindungskapazität an die DNA-Konsensussequenz führte. EMSA Experimente zeigten intensivere Signale auf dem Röntgenfilm für Kernextrakte von Melanozyten, die mit dem inhibitorischen E-Cadherin Antikörper behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten NHEM (Kuphal et al., 2004, im Anhang, Seite 8513).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Daten mit denen von anderen Arbeitsgruppen korrelierten, die zeigten, dass NFkappaB in weiteren Tumorarten konstitutiv aktiv ist (Huang et al., 2000; Meyskens et al., 1999; Suh et al., 2002). Als Beispiele gelten das Mammakarzinom, das hepatozelluläre Karzinom, Krebs des Gastrointestinaltraktes, Prostatakarzinom und viele weitere Krebserkrankungen. Auch für das Melanom wurde die Beteiligung von NFkappaB an der malignen Entartung dieses Krebses beschrieben (Dhawan und Richmond, 2002; McNulty et al., 2001; Shattuck-Brandt und Richmond, 1997; Yang und Richmond, 2001). McNulty *et al.*, konnten zeigen, dass in Melanomzellen 7-fach erhöhte p50 Level und 5-10-fach erhöhte p65 Level von NFkappaB im Kern von Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten vorzufinden waren. Wir zeigten zum ersten Mal, dass diese konstitutive NFkappaB Aktivität im malignen Melanom durch den Verlust von E-Cadherin erzeugt wurde (Kuphal et al., 2004, im Anhang I).

3.3.1.1 Einfluß des zytoplasmatischen Bereich von E-Cadherin auf die NFkappaB Aktivität

Viele Untersuchungen haben sich bereits mit dem extrazellulären und intrazellulären Bereich von E-Cadherin im Rahmen der Zell-Zell Adhäsion auseinandergesetzt. Die Bedeutung der Domänen wurde zumeist durch Deletionsstudien aufgeklärt. Cadherine mit einer extrazellulären Deletion führten zur Unterbindung der Zell-Zell-Adhäsion während Cadherine ohne zytoplasmatische Domäne keine Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellten (Jaffe et al., 1990; Kreft et al., 1997; Ozawa et al., 1990a; Roh und Stanley, 1995). Weitere Studien zeigten zusätzlich, dass die zytoplasmatische Domäne nicht allein für die Verbindung zum Zytoskelett da ist, sondern ebenfalls die gesamte homophile Zelladhäsion beeinflussen kann. Der Verlust der zytoplasmatischen Domäne zeigte *in vivo*, z. B. in *Xenopus* Embryos, dass es zu einer gestörten Ektoderm Entwicklung während der Gastrulationsphase kommt (Levine et al.,

1994). Zytoplasmatische Deletionen von 37 bis 71 Aminosäuren am COOH-Terminus führten dazu, dass Zellen (K562; Erythroleukämie Zelllinie) keinen Komplex mit Cateninen herstellen konnten und dieses zu dem Verlust der Zellaggregation führte (Ozawa et al., 1990b; Ozawa et al., 1990c). Wichtig war hierbei, welche Aminosäuren dem zytoplasmatischen Bereich fehlten, denn in dem Aminosäurenbereich 37 bis 71 befindet sich die Catenin-Bindungsstelle. Zusammenfassend beweisen publizierten Daten, dass das extrazelluläre Element von Cadherinen nicht allein für die Zelladhäsion verantwortlich gemacht werden kann, sondern auch die intrazelluläre Domäne von E-Cadherin die Zelladhäsion beeinflusst, obwohl diese Domäne nicht im direkten Kontakt zum E-Cadherin der Nachbarzellen steht. Aber die Adhäsion ist nicht das einzige, was die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen beeinflusst. Daten von anderen Arbeitsgruppen zeigten, dass gesteigerte Zelladhäsion nicht immer zu reduzierter Invasion führte (Navarro et al., 1993; Sommers et al., 1991).

Wir waren daher daran interessiert, ob der zytoplasmatische Bereich von E-Cadherin auch ohne den N-terminalen Bereich signalisierende Funktionen ausüben kann, wie wir es für das gesamte E-Cadherin Molekül bereits zeigen konnten. Um also nicht nur den Einfluß des gesamten E-Cadherin Moleküls auf die NFkappaB Aktivität zu untersuchen, setzen wir auch die in Kapitel 3.1 erwähnten Zellklone E-Cadherin CDc, CDd und CDe ein, die die ungebundene zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin exprimieren. Außerdem analysierten wir auch die Zellklone E-Cadherin M2, M3 und M7, die zytoplasmatisches E-Cadherin noch an der Zellmembran verankert haben, im Hinblick auf die NFkappaB Aktivität in Abhängigkeit von E-Cadherin. Dieses dritte Modellsystem zeigte, dass die NFkappaB Aktivität durch E-Cadherin Reexpression in Melanomzellen herab gesetzt wird, und auch der zytoplasmatische Teil von E-Cadherin diese Signalwirkung auf NFkappaB besitzt (Kuphal und Bosserhoff, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang III, Seite 5-6 und Abbildung 5).

3.3.2 Durch E-Cadherin regulierte zytoplasmatische Moleküle

Die vermittelnden Moleküle zwischen E-Cadherin als Signalmolekül und NFkappaB im Zellkern sind für das maligne Melanom bisher noch nicht beschrieben. Allerdings sind die MAP Kinasen als zytoplasmatische Signalvermittler bekannt (Pece und Gutkind, 2000). Daher untersuchten wir als erstes die MAP Kinasen als Signalüberträger zwischen E-Cadherin und NFkappaB. Wir analysierten dabei die Phosphorylierung von vier verschiedenen MAP Kinasen im Melanom. Zu der Familie der MAP Kinasen gehören c-jun NH2-terminale Kinase (JNK), p42/p44 ERK1/2 und p38 (siehe Abbildung 14). Der Status der genannten Kinasen wurde zwischen Melanomzellen (E-Cadherin

negativ) und E-Cadherin reexprimierenden Melanomzellen, verglichen. Die Daten über die MAP Kinasen sind von uns bereits publiziert worden und befinden sich gemeinsam mit den Daten über die NFkappaB Aktivität im Anhang I der Dissertation.

Die Beteiligung der MAP Kinasen ERK1 und ERK2 an Regulationsprozessen zur Entwicklung des malignen Melanoms wurde bereits beschrieben. Allerdings bezog sich diese MAP Kinase Aktivität bisher auf die maligne Transformation von Melanozyten zu Melanomzellen (Govindarajan et al., 2003). Dhawan *et. al.*, zeigten im Melanom eine erhöhte Aktivität des Signalweges NIK/MEK1/2/ERK1/2 durch Zytokine (Dhawan und Richmond, 2002). Die MAP Kinasen p42/p44 (ERK1 und ERK2) sind auch in unseren Melanomzelllinien konstitutiv phosphoryliert. Es lassen sich aber keine Aktivitätsunterschiede von ERK in Melanomzellen, die E-Cadherin nicht exprimieren und in Zellen, die E-Cadherin reexprimieren, erkennen (Kuphal et al., 2004, im Anhang, Seite 8514). Die Beteiligung der ERK MAP Kinasen an der E-Cadherin Signalweiterleitung wurde damit ausgeschlossen.

Auch die Beteiligung der Kinase JNK (c-jun NH₂-terminal kinase), und der in dieser Signalkaskade folgenden Kinase c-jun (Abbildung 16) an der Vermittlung von E-Cadherin Signalen, ließ sich ausschließen (Kuphal et al., 2004, Anhang I, Seite 8514). Western Blots zeigten keine Aktivitätsunterschiede von c-jun in den in den Modellsystemen eingesetzten Zellen.

Eine weitere Publikation wies in anderen Zusammenhängen auf eine erhöhte Aktivität der MAP Kinase p38 in der Melanomzelllinie MeWo hin. Die Ergebnisse verwiesen auf einen Zusammenhang zwischen p38 Aktivität und MMP-2 Expression (Denkert et al., 2002). Desweiteren zeigten Publikationen, dass durch MGSA/GRO (melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated protein) die Ras/MEK1/MEK3/6 und anschließend p38 MAP Kinase Aktivität erhöht wird. Hier war allerdings MGSA/GRO das initiiierende Protein der Signalkaskade (Wang und Richmond, 2001). Für die Aktivität der MAP Kinase p38 zeigte sich auch in unseren Experimenten eine Regulation in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression. Ein ELISA für die phosphorylierte MAP Kinase p38 (Abbildung 15) und Western Blots zeigten, dass die Aktivität in der Melanomzelllinie Mel Im im Vergleich zu den Zellklonen asSNAIL 4 und 5 und E-Cadherin transfizierten Mel Im Zellen erhöht war (Kuphal et al., 2004, Anhang I, Seite 8514). Es ergaben sich erste Hinweise, dass die Reexpression von E-Cadherin in Melanomzellen die Phosphorylierung von p38 verhindern konnte und Melanomzellen eine erhöhte p38 Aktivität aufwiesen.

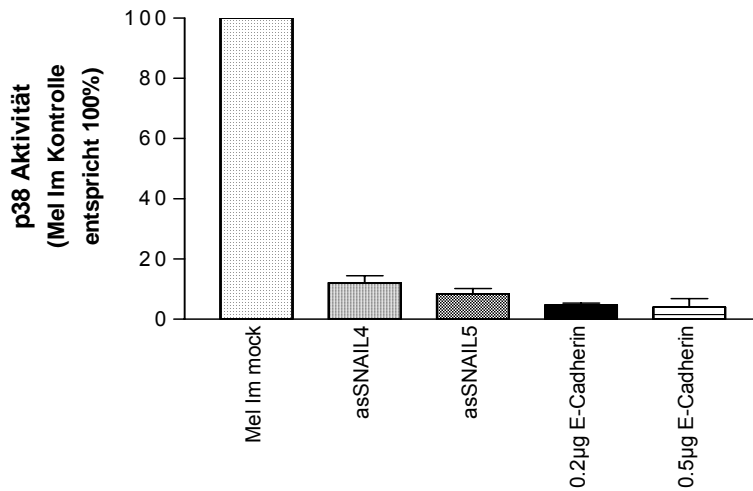


Abbildung 15: ELISA zu der Detektion der phosphorylierten Form von der MAP kinase p38. Mel Im (100%) zeigt eine erhöhte p38 Aktivität im Vergleich zu den E-Cadherin exprimierenden Zellen (Kuphal et al., 2004).

Zudem wurde die Phosphorylierung der Proteinkinase AKT überprüft, deren Aktivität im malignen Melanom und weiterer Zelllinien (CaCo, Kolonkarzinomzelllinie; MDCK, Madin-Darby Canine Kidney) bereits häufiger von anderen Arbeitsgruppen erwähnt wurde (Dhawan und Richmond, 2002; Laprise et al., 2002; Li et al., 2003a; Pece et al., 1999). Es wurde ein Zusammenhang zwischen adhärenen Junctionen und der Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges (siehe Abbildung 16) gesehen, daher wurde im Rahmen unserer Untersuchungen der E-Cadherin abhängigen Zelladhäsion die Phosphorylierung der AKT Kinase ebenfalls überprüft. Im Western Blot wurden keine Phosphorylierungsunterschiede der Proteinkinase AKT in Mel Im Zellen und in den Zellen der zwei E-Cadherin-Modellsysteme gefunden (Kuphal et al., 2004, im Anhang I, Seite 8514).

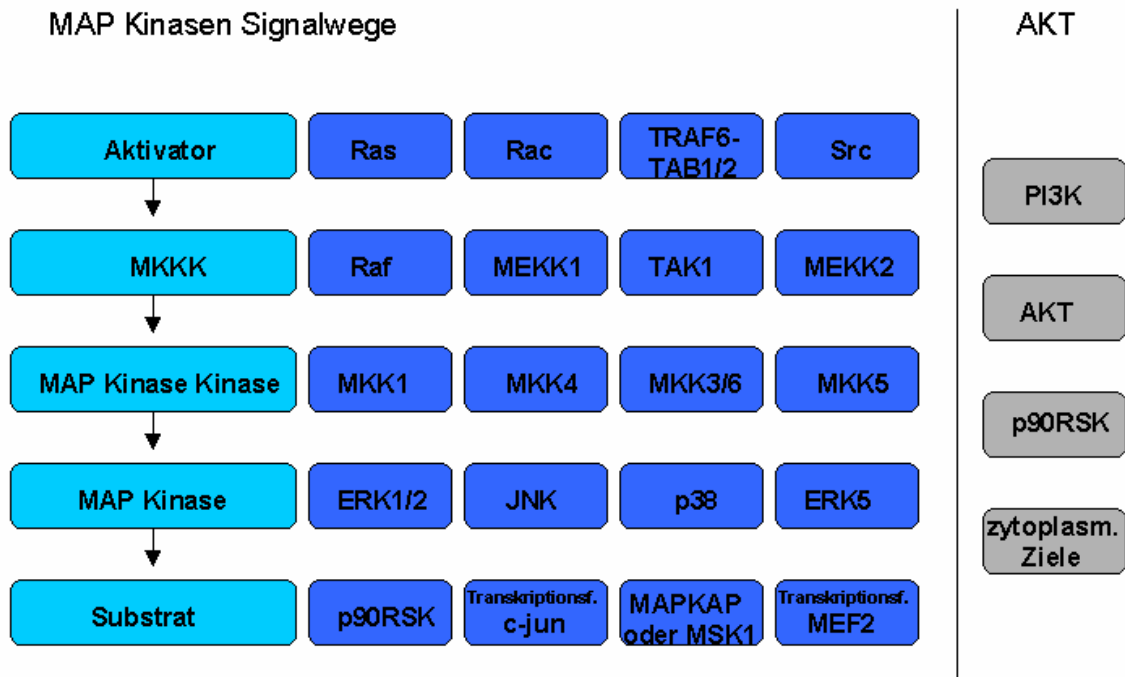


Abbildung 16: Schematische Darstellung der MAP Kinase Signalwege und des Akt Kinase Signalweges. Weitere überschneidende Verknüpfungen zwischen den MAP Kinasen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt. Auch viele Zielmoleküle und der jeweilige Stimulus fehlen. Aufgezeichnet sind die fünf MAP Kinasen und Moleküle oberhalb und unterhalb der jeweiligen Signalkaskade. p90RSK, 90kDa ribosomale Protein S6 Kinase; Src, onkogenetische Tyrosinkinase; MEF2, *myocyte enhancer factor*; TRAF6, *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*; TAK1, *transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1*; MSK1, *mitogen- and stress activated protein kinase 1*. Verändert nach Johnson und Lapadat, 2002.

Um im Folgenden zu untersuchen, ob die p38 Phosphorylierung auch Einfluß auf die NFkappaB Aktivität besitzt, benutzten wir Inhibitoren der MAP Kinase p38. Die Inhibitoren verhindern spezifisch die Phosphorylierung von p38. Zunächst wurden durch Western Blots die Spezifität von den Inhibitoren SB203580 (4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole) und SB202190 (4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole), für die von uns eingesetzten Konzentrationen getestet. Die Inhibitoren zeigten mit den eingesetzten Konzentrationen von 10µM und 20µM keine Wirksamkeit auf ERK1/2. Im Western Blot konnte aber gezeigt werden, dass diese Konzentrationen die Phosphorylierung von p38 spezifisch hemmten. Nachdem in der Signalkaskade die Aktivität von p38 durch die SB Inhibitoren gehemmt wurde, war auch die NFkappaB Aktivität reduziert. Das zeigten Luciferase-Aktivitätsassays (Kuphal et al., 2004, Anhang I, Seite 8515). Auch das Protein IkappaB alpha, welches für die transkriptionelle Aktivität von NFkappaB degradiert, wurde nach Inhibitorenbehandlung mit SB203580 und SB202190 im Western Blot untersucht. Wurde die Phosphorylierung von p38 unterbunden, degradierte IkappaB alpha nicht mehr und sammelte sich im Zytoplasma von E-

Cadherin exprimierenden Zellen an. Mel Im Zellen ohne E-Cadherin Expression besaßen wenig I κ B α im Zytoplasma, was auf aktiviertes NF κ B hinwies. Bereits erschienene Publikationen deuteten auf eine erhöhte ERK MAP Kinaseaktivität in Melanomzellen hin, die die NF κ B Aktivität steigerte (Dhawan und Richmond, 2002). Es sollte also mit unseren Experimenten überprüft werden, ob ERK1 oder ERK2 an der Regulation der NF κ B Aktivität durch E-Cadherin involviert sind. Ein spezifischer Inhibitor der ERK1/2 Kinasen ist PD98059 (2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one). Nach Behandlung der Melanomzellen mit diesem Inhibitor konnte keine veränderte NF κ B Aktivität festgestellt werden. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte wiederum die Beteiligung der MAP Kinasen ERK1 und ERK2 im untersuchten Signalweg ausgeschlossen werden. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Aktivität der p38 MAP Kinase mit der transkriptionellen Aktivität von NF κ B verknüpft ist. Außerdem reguliert die E-Cadherin Expression die Aktivität von p38. Mel Im Zellen ohne E-Cadherin besitzen viel phosphoryliertes p38. E-Cadherin exprimierende Zellen der zwei Modellsysteme haben kein phosphoryliertes p38.

Desweiteren haben wir nach Kinasen gesucht, die oberhalb von p38 an der Signalkaskade von E-Cadherin beteiligt sein könnten. Allerdings gestaltete sich diese Suche sehr schwierig, denn die MAP Kinase Signalwege verzweigen sich sehr stark und es entstehen im Laufe neuer Forschungen immer wieder neue Zusammenhänge für die gegenseitige Aktivierung der Kinasen. Als Beispiel haben wir auch die Beteiligung der MAP Kinase Kinase Kinase MEKK1 im Hinblick auf die NF κ B Regulation untersucht. Literatur wies darauf hin, dass MEKK1 an der Transformation von Melanozyten zu Melanomzellen beteiligt ist, indem diese Kinase die p38 Aktivität erhöht und NF κ B Aktivität reguliert (Wang und Richmond, 2001).

In unseren Experimenten steigerte die transiente Transfektion eines Plasmides, welches zu der Expression von MEKK1 führt, in Mel Im Zellen die NF κ B Aktivität jedoch nicht.

Auch unterhalb des Signalweges der MAP Kinase p38 untersuchten wir die Expression und Phosphorylierung des Zielproteins MAPKAP-2 Kinase. Eigentlich hätte das Zielprotein MAPKAP-2 seine Phosphotransferase-Funktion ausüben müssen und das Substratmolekül HSP27 (heat shock protein 27) phosphorylieren sollen. Im Western Blot wurde daher die Phosphorylierung des Proteins HSP27 nach der Durchführung des MAPKAP-Assay überprüft, in dem der Phosphotransferase Reaktion zusätzlich ATP zugeführt worden ist. Die Beteiligung dieses Moleküls an dem untersuchten Signalweg konnte allerdings experimentell ausgeschlossen werden. Die Proteinextrakte der Zellen mit phosphorylierter p38 Kinase (N-Cadherin exprimierende

Zellen) und der Zellen mit unphosphorylierter p38 Kinase (E-Cadherin exprimierende Zellen), wiesen keine Unterschiede in der Phosphorylierung von HSP27 auf.

Neuere Literatur wies dem Molekül MSK1 (mitogen- and stress activated protein kinase 1) eine Rolle als Zielmolekül von p38 und ERK zu, welches direkt p65 phosphorylieren kann (Vermeulen et al., 2002; Vermeulen et al., 2003). Daher untersuchten wir ebenfalls die Aktivität von MSK1 im malignen Melanom. Der für MSK1 spezifische Inhibitor H89 zeigte aber keine Wirkung auf die NFkappaB Aktivität in Luciferase Reporterassays.

Daher konnte bisher keines der oben erwähnten Moleküle der Signalkaskade zwischen E-Cadherin, p38 und NFkappaB zugeordnet werden. Nur das im Kapitel 3.3.3 erwähnte Molekül beta-Catenin fand seinen Platz in der untersuchten Signalkaskade.

3.3.3 Einfluß von beta-Catenin

Wie bereits in mehreren Kapiteln erwähnt, ist beta-Catenin durch den Verlust von E-Cadherin im malignen Melanom vermehrt im Zytoplasma vorzufinden. Wir haben die Melanomzellen zusätzlich mit beta-Catenin transfiziert, anschließend zeigte sich in quantitativer Echtzeit PCR eine Steigerung der beta-Catenin Expression. Die Immunfluoreszenz (Abbildung 17) der transfizierten Melanomzellen zeigte zudem eine vermehrte Ansammlung von ungebundenem beta-Catenin im Zytoplasma der Zellen (Kuphal et al., 2004, im Anhang I, Seite 8515). Zusätzlich zeigte sich im ELISA, dass die Transfektion von beta-Catenin die Phosphorylierung von p38 erhöhte. Außerdem steigerte die Transfektion von beta-Catenin die Aktivität von NFkappaB in Luciferase Aktivitätsassays (Kuphal et al., 2004, im Anhang I, Seite 8515).

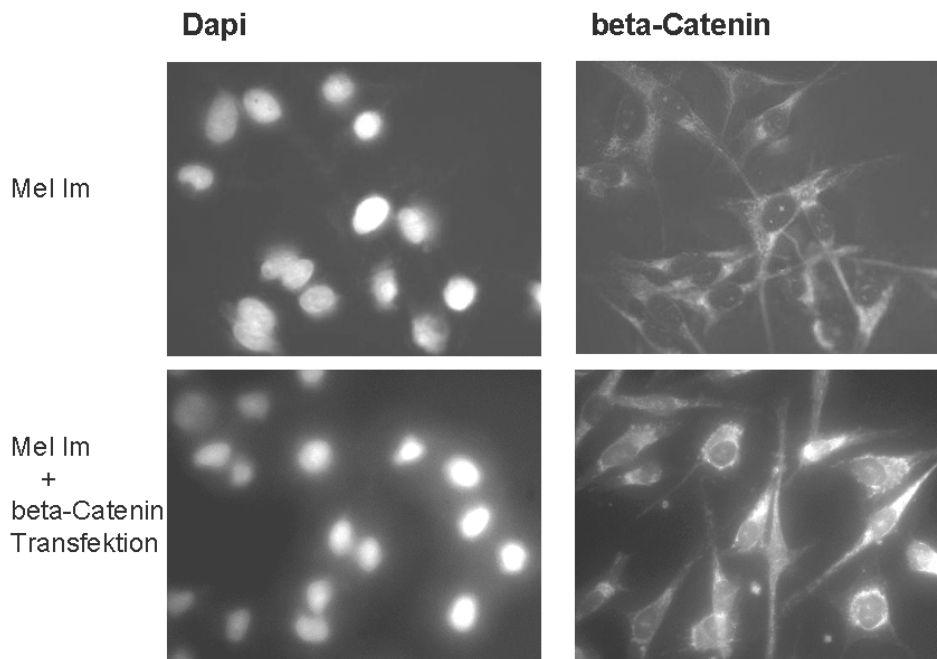


Abbildung 17: Immunfluoreszenz, um beta-Catenin zu detektieren. Die Ursprungszelllinie Mel Im zeigt beta-Catenin im Zytoplasma. Nach beta-Catenin Transfektion bleibt beta-Catenin ebenfalls im Zytoplasma, die Immunfluoreszenz ist jedoch stärker ausgeprägt. Dapi Färbung zeigt die intakten Zellkerne der Melanomzellen (Kuphal et al., 2004).

Wurden die beta-Catenin transfizierten Zellen allerdings gleichzeitig mit den p38 Inhibitoren SB203580 und SB202190 behandelt, wurde die NFkappaB Aktivität wieder

signifikant gesenkt. Gamma-Catenin konnte diese Effekte auf NFkappaB nicht ausüben und aktivierte NFkappaB nicht. In Melanomzellen führte der E-Cadherin Verlust zu dem Vorhandensein von ungebundenen beta-Catenin im Zytoplasma. Dieses war wiederum in der Lage, den p38 Signalweg zu stimulieren und die Phosphorylierung von IkappaB zu gewährleisten. IkappaB degradierte und das führte zu einer transkriptionellen Aktivierung von NFkappaB. Die Zusammenhänge sind in Abbildung 18 dargestellt. Zusammenfassend führt der Verlust von E-Cadherin im malignen Melanom zu einer Ansammlung von ungebundenem beta-Catenin im Zytoplasma der Zellen und einer Aktivitätssteigerung der MAP Kinase p38. Diese ist damit in höherem Maße phosphoryliert. Es ist für die Melanomzellen zur Erhaltung dieses Signalweges wichtig, dass beta-Catenin im Zytoplasma bleibt und nicht, wie im Kolonkarzinom, in den Zellkern transloziert. Auf noch ungeklärten Wegen wird die Phosphorylierung schließlich auf das Molekül IkappaB alpha übertragen, welches dadurch ubiquitiniert und im Folgenden degradiert wird. Anschließend liegen die NFkappaB Untereinheiten p50 und p65 frei im Zytoplasma vor und translozieren in den Zellkern. Hier werden Zielgene der Signalkaskade durch NFkappaB transkribiert. Als Beispiel wurde das Zielgen IL-8 untersucht. In umgekehrter Weise führt die Reexpression von E-Cadherin im Melanom zu der zytoplasmatischen Bindung von beta-Catenin. Die MAP Kinase p38 ist weniger phosphoryliert und die NFkappaB Untereinheiten bleiben an inaktiven IkappaB alpha gebunden. Dadurch ist NFkappaB in seiner transkribierenden Funktion inhibiert und IL-8 wird als Zielgen nicht mehr exprimiert.

Außerdem konnten wir zeigen, dass nach Transfektion des ungebundenen (E-Cadherin CD) und des gebundenen E-Cadherin (E-Cadherin M), die NFkappaB Aktivität in Melanomzellen gesenkt wurde. Das bedeutet, dass der zytoplasmatische Bereich von E-Cadherin Signalfunktionen übernimmt und dass es nicht unbedingt wichtig ist, ob das zytoplasmatische E-Cadherin an der Membran gebunden ist, damit es Signalfunktionen übernehmen kann.

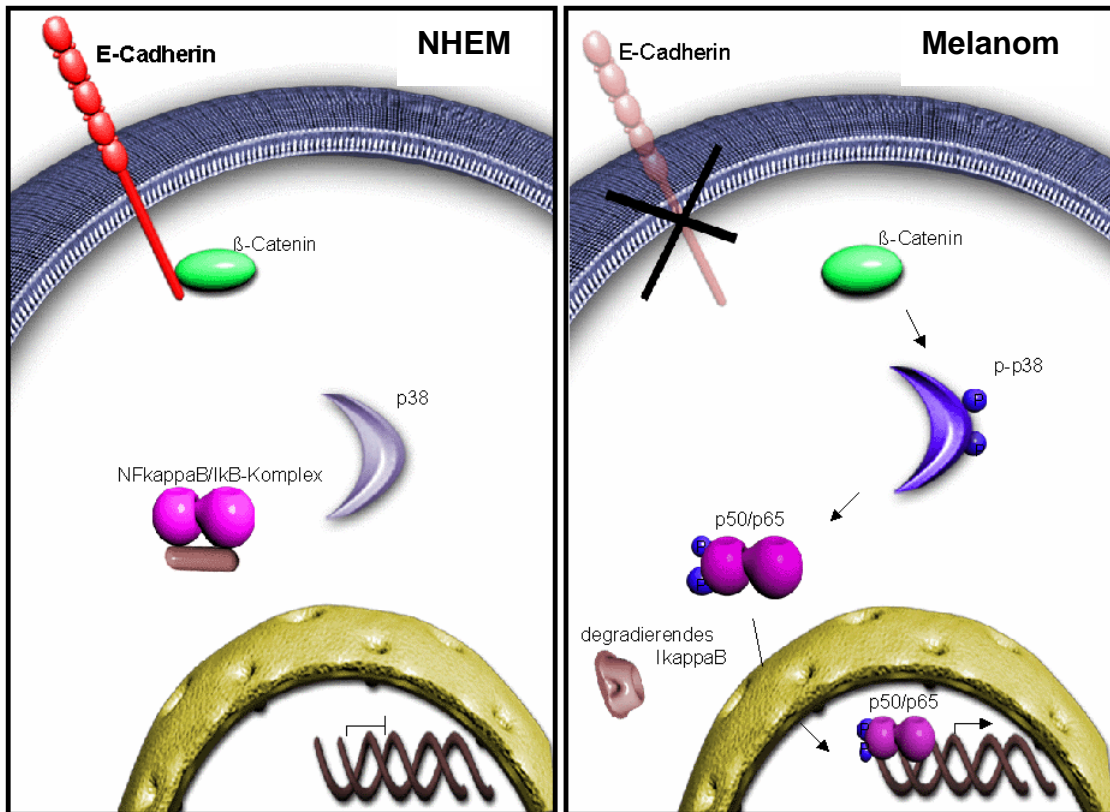


Abbildung 18: Schematische Darstellung des E-Cadherin Signalweges in NHEM, im Vergleich zum Signalweg nach dem Verlust der E-Cadherin Expression im malignen Melanom. Im Melanom führt ungebundenes beta-Catenin zur Phosphorylierung von der MAP Kinase p38 und der Aktivitätssteigerung von NFkappaB. Bild Bearbeitung von Richard Bauer, AG Bosserhoff (Kuphal et al., 2004).

3.4 Untersuchung von N-Cadherin, als ein Zielgen der E-Cadherin Signalkette

Nachdem eine Signalkette ausgehend von E-Cadherin ermittelt werden konnte, suchten wir zusätzlich neben IL-8 nach einem weiteren Zielmolekül in dieser Signalkaskade. Diese Daten sind bereits zur Veröffentlichung eingereicht und befinden sich im Anhang III dieser Dissertation.

Der *Switch* der Cadherin Klasse von E-Cadherin zu N-Cadherin während der Entstehung des Melanoms ist bereits beschrieben worden. Dieser Vorgang ist nicht nur aus der Krebsentstehung bekannt, sondern läuft auch während der Embryogenese ab. Klassisch wird das Annehmen der mesenchymalen Eigenschaft von Zellen und der Verlust der epithelialen Morphologie als EMT (epitheliale-mesenchymale Transition)

bezeichnet. Ob sich der Wechsel der Cadherin Expression eventuell direkt beeinflussen kann, wurde von uns als nächstes analysiert. Es interessierte uns, ob der Verlust der E-Cadherin Expression im Melanom direkt mit der N-Cadherin Expression korrelierte. Und, ob E-Cadherin die N-Cadherin Expression regulieren kann.

Dem Molekül Twist wurde bisher eine Rolle bei der N-Cadherin Regulation zugewiesen. Twist ist während der Gastrulationsphase in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* für die Aktivierung der N-Cadherin Expression verantwortlich (Oda et al., 1998). Außerdem wird Twist eine Aufgabe während des Wechsels der Cadherin Klasse von E-Cadherin zu N-Cadherin bei der epithelialen-mesenchymalen Transition in *Drosophila melanogaster* und auch weiterer Organismen wie *C. elegans*, *G. gallus* oder *M. musculus* usw. zugewiesen (Castanon und Baylies, 2002). Wir spekulierten, dass E-Cadherin ein Repressor von Twist ist. Außerdem vermuteten wir, dass nach dem Verlust von E-Cadherin die N-Cadherin Expression durch Twist stimuliert wird. Unsere Daten, die nicht publiziert sind, zeigten jedoch keine Beteiligung von Twist an der N-Cadherin Regulation, während der Entstehung vom malignen Melanom. Wir konnten zwar zeigen, dass Twist in unseren Melanomzelllinien, im Vergleich zu Melanozyten, exprimiert wurde und dieses Expressionsmuster mit der N-Cadherin Expression übereinstimmte. Die Regulation von Twist durch E-Cadherin konnte in unseren Zellen aber bisher nicht gefunden werden. Melanomzellen unserer Modellsysteme, mit E-Cadherin Reexpression, zeigten ebenfalls eine Twist Expression. Dieses würde bedeuten, dass in diesen Modellzellen neben E-Cadherin auch die N-Cadherin Expression hochreguliert ist, was nicht der Fall war. Es erfolgte also die Suche nach einem weiteren Modulator des Cadherin Klassen *Switches*. Es sollte geklärt werden, ob NFkappaB eventuell die N-Cadherin Expression regulierte.

Die Beteiligung von NFkappaB zur Vermeidung von Apoptose bei der Entstehung von Krebs ist vielfach erwähnt worden. Auch das Mitwirken von NFkappaB an der Progression vom malignen Melanom wurde beschrieben. Aber die Teilnahme von NFkappaB an Prozessen der epithelialen-mesenchymalen Transition ist eine relativ neue Erkenntnis (Huber et al., 2004). Wirth *et al.*, konnten am Mammakarzinom zeigen, dass die Inhibierung von NFkappaB die EMT verhinderte. Daher vermuteten wir, dass der Verlust von E-Cadherin und die Expression von N-Cadherin im malignen Melanom im engen Zusammenhang stehen könnten und dieses durch NFkappaB reguliert wird.

Die Reexpression von E-Cadherin in den Melanom Modellsystemen führte tatsächlich dazu, dass die endogene N-Cadherin Expression unterbunden wurde. Sowohl die transiente Expression von E-Cadherin, als auch die Expression von E-Cadherin in den stabilen asSNAIL Zellklonen führten zu einer verminderten endogenen N-Cadherin

Expression, im Vergleich zu der Ursprungszelllinie Mel Im (Kuphal und Bosserhoff, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, im Anhang III, Seite 5 und Abbildung 4). Analysen des N-Cadherin Promotors durch Luciferase Aktivitätsassays zeigten auch eine verminderte N-Cadherin Promotor Aktivität in E-Cadherin exprimierenden Zellen (Kuphal und Bosserhoff, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang III, Seite 5). Auch der zytoplasmatische Teil von E-Cadherin hatte einen Einfluß auf die endogene N-Cadherin Expression in den Melanomzellen. Die in Kapitel 3.1 beschriebenen Mel Im Zellklone E-Cadherin CDc, CDd, CDe und E-Cadherin M2, M3, M7 wiesen nach ihrer zytoplasmatischen E-Cadherin Expression verminderte Proteinmengen des Zelladhäsionsmoleküls N-Cadherin auf (Abbildung 19). Quantitative Echtzeit PCR mit Primern für N-Cadherin und Western Blots mit einem Antikörper gegen N-Cadherin, zeigten verminderte RNA- und Proteinmengen in den generierten Zellklonen im Vergleich zu der Ursprungszelllinie Mel Im, die eine hohe N-Cadherin Expression aufwies (Kuphal und Bosserhoff, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang III).

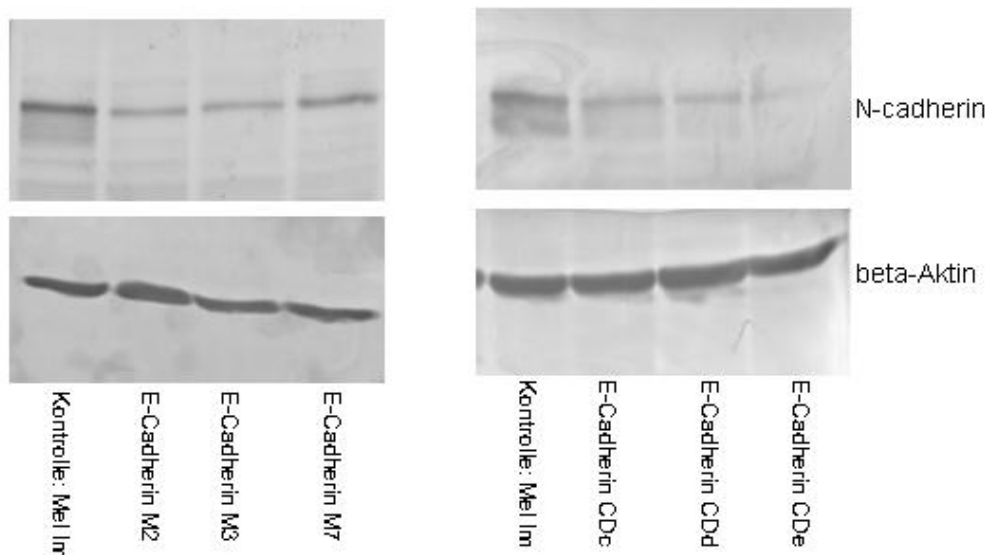


Abbildung 19: Western Blot mit anti-N-Cadherin Antikörper, der eine verminderte N-Cadherin Proteinmenge in den Zellklonen zeigt, die zytoplasmatisches E-Cadherin exprimieren. Die Ursprungszelllinie Mel Im exprimiert viel N-Cadherin. E-CadherinM=*membrane bound cytoplasmic* E-Cadherin; E-Cadherin CD=*soluble cytoplasmic* E-Cadherin. Beta-Aktin dient der Ladekontrolle (Kuphal und Bosserhoff, 2005, zur Veröffentlichung eingereicht).

Für diese Zellklone wurde in Luciferase Reporterassays auch eine verminderte N-Cadherin Promotor Aktivität gemessen (Kuphal und Bosserhoff, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang III, Seite 5, Abbildung 4D).

Das NFkappaB die N-Cadherin Expression regulierte, haben wir durch Luciferase Aktivitätsassays zeigen können. In diesen Assays wurde allerdings der Promotor des *G. gallus* untersucht. Der klonierte Promotor wurde uns freundlicherweise von der

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Goltzmann zur Verfügung gestellt. Der humane und der *G. Gallus* N-Cadherin Promotor haben eine Homologie von 40% (Alignment der Sequenzen mit dem Programm *DNAMAN*). Nach der Transfektion der Untereinheiten p50 und p65 (NFkappaB) in die Melanomzelllinien Mel Im und Mel Ei und den Kolonzelllinien SW480 und CaCo-2, konnte der N-Cadherin Promotor in Luciferase Assays aktiviert werden. Die Analyse der Kolonzelllinien zeigte, dass es sich bei N-Cadherin Regulation um ein Zelltyp unabhängiges Ereignis handelte.

Die adenovirale Transduktion eines rekombinanten, replikationsdefizienten Vektors (Ad5IkappaB), der zur Expression eines nicht-degradierbaren IkappaB im Zytoplasma führte, und die Untereinheiten p50 und p65 von NFkappaB im Zytoplasma zurück halten kann, führte im Vergleich zu Kontrolltransduktionen (Ad5LacZ) zu einer Inhibition der N-Cadherin Expression. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Transduktion wurde die Expression des NFkappaB Zielgens IL-8 und des NFkappaB unabhängigen Gens MMP-1 in quantitativer Echtzeit PCR überprüft. Nach Inhibierung der NFkappaB Aktivität kam es zur direkten Unterdrückung der IL-8 und N-Cadherin Expression sowohl nach 24, als auch 48 Stunden. Zusätzlich wurde der Inhibitor MG-132 angewandt, der die Degradation von Ubiquitin konjugierten Proteinen inhibierte. Das bedeutet, dass nach Inkubation der Zellen mit MG-132 auch die Degradation von IkappaB nicht mehr stattfand und stabilisiertes IkappaB in der Lage war, p50 und p65 im Zytoplasma zurück zu halten. Nach der Verminderung der NFkappaB Aktivität für 4 und 8 Stunden, kam es zu einer verminderten N-Cadherin Expression. Daraus schlossen wir, dass E-Cadherin zunächst die NFkappaB Aktivität verminderte, wie es in Abbildung 18 dargestellt ist. Anschließend wird durch die verminderte transkriptionelle Aktivität von NFkappaB die N-Cadherin Expression unterbunden. Umgekehrt führte die Initiierung der NFkappaB Aktivität mit Hilfe von LPS (Lipopolysaccharid) und TNF-alpha in NHEM zu einer Induktion der N-Cadherin Expression, wie quantitative Echtzeit PCR's bestätigten. Melanomzellen, die keine E-Cadherin Expression aufweisen, haben somit eine erhöhte NFkappaB Aktivität, die die Expression von N-Cadherin fördert (Kuphal und Bosserhoff, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang III, Seite 5-6).

Um nun festzustellen, ob der Signalweg von E-Cadherin, der die NFkappaB Aktivität drosselte, auf die Expression von N-Cadherin einwirkt, haben wir zunächst mögliche NFkappaB Bindungsstellen im humanen und *G. gallus* N-Cadherin Promotor gesucht. Die Suchmaschine Genomatix/MatInspector (www.genomatix.de) fand eine mögliche NFkappaB Bindungsstelle im humanen N-Cadherin Promotor mit der Konsensussequenz: 5'-GGGGAGCGCC-3' und im Huhn N-Cadherin Promotor wurden die NFkappaB Bindungsstellen 5'-GGGCACGATCC-3' und 5'-GGGCTGGGGCC-3'

ermittelt. EMSA Experimente zeigten, dass NFkappaB Untereinheiten aus Kernextrakten von Melanomzellen tatsächlich an die ermittelten Konsensussequenzen im N-Cadherin Promotorbereiche binden konnten. Das war der direkte Beweis für eine NFkappaB Regulation des endogenen N-Cadherin Promotors und auch der Regulation des N-Cadherin Promotors durch E-Cadherin Reexpression in Melanomzellen (Kuphal und Bosserhoff, 2005 zur Veröffentlichung eingereicht, Anhang III).

Die Abbildung 18 lässt sich also folgendermaßen erweitern: durch den Verlust der E-Cadherin Expression im Melanom wird die Aktivität von der MAP Kinase p38 gesteigert, die wiederum die transkriptionelle Aktivität von NFkappaB anregt. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Expression von endogenem N-Cadherin und dem sogenannten Cadherin *Switch*. Dadurch exprimieren Melanomzellen N-Cadherin und erlangen veränderte Adhäsionseigenschaften, die sie in Kontakt zu Fibroblasten und Endothelzellen in der Dermis treten lassen.

4 Ausblick

Fortführende Arbeiten sollen den komplizierten Mechanismus der E-Cadherin Signalkaskade weiter aufklären. Bislang fehlt die Charakterisierung weiterer Moleküle, die im Zytoplasma vermittelnde Eigenschaften für die Weitergabe der Phosphorylierung von p38 auf NFkappaB übernehmen. Auch die Signalübermittlung durch zytoplasmatisches beta-Catenin ist bisher ungeklärt.

Desweiteren fehlt die Klärung der Regulation der neuen Zielgene von Snail. Die E-Cadherin Repression im Melanom ist bekannt, wie Snail aber die Aktivität der neuen Zielgene steigert, ist noch nicht bekannt. Entweder bindet Snail an den Promotor der Gene und wirkt im Fall von MMP-2, EMMPRIN, TIMP-1, SPARC, Notch4, RhoA und t-PA als Aktivator oder Snail benötigt weitere vermittelnde Moleküle für seine transkriptionelle Aktivität. Zuerst könnte durch computergestützte Analysen eine Promotorcharakterisierung der sieben Gene erfolgen, indem nach Bindungstellen für Snail gesucht wird. Auch der Einfluss von MIA auf die E-Cadherin Expression bleibt noch weiter zu untersuchen. Es ist noch nicht bekannt, wie MIA E-Cadherin reprimiert. Eventuell findet diese Regulation durch Snail statt.

Generell bleiben bezüglich der Entstehung des malignen Melanos noch viele Fragen offen. Auch der völlig veränderte Wnt/beta-Catenin/LEF/TCF Signalweg, der zur Ansammlung von beta-Catenin im Zytoplasma und nicht im Kern führt, ist ein sehr interessantes zu untersuchendes Phänomen.

5 Anhang

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Material

5.1.1.1 Allgemeine Materialien

Amersham, Braunschweig	[gamma ³² P]-dATP, 3000Ci/mmol, NICK™- Columns
VWR, Darmstadt	Agar für Bakterienkulturen
BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene Round- Bottom Tubes für Luc-Assay Lab-Teks Objektträger für Immunfluoreszenz, Matrigel der Boydenkammer
BD Transduction Laboratories	Anti E-Cadherin Antikörper
Biochrom AG, Berlin	Phenolrot (Zellkultur)
BioRad, Richmond, USA	Immun- Blot™ PVDF Membran
Biosource, International, USA	p-p38 Antikörper, p-p38 ELISA
Cambrex, Rockland, ME USA	SeaKem® LE Agarose
Calbiochem, San Diego USA	Inhibitoren SB203580, SB202190, PD98059, ProteoExtract™ Kit
Cell Signaling, Beverly, USA	ERK1/2-, P-ERK1/2-, p38-, P-SAPK/JNK-, IkkappaB-, p-AKT-, P-p65-Antikörper
Clontech, Palo Alto USA	Atlas™ human Cancer cDNA Expression Array (Clontech 7742-1)
DAKO, Glostrup, Dänemark	FITC-Anti-Rabbit Antikörper
Eastman Kodak, Rochester, USA	BioMax MR Film
Invitrogen, California, USA	SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase, SeeBlue® Plus2, Ready- Load™ 100 bp DNA Ladder, pcDNA3.1 Vektor, Novex® Lipofectamine PLUS™ Reagent, Lipofectamine™ Reagent, Geneticin

Millipore, Eschborn	Einmal-Sterilfilter (20µM, Millex GS)
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	DMEM, RPMI, Fötale Kälberserum, Trypsin, PBS, Penicillin/ Streptomycin
Pierce, München	BCA Protein Assay Kit
Promega, Heidelberg	Dual –Luciferase® Reporter Assay System, pRL-TK Vektor, pGL2-basic Vektor,
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium, IL-8 ELISA
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi Kit, RNeasy® Mini Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit
Roche Diagnostics, Mannheim	Restriktionsendonukleasen, Cut Buffer for Restriktion Enzymes, Taq-Polymerase, Ethidiumbromid, RNase A, Polynucleotid Kinase, LightCycler DNA Master SYBR Green I, Primer 'random' (#1034731), LightCycler Kapillaren
Rockland	p65 Antikörper
Roth, Karlsruhe	Roti® Load1 4x- Konz., Roti® Load 4x, nicht denaturierend
Santa Cruz Biotechnology	beta-Catenin Antikörper
Sigma, St. Louis, USA	Acrylamid 30 % Lösung und 40 % Lösung, HEPES, Bromphenolblau, NP-40, Trypsin, BSA, TEMED, Monoclonal anti-beta-Aktin Antikörper, beta-Catenin Antikörper, alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität
Sigma Genosys, Cambridge, England	Oligonukleotide
Stratagene, Heidelberg	Epicurian Coli® XL2- Blue MRF' Ultracompetent Cells, NFkappaB-Luc Vektor
Takara, Shiga, Japan	Inhibitorischer E-Cadherin Antikörper
Upstate, Waltham, USA	Anti-c-jun-, anti-P-c-jun-Antikörper
Vector Laboratories, Burlingame, USA	VectaShield Mounting Medium
Whatman International Ltd, Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier, Nucleopore® Track- Etch Membrane
Zymed Laboratories Inc, San Francisco, USA	BCIP/NBT Substrate Kit

5.1.1.2 Geräte

Blotapparaturen:

Whatman Biometra, Göttingen

Minigel Twin, Fastblot B34

Gelelektrophoreseapparaturen:

BioRad, München

Wide Mini Sub[®] Cell GT

Heiz- und Kühlblöcke:

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer 5436, Thermomixer comfort,
Thermomixer compact

Mikroskope:

Leitz, Wetzlar

Labovert FS, Aristoplan

Zeiss, Jena

Axiovert 10, ICM 405,
Axioplan Epifluorescence Mikroskop,
Axiovert S100 plus Visitron Systems GmbH
(Puchheim) für das UV-System und die
Software

Spannungsgeräte:

Amersham Pharmacia Biotech, Little
Chalfont, England

Electrophoresis Power Supply 1001,
Electrophoresis Power Supply 301

BioRad, München

Modell 200/2.0 power supply, Consort E455

Waagen:

Sartorius, Göttingen

R160P, L2200S

Zentrifugen:

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5415C, MiniSpin Plus

Hereaeus, Hanau

Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0

Kisker, Steinfurt

Tischzentrifuge

Roche Diagnostics, Mannheim

LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte:Amersham Pharmacia Biotech, Little
Chalfont, England
Bachofer, Reutlingen

UV-Photometer Ultraspec II

UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm

Berthold, Wildbad

Geiger-Zähler LB122, Luminometer Lumat
LB 9507

Bühler, Edmund, Tübingen

Schüttler SM 25

Eastman Kodak, Rochester, USA

Entwicklermaschine X-Omat 2000 Processor

Heidolph, Kehlheim

Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer
REAX 2000

Kendro Laboratories, Hanau

Sicherheitswerkbank HerasafeKS,
Zellinkubator CO₂- Auto- Zero

Hoefer

Geltrockner Slab Gel Dryer GD 2000

IKA-Labortechnik, Staufen

Schüttler IKA-Vibrax VXR

MJ Research, Waltham, USA

Peltier Thermal Cycler PTC- 200

MWG Biotech, Ebersberg

ELISA-Reader Emax,
Geldokumentationssystem 2001i

Roche Diagnostics, Mannheim

LightCycler II

Savant, New York, USA

Speedvac Concentrator SC 110

Tuttnauer/Systec, Wettenberg

Autoklav 2540 EK

WTW, Weilheim

pH-Meter pH522

5.1.1.3 Organismen

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

5.1.1.4 Säugerzelllinien

CaCo-2	ATCC-Nr.: HTB-37, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus primärem kolorektalem Adenokarzinom
HCT116	ATCC-Nr.: CCL-229, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus primärem kolorektalem Karzinom
HMB2	Humane Melanomzelllinie aus einer Metastase eines Melanoms
HT29	ATCC Nr.: HTB-38, Humane Kolonkarzinom Zelllinie aus primärem kolorektalem Adenokarzinom
HTZ 19d	Humane Melanomzelllinie aus Hirnmetastase eines Melanoms
LoVo	ATCC-Nr.: CCL-229, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus Metastase eines kolorektalen Adenokarzinoms
Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	DSMZ Nr.: ACC62, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus einer Metastase eines Melanoms
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus einer Metastase eines Melanoms
Mel Juso	DSMZ Nr.: ACC74, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Melanozyten	Humane primäre Melanozyten aus normaler Haut (NHEM)
Sk Mel3	ATCC Nr.: HTB-69, Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase eines Melanoms
Sk Mel28	ATCC Nr.: HTB-72, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
SW480	ATCC-Nr.: CCL-228, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus primärem kolorektalem Adenokarzinom
SW48	ATCC-Nr.: CCL-231, Humane Kolonkarzinomzelllinie aus primärem kolorektalem Adenokarzinom

5.1.1.5 Vektoren

Luciferase Assay: pRLTK

Für die Transfektionskontrolle bei der Durchführung des Luciferase Assays wird der kommerziell erhältliche pRLTKVektor (Promega), der das Renilla Luciferase Gen aus *Renilla renifor* enthält, benutzt.

Der Vektor pGL₃basic ist kommerziell bei Promega erhältlich und enthält eine modifizierte Kodierungsregion des Luciferase-Gens des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*.

Snail Vektor

Der Vektor pcDNA₃-hsSNA trägt die antisense Sequenz eines Teils des humanen *Sna* Gens, die dem humanen *Snail* Gen homolog ist (EMBL/ Gen-Bank, ACC-Nr. AF131208). Die Sequenz entspricht 350bp des Gens und 150bp Intron Sequenz und wurde mit Apal in den Vektor pCDNA₃ kloniert. Der Vektor (Invitrogen) hat eine Größe von 5400 bp und das gesamte cDNA Fragment hat eine Größe von 500 bp. Der Vektor wurde uns von der Arbeitsgruppe von Dr. Antonio Garcia de Herreros zur Verfügung gestellt (Batlle et al., 2000).

Als sense Snail Vektor lag der Vektor pCDNA₃-mmSnail-HA vor. Dieser Vektor enthält das homologe Snail Gen aus *Mus musculus* (EMBL/ Gen-Bank, ACC X67253). Die Sequenz besteht aus 800bp und wurde mit den Restriktionsenzymen BamH1 und EcoRV kloniert.

Full-length E-Cadherin Vektor

Der E-Cadherin Vektor enthält in den Vektor pBAT klonierte cDNA des gesamten *E-Cadherin* Gens (EMBL/ Gen-Bank, ACC Z13009). Der Vektor wurde uns von Gabriele Handschuh zur Verfügung gestellt (Handschuh et al., 1999).

Beta-Catenin und gamma-Catenin Vektoren

Die Vektoren wurden uns von Eric Fearon, Universität Michigan Medical School, USA zur Verfügung gestellt. Das humane beta-Catenin Gen (CTNNB1) (EMBL/ Gen-Bank, NM_001904) wurde mittels PCR amplifiziert und das vollständige Gen von 2300 bp mittels BamHi und NotI in den Vektor pcDNA₃ kloniert. (Caca et al., 1999)

N-Cadherin-Promotor-LUC

Der Vektor N-Cadherin Luc enthält den Promoter des Hühner N-Cadherin Promotors einkloniert. Der Vektor wurde uns von Prof. Dr. Goltzman zur Verfügung gestellt. (Li et al., 1997; Panda et al., 2001).

E-Cadherin CD und E-Cadherin M

Die E-Cadherin CD und E-Cadherin M Vektoren enthalten die humane Sequenz, die den zytoplasmatischen Teil des humanen E-Cadherin codiert (EMBL/ Gen-Bank, ACC Z13009). Der Vektor E-Cadherin CD exprimiert die Aminosäuren 731-883 des zytoplasmatischen E-Cadherin Teils. Der Vektor E-Cadherin M exprimiert lipophiles zytoplasmatisches E-Cadherin der gleichen Aminosäuresequenz, welches in die Zytoplasmamembran integriert. Die Myristinsäure sorgt für das lipophile Verhalten des zytoplasmatischen E-Cadherins und wurde nach (Aronheim et al., 1994) kloniert.

Die Vektoren wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Wheelock zur Verfügung gestellt (Nieman et al., 1999).

5.1.1.6 Oligonukleotide für EMSA

NFkappaB for.

5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

NFkappaB rev.

5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'

N-Cadherin Promotor Konsensus NFkappaB human for.

5'-GCTCTTGGGGAGCGCCATCCGCTC-3'

N-Cadherin Promotor Konsensus NFkappaB human rev.

5'-GAGCGGATGGCGCTCCCCAAGAGC-3'

N-cadherin Promoter Konsensus NFkappaB chicken I for.

5'-GCGTGCAGCAGGGCTGGGGCCGGGGC-3'

N-cadherin Promoter Konsensus NFkappaB chicken I rev.

5'-GCCCCGGCCCCAGCCCTGCTGCACGC-3'

N-cadherin Promoter Konsensus NFkappaB chicken II for.

5'-GGAGAGGGGCGGGCACGATCCGGGC-3'

N-cadherin Promoter Konsensus NFkappaB chicken II rev.

5'-GCCCCGATCGTGCCCGCCCCTCTCC-3'

5.1.1.7 Oligos für PCR und quantitative Echtzeit PCR

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA Genosys, England synthetisiert. Es wurde eine 100µM Stammlösung der Oligonukleotide durch lösen in H₂O hergestellt und bei -20°C gelagert.

beta-Aktin for. 5'-CTACGTGGCCCTGGACTTCGAGC-3'

beta-Aktin rev. 5'-GATGGAGCCGCGGATCCACACGG-3'

beta-Catenin for. 5'-GGTCCTCTGTGAACTTGCTCAGGAC-3'

beta-Catenin rev. 5'-CTGGATAGTCAGCACCAGGGTGGTG-3'

Snail 1 for.	5'-AATCGGAAGCCTAACTACAAG-3'
Snail 1 rev.	5'-AGGAAGAGACTGAAGTAGAG-3'
E-Cadherin n-term for.	5'-ATCCTCCGATCTTCAATCCCACCAC-3'
E-Cadherin n-term rev.	5'-GTACCACATTCGTCACTGCTACGTG-3'
E-Cadherin c-term for ²⁴¹⁵	5'- ACCAGGACTTTGACTTGAGC-3'
E-Cadherin c-term rev ²⁶⁵⁷	5'-GACTAGCAGCTTCGGAAC-3'
E-CadherinMTeil for ⁴	5'- GGGAGTAGCAAGAGCAAGC-3'
E-CadherinMTeil rev ²³⁹	5'- GGGACACTCATGAGGGTTG`-3'
N-Cadherin n-term for.	5'- TGGATGAAGATGGCATGG-3'
N-Cadherin n-term rev.	5'- AGGTGGCCACTGTGCTTAC`-3'
N-Cadherin c-term for.	5'- GGACTATGACTTGAGCCAGC-3'
N-Cadherin c-term rev.	5'-TTGTCAGCCGCTTTAAGG-3'
EMMPRIN for.	5'-CCATGGGCACGGCCAACATCCAG-3'
EMMPRIN rev.	5'-GATCGGCCTCCATGTTTCAGGTTCTC-3'
MMP-1 for.	5'-TCACCAAGGTCTCTGAGGGTCAAGC-3'
MMP-1 rev.	5'-GGATGCCATCAATGTCATCCTGAGC-3'
MMP-2 for.	5'-GCTGGGAGCATGGCGATGGATA-3'
MMP-2 rev.	5'-GGACAGAAGCCGTA CTTGCCATC-3'
Notch 4 for.	5'-GGA ACTCGATGCTTGTCAGTCCC-3'
Notch 4 rev.	5'-CACTGGCAGTAGAAGGCATTGGC-3'
tPA for.	5'-GCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGA-3'
tPA rev.	5'-GTCGGGTGTTCTGCTCACGGTCG-3'
Rho A for.	5'-GAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTG-3'
Rho A rev.	5'-TTTCACCGGCTCCTGCTTCATCTTGG-3'

TIMP 1 for.	5`-CCAGAAGTCAACCAGACCACC-3`
TIMP 1 rev.	5`-GGGCAGGATTCAGGCTATCTG-3`
Osteonectin (Sparc) for.	5'-CACCACTGCAAACACGGCAAGGTG-3'
Osteonectin (Sparc) rev.	5'-AGGGTGACCAGGACGTTCTTGAGC-3'

5.1.1.8 Medien zur Anzucht von *E.coli* und Säugerzellkulturen

Luria Bertani Medium	<p>10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl</p> <p>Für Platten: + 15g/l Agar Zur Selektion: + 100µg/ml Ampicillin</p> <p>Alle Zutaten des LB Mediums wurden in H₂O gelöst und autoklaviert, für Agarplatten wurde noch zusätzlich Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.</p>
DMEM	<p>Pulver in demineralisiertem Wasser lösen, pH mit NaHCO₃ auf 7,3 einstellen, sterilfiltrieren; Zusätze: 10% (v/v) FKS 0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin 0,0005% (w/v) Phenolrot</p>
RPMI	<p>Pulver in demineralisiertem Wasser lösen, pH mit NaHCO₃ auf 7,8 einstellen, sterilfiltrieren; Zusätze: 10% (v/v) FKS 0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin 0,0005% (w/v) Phenolrot</p>
Einfriermedium	<p>Pro 100 ml: 50 ml DMEM (mit 10 % FKS) 30 ml FKS 20 ml DMSO</p>

5.1.1.9 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)

5.1.1.10 Puffer und Lösungen

RNase A Lösung	10 mM Tris/ HCl pH 7,0 10 mg/ ml RNase A DNAsen werden durch 15min 100°C inaktiviert
----------------	---

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) Sucrose
Ethidiumbromidlösung	0,04% in H ₂ O bidest

Lösungen für die Zellkultur:

PBS (Phosphate buffered saline)	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ wurde als Pulver bezogen, in destilliertem Wasser gelöst; pH-Wert mit NaHCO ₃ auf 7,6 eingestellt; Lösung sterilfiltriert
---------------------------------	--

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 und Gele für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
(Proteinauftrennung):**

SDS-Page-Laufpuffer (Elektrodenpuffer)	3g Tris/HCl (25 mM Tris/HCl pH 8,5) 14,4g Glycin (200 mM Glycin) 1g SDS (0,1% (w/v) SDS) mit H ₂ O auf 1l auffüllen
12,5%-Trenngel	31,25% (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid 40% 37,5% (v/v) 1 M Tris pH 8,8 (375nM) 0,1% (v/v) SDS (350nm) 0,05% (v/v) APS (550nM) 0,05% (v/v) TEMED
4%-Sammelgel	10% (v/v) Acrylamid:Bis 40% 12% (v/v) 1 M Tris pH 6,8 (120mM) 0,1% (v/v) SDS (350 nM) 0,05% (v/v) APS (550nM) 0,05% (v/v) TEMED
APS-Lösung(10%)	1g Ammoniumpersulfat in 10ml H ₂ O
Western Blot-Transferpuffer (Blotpuffer)	10% (v/v) Methanol 25 mM Tris 190 mM Glycin
PBS (10x)	80g/l NaCl (1370nM) 2,0g/l KCl (27mM) 14,4g/l Na ₂ HPO ₄ (80mM) 2,4g/l KH ₂ PO ₄ (18mM) mit HCl auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren
Blockierungslösung	3% BSA in PBS oder 3% Milchpulver in PBS

Lösungen für Isolation von Kernproteinen und Puffer für Gelshift Assay (EMSA)

Kernprep Lysispuffer I	10 mM HEPES- NaOH pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA pH 8,0 0,01 mM EGTA pH 8,0
Kernprep Lysispuffer II	20 mM HEPES- NaOH pH 7,9 0,4 M NaCl 1 mM EDTA pH 8,0 1 mM EGTA pH 8,0
EMSA Binding buffer (5x)	25 mM HEPES pH 7,9 250 mM KCl 25 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 50% Glycerin 25 mM DTT
EMSA Loading buffer	80 % Formamid 10 mM NaOH 1 mM EDTA 0,1 % Bromphenolblau
TBE (10x)	890 mM Tris 890 mM H ₃ BO ₃ 2 mM EDTA
TE Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA

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
-------------	--

5.1.2 Methoden

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

5.1.2.1 Arbeiten mit *Escherichia Coli*

5.1.2.1.1 Kultivierung

Je nach Verwendungszweck erfolgte die Anzucht von *E.coli* auf festen Nährboden oder in flüssiger Schüttelkultur. Zur Isolation von transformierten Bakterien wurde zusätzlich zum Nährmedium ein Selektionsantibiotikum (Kanamycin oder Ampicilin) zugesetzt. Zum Animpfen von Schüttelkulturen wurde eine Einzelkultur mit einer sterilen Spitze gepickt, 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.

5.1.2.1.2 Transformation von *E.coli*

Zur Transformation kompetenter *E.coli* wurden je 100ng Plasmid-DNA zu 100µl kompetenten Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, 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 kühlten die Bakterien eine Minute auf Eis ab und es wurden pro Ansatz 500µl LB Medium zu gegeben und die Kultur 60 Minuten lang bei 37°C unter Schütteln wachsen gelassen. Die transformierten *E.coli* wurden dann fünf Minuten bei 4000 rpm/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium wieder resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Das Ausplattieren der Zellen erfolgte auf einem selektierenden Medium mit dem Antibiotikum, für das ein Resistenzgen in der eingebrachten Plasmid-DNA vorlag.

5.1.2.2 Molekularbiologische Methoden

5.1.2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Polymerasen sind Enzyme, die einen neuen DNA-Strang anhand des komplementären DNA- oder RNA-Matritzenstranges (*Template*) synthetisieren. Eine von drei in der Gentechnik routinemäßig eingesetzten Polymerasen ist die DNA-Polymerase I. Man verwendet thermostabile DNA-Polymerasen aus Bakterien, die normalerweise in heißen Quellen vorkommen. Aus dem Organismus *Thermus aquaticus* wird die *Taq*-Polymerase isoliert, die an den Enden des neu gebildeten DNA-Fragmentes Überhänge herstellt.

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode, die der selektiven Amplifikation eines DNA-Abschnittes dient. Der DNA-Abschnitt liegt zwischen zwei gegenläufigen *Primern* (Oligonukleotiden), die zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz jeweils zu einem der Doppelstränge komplementär sind. Der Start der Polymerase-Ketten-Reaktion erfolgt bei einer Temperatur von ca. 94 °C, bei der die Denaturierung des DNA-Doppelstranges des *Templates* einsetzt. Anschließend findet die Hybridisierung der im Überschuß zugegebenen *Primer* an das *Template* statt. Die Hybridisierungsbedingungen liegen 5-10 °C unter der Schmelztemperatur des *Primers*. Die *Primer* führen dann, bei einer Temperatur von ca. 72 °C, zur Gegenstrangsynthese durch die hitzestabile DNA-Polymerase. Die so neu entstandenen DNA-Doppelstränge werden denaturiert und stellen die Ausgangsmoleküle für eine erneute Gegenstrangsynthese dar. Der beschriebene Zyklus der Doppelstrang-Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung (*Annealing*) und Gegenstrangsynthese führt zu einer Verdopplung der gewünschten DNA-Sequenz. Durch Wiederholung von 20-50 der beschriebenen Zyklen kommt es daher zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Ziel-DNA, also einer millionenfachen Amplifikation.

Bei der Auswahl der *Primer* sind einige Grundregeln zu beachten. Die Oligonukleotide sollten mindestens über einen Bereich von 15 Nukleotiden komplementär zur Zielsequenz sein, damit eine spezifische Bindung an die Zielsequenz gewährleistet ist. Wird außerdem eine neue Restriktionsschnittstelle durch den *Primer* eingefügt, welche eine andere Sequenz besitzt als der Randbereich des *Templates*, so sollte sich der Nukleotidaustausch (sogenannte *mismatch*) im Idealfall am 5'-Ende des *Primers* befinden. Wenn der *Primer* nicht optimal am 5'-Ende des *Templates* paßt, werden für die bessere Hybridisierung der *Primer* in folgenden Zyklen, zusätzliche Nukleotide (C oder G) an das 5'-Ende des Oligonukleotides angefügt.

Pipettierung eines 50 µl Reaktionsansatzes:

Template DNA (2 µg chromosomale DNA, 10 ng Plasmid-DNA)
 5 µl 10 x *Taq*- Polymerase Puffer
 0,5 µl dNTP, jedes 10 mM
 1 µl 5'-*Primer* (20mM)
 1 µl 3'-*Primer* (20mM)
 0,1 µl *Taq*-Polymerase (1 U)
 ad 50 µl ddH₂O

Das Programm am Thermocycler muß entsprechend der *Primer* und der Schmelztemperatur gewählt werden. Beispielhaft dargestellt ist folgendes

Programm für eine PCR-Standardreaktion:

94°C 5:00min (Denaturierung der Ziel-DNA)

94°C 0:30min (Denaturierung der Doppelstränge)

62°C 0:45min (Hybridisierung der *Primer*)

72°C 0:45min (Synthese des Gegenstranges)

} 30 x

4°C (Beendigung der Synthese)

Nach Ablauf der PCR werden 10 µl des Ansatzes auf einem analytischen Agarosegel überprüft.

5.1.2.2 Quantitative Echtzeit 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 5.1.2.4.1 beschriebenen Protokoll.

Das LightCycler System erlaubt eine quantitative und qualitative PCR mit Hilfe des Farbstoffes Sybr Green I. Dieser fluoresziert nur, wenn er an den Doppelstrang DNA (dsDNA) gebunden ist. Die Qualität des Produktes kann anhand der ermittelten Schmelzkurve überprüft werden, denn im Anschluß an die letzte Elongationsphase der PCR wurde jeweils eine Schmelzpunktanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produktes durchgeführt. Jedes Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur (T_M), die sowohl von seiner Produktlänge als auch vom GC-Gehalt abhängig ist.

Der Beginn der exponentiellen Produktzunahme, der linearen Logphase der PCR, wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme bestimmt und entspricht dem sogenannten *crossing point*. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden

cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden.

Die quantitative RT- PCR Reaktion wurde in einem 20µl Ansatz durchgeführt, mit den folgenden Reaktionszutaten:

10ng cDNA Template
2µl LightCycler DNA Master SYBR Green I (10x)
1,5µl MgCl₂ (25mM)
je 0,5µl der Primer (20mM)

Der Ansatz wurde mit sterilem, im LightCycler DNA Master SYBR Green I Kit enthaltenen H₂O auf 20µl aufgefüllt.

Der Versuchsansatz wurde dabei folgendem Programm im LightCycler II unterzogen:

Denaturierung: 1 Zyklus: 20°C/ s auf 95°C, 30 s
Amplifikation: 40 Zyklen: 20°C/ s auf 95°C, 15 s
20°C/ s auf 60°C, 5 s
20°C/ s auf 72°C, 10 s

Meßtemperatur: 20°C/ s auf 82°C

Analyse der Schmelzkurve:

1 Zyklus: 20°C/ s auf 95°C, 15 s
20°C/ s auf 65°C, 15 s
20°C/ s auf 95°C, 15 s
0,1°C/ s auf 40°C

Als Standard zur Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde das Haushaltsgen beta-Aktin benutzt.

5.1.2.2.3 Agarosegel zur Auftrennung von DNA

Die DNA trägt eine negative elektrische Ladung, deshalb wandert sie im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Das Gel enthält ein kompliziertes System von Poren, und durch diese Öffnungen müssen die DNA-Moleküle wandern, um die positive Elektrode zu erreichen. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es sich durch das Gel bewegen. Deshalb werden DNA-Moleküle in der Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 60 kb können durch die Agarosegele unterschieden werden. In der Praxis bestimmt die Zusammensetzung des Gels den Trennbereich der DNA-Moleküle. Ein Gel aus 0,3%iger Agarose benutzt man für die Auftrennung von Molekülen im

Größenbereich zwischen 5 und 60 kb. Ein Gel aus 1%iger Agarose dient der Trennung von DNA-Molekülen mit einer Größe von 200 bp bis 12 kb.

Die benötigte Menge Agarose wird in 1 x TAE-Lösung durch mehrmaliges Aufkochen gelöst und in einen Flachbettschlitten gegossen. Zur Herstellung der Geltaschen wird ein Kamm in die noch nicht ausgehärtete Agarose eingefügt. Die Auftragsproben werden mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und nach der Polymerisation des Gels in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei einer Stromstärke von 5 mA/cm Gellänge in 1 x TAE-Puffer.

Die einfachste Methode, um die aufgetrennte DNA sichtbar zu machen, ist die Färbung des Gels mit Ethidiumbromid-Lösung (3 µg/ml). Ethidiumbromid entwindet die DNA-Doppelhelix teilweise, weil es sich zwischen benachbarte Basenpaare schiebt (Interkalation). Anschließend wird das Gel unter UV-Licht bei 254nm photographiert, wobei das Ethidiumbromid UV-Licht absorbiert und im sichtbaren Bereich fluoresziert, wodurch die DNA als fluoreszierende Bande sichtbar wird.

5.1.2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit QIAex II

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgt nach dem QIAex II *Agarose Gel Extraction Protocol* der Firma QIAGEN. Durch die Bestandteile des *Extraction-Kits* wird die Agarose irreversibel verflüssigt, und die Nukleinsäuren adsorbieren quantitativ an dem QIAex II Siliciumgelpartikeln, während die Agarose verworfen wird. Die maximale Bindungskapazität der QIAex II Suspension liegt bei 5 µg DNA/10 µl Siliciumgel.

Nachdem das zu extrahierende DNA-Fragment gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter einer schwachen UV-Lampe mit einem Skalpell ausgeschnitten ist, wird die DNA, eingeschlossen in der Agarose, in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen.

Idealerweise hat das DNA-Fragment eine Größe von 100 bp bis zu 4 kb. In diesem Fall wird das dreifache Volumen an Puffer QX I zugegeben (andere Volumina sind der Tabelle des Protokolls zu entnehmen). Die Siliciumsuspension, auch Glasmilch genannt, wird resuspendiert und es werden ca. 20 µl (für 2-10 µg DNA) davon hinzugegeben. Während der Inkubation für 10 min bei 50°C wird die Probe alle 2 min durchmischt, um die Agarose zum Schmelzen zu bringen und die DNA an die Glasmilch zu binden. Anschließend wird für 30 Sek. bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, und der Überstand wird abgenommen. Das Pellet aus Glasmilch, an dem die DNA nun gebunden ist, wird mit 500 µl Puffer QX I gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand, der Agarosereste enthält, verworfen. Zusätzlich wird die Siliciumsuspension zur Entfernung der Salze zweimal mit 500 µl PE Puffer gewaschen. Nach dem Lufttrocknen der Pellets für 10-15 min wird dieses zur Elution der DNA in 20 µl

ddH₂O aufgenommen. Die folgende Inkubation erfolgt je nach Größe des DNA-Fragmentes (Tabelle im Protokoll) bei Raumtemperatur oder 50°C für 5-10 min.

Nach der Zentrifugation für 30 Sek. bei 13.000 rpm wird der Überstand, ohne dabei die Glasmilch aufzuwirbeln, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die extrahierte DNA kann nun für weiterführende Experimente verwendet werden.

5.1.2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit QIAquick

Für diese Methode wird die DNA, wie unter 5.1.2.2.3 beschrieben, aufgetrennt und die gewünschte Bande mit dem Skalpell ausgeschnitten. Das QIAquick *Gel Extraction Kit* der Firma QIAGEN enthält Säulen, an dessen Material die DNA bindet. Die Agarose wird, wenn 3 Volumenteile Puffer QG zugegeben sind, mittels Inkubation bei 50°C für 10 Minuten geschmolzen. Nach Überprüfung des pH-Wertes wird 1 Gelvolumen Isopropanol zugegeben und gemischt, was zu einer höheren DNA-Ausbeute führt. Die *SpinColumn* wird in einem 2 ml-Reaktionsgefäß plaziert und 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, nachdem der Ansatz auf das Säulenmaterial pipettiert worden ist. Die DNA bindet durch diese Zentrifugation an das Säulenmaterial und wird so von der Flüssigkeit getrennt. Abschließend wird die DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen und mit 50 µl Puffer EB oder ddH₂O durch Zentrifugation (1 Minute bei 13.000 rpm) eluiert.

5.1.2.3 Radioaktivität

5.1.2.3.1 Herstellung radioaktiv markierter EMSA Proben

Die radioaktive Markierung des doppelsträngigen (ds) DNA Oligos erfolgte durch eine *Blunt-End* Reaktion. Um ein dsDNA Stück zu generieren, wurden die *reverse* und *forward* Oligonukleotide im gleichen Verhältnis gemischt, auf 95°C erhitzt und beim langsamen Abkühlen des Heizblocks auf Raumtemperatur *annealt*. Die *blunt-ended* dsDNA wurde in folgendem Reaktionsansatz radioaktiv markiert:

3 µl dsOligonukleotid
2 µl Polynukleotidkinase Puffer (10x)
11 µl H₂O
1 µl Polynukleotidkinase
3 µl γ-³²P- ATP

Während der 30minütigen Inkubation bei 37°C wird eine radioaktiv markierte Phosphatgruppe durch die Polynukleotidkinase auf die dsDNA übertragen, das heißt die γ- Phosphatgruppe am 5'- Ende wird gegen ein ³²P ausgetauscht.

5.1.2.3.2 Reinigung radioaktiv markierter DNA Fragmente

Zur Abtrennung radioaktivmarkierter DNA-Fragmente von freien, nicht eingebauten Nukleotiden wurden NICK™- Columns der Firma Amersham verwendet. Dabei wurde die Pufferflüssigkeit aus den Säulen abtropfen gelassen, die ³²P Markierungsreaktion auf die Säule aufgebracht und mit 200µl TE- Puffer (pH 7,5) gespült. Diese erste Fraktion wurde aufgefangen und verworfen, da sie hauptsächlich aus Puffer mit nur geringen Anteilen an radiokativ markierter EMSA Probe bestand. Durch dreimalige Spülung der Säule mit je 200µl TE- Puffer konnten noch drei weitere Fraktionen gewonnen werden, wobei sich die benötigte markierte dsDNA Sonde in der dritten und vierten Fraktion befand. Freie Nukleotide wurden in der Säule zurückgehalten. Für die Gelshift Assays wurde jeweils diejenige Fraktion genutzt, die die höchste Effizienz der Markierung aufwies.

5.1.2.3.3 EMSA (Electrophoretic mobility Assay)

Um DNA-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* analysieren zu können, wurden Gelshift Assays 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 erfolgt über deren Radioaktivmarkierung. Synthetische Oligonukleotide wurden durch *Blunt-End* Reaktion (siehe 5.1.2.3.1) radioaktiv markiert.

Reaktionsansatz:

5-10µg Kernprotein
4µl 5x EMSA Binding Puffer
1µl Poly (dIdC) (1mg/ml)
1µl radioaktiv markiertes Oligonukleotid (20000cpm/µl)
auf 20µl mit H₂O auffüllen

Die Bindungsreaktion erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Zum Nachweis spezifischer Bindung von Proteinen an DNA wurde in Kontrollansätzen unmarkiertes Oligonukleotid in 50-200-fachem Überschuß als Kompetitor zugegeben. Die Ansätze wurden vor dem Auftragen auf ein natives, 4,5% Polyacrylamidgel mit 4µl Loading buffer (siehe 5.1.1.10) beschwert. Das Gel lief bei einer konstanten Spannung von 10V/cm in 1/4x TBE und wurde nach dem Trocknen autoradiographisch analysiert.

5.1.2.3.4 Nachweis radioaktiver Produkte durch Autoradiographie

Radioaktiv markierte Nukleinsäurebanden in Gelen oder auf Membranen lassen sich durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektieren. Durch die Strahlungsenergie der Radioisotope werden Silberhalogenidkristalle, die in die Festphase des Röntgenfilmes eingebettet sind, negativ geladen und zu metallischem Silber reduziert. Daraus ergibt sich ein latentes Bild aus Silberpartikeln. Die Entwicklung des Filmes verstärkt dieses Bild, und die anschließende Fixierung entfernt überschüssiges Silberhalogenid. Da die Filmschwärzung innerhalb eines bestimmten Strahlungsbereiches direkt proportional zur Menge an radioaktiver Strahlung ist, können Autoradiogramme quantitativ ausgewertet werden. Die Expositionszeit der auf den Röntgenfilm aufgelegten Membran oder Geles richtet sich nach der Qualität und Quantität der radioaktiven Strahlung.

5.1.2.4 RNA-Techniken

5.1.2.4.1 Reverse Transkription

Pro Reaktionsansatz wurde etwa 1µg Gesamt-RNA, die aus Zelllinien mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen extrahiert wurde, eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem 20µl Ansatz durchgeführt, mit dem folgenden Reaktionszutaten:

4µl First Strand buffer (5x)
2µl DTT (0,1M)
1µl dNTPs (10mM)
1µl dN₆ Primer (random 2mg/ ml)
11µl RNA + H₂O

Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Anschließend lässt man ihn kurz auf etwa 50°C abkühlen und gibt 1µl Superscript II zu. Die reverse Transkription erfolgte dann bei 37°C für 60 Minuten. Nach der Inkubation wurde eine zehnminütige Denaturierung des Enzyms bei 70°C durchgeführt, gefolgt von einem RNase Verdau mit 1µl RNase A Mix für 30 Minuten bei 37°C. Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

5.1.2.4.2 RNA Isolation aus Säugerzellen

Die Isolation von RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium von konfluent wachsenden Zellen abgenommen und die Kultur einmal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 1ml PBS von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgeschabt und bei 3000 rpm/min für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 350µl RNA Lysispuffer des RNeasy Kits resuspendiert und lysiert. Da sich die Zellen sehr leicht lysieren lassen, ist kein weiterer Schritt zum Zellaufschluß notwendig. Die RNA Isolation wurde nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die in 30µl H₂O eluierte, extrahierte RNA wurde bei -20°C eingefroren.

5.1.2.5 Proteinchemische Methoden

5.1.2.5.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurde das Kulturmedium von konfluent wachsenden Säugerzellen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Abschaben mit einem Zellschaber in 1ml PBS geerntet und bei 3000 rpm/ min für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200µl RIPA Puffer (siehe 5.1.1.10) lysiert und dazu 15 Minuten bei 4°C im Schüttelinkubator geschüttelt. Die gesamten Zellproteine kann man durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm/ min bei 4°C im Überstand gewinnen, während DNA, RNA und Zellbruchstücke sedimentiert werden. Der Proteinextrakt wurde in neue Gefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Alle Schritte der Präparation werden auf Eis, die Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt.

5.1.2.5.2 Herstellung von Kernproteinextrakten

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 1ml PBS abgekratzt und bei 3000 rpm/ min für 5 Minuten pelletiert. Zur Lyse der Zellmembran wurden 400µl Puffer I (Pufferzusammensetzung 5.1.1.10) zugegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation gibt man 10%iges Nonylphenylpolyethylene Glykol NP- 40 zu, ein nichtionisches Tensid, um die Lyse zu verbessern. Die Kerne wurden bei 10.000 rpm/ min für 1 Minute abzentrifugiert und der Überstand mit dem Zytoplasma verworfen. Das Kernpellet wurde durch Zugabe von 50µl Puffer II (Pufferzusammensetzung 5.1.1.10) lysiert, indem es 15 Minuten bei 4°C geschüttelt wurde. Um die Kerndebris zu entfernen, wurde 10 Minuten bei 13.000 rpm/ 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.

5.1.2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Gesamt- und Kernproteinen

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach der Methode von 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^+ (Biuret Reaktion) durch Proteine. Das Cu^+ bildet mit mit Bicinchromsäure (BCA) einen lila Farbkomplex, der durch photometrische Messung bei 562nm quantifiziert werden kann. Zu 5 μl Gesamtproteinlösung bzw. 1 μl Kernproteinlösung mit 4 μl Wasser, wurden 200 μl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in eine 96-Well Platte gegeben und ca. 30 Minuten bis zur Entwicklung einer lila Färbung bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messung bei 562nm in einem ELISA-Reader konnte die Absorption bestimmt werden, die durch parallele Quantifizierung von BSA-Standards über 3 Zehnerpotenzen in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden konnte.

5.1.2.5.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf Polyacrylamid Gelen (siehe 5.1.1.10) aufgetrennt werden, da durch die Anlagerung von SDS-Molekülen deren Tertiär- und Quartärstruktur zerstört, sowie Ladungsunterschiede neutralisiert werden. Die Proteinproben (Kernextrakte siehe 5.1.2.5.2 oder Zellysate, siehe 5.1.2.5.1) wurden jeweils in 1 x Roti-Load 10min bei 70°C aufgeköcht und anschließend bei 0,8mA/cm² durch SDS-PAGE auf PAA Gelen aufgetrennt.

5.1.2.5.5 Western Blot

Um durch SDS-Page aufgetrennte Proteine durch Antikörper nachzuweisen, wurden die Proteine zunächst auf eine PVDF-Membran geblottet. Hierzu wurde die PVDF-Membran 10min in Methanol und anschließend weitere 10 Minuten in 1x Western-Blot Puffer (5.1.1.10) inkubiert. Die PVDF-Membran und jeweils 2 x 2 Whatman Papiere werden dann auf das Format des SDS-Page-Gels zugeschnitten, so dass sich das SDS-Page-Gel letztlich zwischen den Whatman Papieren auf der PVDF-Membran befindet (sogenannte *Sandwich*-Methode) Danach werden die Proteine mittels elektrophoretischem Transfer (Whatman Biometra, Fastblot B34 Unit, 1h bei 1,5mA/cm²) auf die Membran übertragen.

5.1.2.5.6 Proteindetektion auf Western-Blots

Die Western Blot-Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h bei RT in PBS mit 3% BSA inkubiert und über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:1000-1:5000) geschwenkt. Nach dem Waschen (3x 10 min mit PBS) wurde die Membran mit einem, gegen den konstanten Teil des 1. Antikörpers gerichteten (speziesspezifischen), 2. Antikörper (1:4000), der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist, für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde nochmals gewaschen (3x 10 min mit PBS), das Substrat für die Alkalische Phosphatase (BCIP/ NBT Substrate Kit) zugegeben und 10 Minuten bis zu 2 Stunden inkubiert bis sich eine Farbreaktion zeigte.

5.1.2.5.7 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz werden die Zellen auf sogenannten "Lap Tek" (chamber cover slide) ausgesät, das sind Objektträger, auf denen 4-8 Felder durch "Stege" aus Plastik abgegrenzt sind. In diese Felder werden jeweils 20.000-50.000 Zellen ausgesät, die dann mit verschiedenen Antikörpern in der späteren Immunfluoreszenz behandelt werden können. Nach 24-48h Inkubation im 37°C Brutschrank werden die Zellen auf den Objektträgern der "Lap Tek" fixiert. Das erfolgt z.B. mit 4%igem Paraformaldehyd oder kaltem Aceton für 15 Minuten. Nach der Fixierung werden die Zellen mit PBS gewaschen und die unspezifischen Proteine mit 3% BSA/PBS, 1 Stunde, für eine folgende Antikörperreaktion blockiert. Anschließend erfolgt die einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper, der je nach Produkt 1:10 bis 1:40 mit PBS (ca. 2µg/ml) verdünnt wurde. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS wird der sekundäre Antikörper (1:40), der fluoreszenz markiert ist, für 1 Stunde auf die Zellen gegeben. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Kernfärbung erfolgte mit einer DAPI-Lösung, die dem VectaShield Slide Mounting Medium, welches für das "Eindeckeln" der Objektträger mit Deckgläsern verwendet wurde, bereits zugesetzt war. Der Sekundärantikörper, welcher Fluorochrom markiert ist, kann im Fluoreszenzmikroskop durch seine spezifische Wellenlänge des Emissionsspektrums detektiert werden. In dieser Arbeit wurden die FITC- und TRITC Sekundärantikörper verwendet. Der FITC Antikörper hat ein Exzitationsmaximum bei 495nm und ein Emissionsmaximum bei 528nm (grün). Der TRITC Antikörper leuchtet bei einer Anregungswellenlänge von 520/554nm und hat ein Emissionsmaximum bei 582nm (rot).

5.1.2.5.8 P-p38 ELISA

Der BioSource International Inc. p38 MAP Kinase [pTpY180/182] *Kit* ist ein *solid phase sandwich Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay* (ELISA), der die Menge an Threonin 180/ Tyrosin 182 phosphoryliertem p38 quantifiziert. Ein monoklonaler Antikörper gegen MAP Kinase p38 befindet sich am Boden einer 96-*well* Microtiter-Platte und wurde mit dem Proteinlysate der zu untersuchenden Proben inkubiert. Außerdem ist in dem *Kit* ein [pTpY180/182] p38 Standard enthalten, der einer Verdünnungsreihe von 100 Units/ml (1U=40pg/ml Protein), 50 Units/ml, 25 Units/ml, 12,5 Units/ml, 6,25 Units/ml, 3,12 Units/ml, 1,6 Units/ml und 0Units/ml entspricht. Während der ersten zweistündigen Inkubationsphase hat das p38 Antigen spezifisch an den immobilisierten Antikörper der Microtiterplatte gebunden. Durch mehrere Waschschriffe wurden anschließend ungebundene Proteine entfernt und ein zweiter Antikörper aufgebracht, der spezifisch für phosphorylierte p38 MAP Kinase ist. Nach einer Stunde und einem weiteren Waschschriffe, wurde anti-*Rabbit* IgG (anti-rabbit IgG-HRP) in die *wells* pipettiert. Nach diesem Inkubationsschriffe für 30 Minuten ist der "Vier-Komponenten-ELISA" vollständig. Nach einem letzten Waschen wird eine Chromogen Lösung pipettiert, die durch die Peroxidase eine blaue Farbreaktion auslöst. Die sogenannte Stopp Lösung beendet die Farbreaktion und die Intensitätsunterschiede der nun gelbe Farbe ist der Konzentration der p38 MAP Kinase (phosphoryliert) direkt proportional.

5.1.2.5.9 Extraktion mit dem Subcellular Extraction Kit

Der *ProteoExtract™ Kit* der Firma Calbiochem wurde verwendet, um Proteine der Melanomzellen seriell aus Zytoplasma, Membran, Kern und Zytoskelett getrennt voneinander zu isolieren. Zunächst werden die Melanomzellen gewaschen, um DMEM und Serumreste zu entfernen. Danach werden die Zellen mit einem Schaber aus der T75 Zellkulturschale gelöst und pelletiert. Der Extraktionspuffer I wird mit Proteaseinhibitor versehen und das ZellPellett mit diesem Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei 4°C und unter Schütteln erfolgt eine Zentrifugation (10 Minuten bei 3000rpm je nach Zentrifugentyp). Der Überstand wird abgenommen und enthält die Zytoplasmafraktion. Das vorliegende Pellett wird mit Extraktionspuffer II aufgenommen und nach weiterem Schütteln bei 4°C (30 Minuten) wieder zentrifugiert (10.000 rpm, 10 Minuten). Der Überstand enthält die Membranproteine und das Pellett wird weiter verarbeitet. Der Puffer III führt nach oben beschriebener Inkubation zu einer Trennung von Kernproteinen im Überstand und dem Pellett, welches Proteine des Zytoskeletts enthält. Die Proteine des Zytoskeletts werden am Ende in Puffer IV aufgenommen. Alle Fraktionen können bei -20°C eingefroren werden.

5.1.2.5.10 MAPKAP Kinase-2 Immunopräzipitations Assay

Der MAPKAP Kinase-2 Immunopräzipitations Assay der Firma upstate wurde verwendet, um Phosphotransferase Aktivität in den Melanomzellen zu messen. Dabei stand im Vordergrund zu bestimmen, ob gamma-Phosphat des ATP auf ein spezifisches Substrat übertragen werden. In dem Fall dieses Assays ging es um die Phosphorylierung von HSP27 (heat shock protein 27) welches durch MAPKAP Kinase-2 am Serin 78 phosphoryliert werden sollte. Wichtig für die Arbeit war die Tatsache, dass p38 MAP Kinase MAPKAP Kinase-2 als Substrat besitzt; Phosphatgruppen also von p38 auf MAPKAP Kinase-2 und anschließend auf HSP27 übertragen werden können. Für das Experiment wurden 800.000 Melanomzellen in PBS aufgenommen und Pellettiert. Das Pellett wurde dann in 50µl Assay *Dilution Buffer* resuspendiert. Durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen "geöffnet". Die Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 Minuten brachte einen Überstand hervor, der die Proteine des Zytoplasmas enthielt. 45-50µg der zytoplasmatischen Proteine wurden dann mit 2µl (0,5 µg/ml) des Substrat Moleküls HSP27 und 10µl eines Magnesium/ATP Cocktails (500µM ATP) 45 Minuten bei 30°C inkubiert. Bei 30°C lief die Reaktion ab, bei der in der Probe vorhandene aktive MAPKAP Kinase-2, zur Verfügung gestelltes ATP, auf das Substrat HSP27 übertrug. Nach der Reaktion wurden die zytoplasmatischen Proteine auf einem 12,75%igem SDS-Page Gel aufgetrennt. Durch die Verwendung des Antikörpers anti-phospho HSP27 wurde spezifisch das phosphorylierte Protein detektiert. Phospho HSP27 spiegelte also indirekt die Aktivität der MAP Kinase p38 wieder, die MAPKAP Kinase-2 aktivierte.

5.1.2.6 Zellkulturmethoden

5.1.2.6.1 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.

5.1.2.6.2 Transfektion von Zellkulturzellen

Um möglichst hohe Transfektionsraten erreichen, wurde die Lipofektamin Methode mit Lipofektamin™ Reagent und Lipofektamin^{Plus} Reagent verwendet. Bei 50-80%iger Konfluenz wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und der Transfektionsansatz zupipettiert. Dieser wurde nach Protokoll und Mengenangaben des Herstellers zusammenpipettiert, wobei 0,02 bis 0,5µg an Plasmid- DNA pro Versuchsansatz eingesetzt wurden. Das Transfektionsgemisch wurde nach 4h durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur Ernte weitere 24-48h inkubiert.

Transfizierte Zellen wurden entweder durch Luciferase-Reportergen-Analysen analysiert oder zu Gesamtzellprotein bzw. RNA weiterverarbeitet.

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde der Vektor mittels der Lipofektaminmethode in die Zellen eingebracht und durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikum zum Kulturmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. Das Selektionsantibiotikum wurde anhand des Resistenzgens im Vektor, der in die Zellen eingebracht wurde, ausgewählt. Durch das Selektionsmedium konnten nur Zellen, die den gewünschten Vektor aufgenommen hatten, überleben.

5.1.2.6.3 Luciferase-Reportergen-Assay

Regulatorische DNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe von sogenannten Reportergen Analysen untersuchen. Die bei den Transfektionen verwendeten Plasmide stellen sogenannte Luciferase-Vektoren dar. Um die Aktivität eines Promotors zu untersuchen, wird ein DNA-Fragment, das den Promotorbereich enthält, vor das Luciferase-Gen des Reporterplasmids pGL2-basic bzw. pGL3-basic 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 renifor* enthält, kotransfiziert. Die Chemilumineszenz der Renilla Luciferase wurde ebenfalls im Luminometer erfasst.

Zur Durchführung des Luciferase Assays wurde der *Luciferase Assay Kit* der Firma Promega verwendet. Hierfür wurden je 250.000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und nach der Lipofectamin Methode (siehe 5.1.2.6.2) 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 300µl Lysispuffer zugegeben und die Zellen 20 Minuten bis zu zwei Stunden auf einem Schüttler lysiert. Nach der Lyse wurden je 50µl eines Versuchsansatzes, mit den im Kit bereitgestellten Chemikalien im Luminometer vermessen.

5.1.2.6.4 Matrigel Invasions Assay (Boyden Kammer)

Der Matrigel Invasions Assay diente zur Untersuchung der Invasivität von verschiedenen Zellklonen, die transfiziert wurden. Dazu wurden spezielle Kammern, die Boydenkammern, im unteren Kompartiment mit 210 µl konditioniertem Medium befüllt. Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden konfluente Fibroblasten 24 Stunden lang in Medium ohne FKS kultiviert, dieses Medium anschließend abgenommen, abzentrifugiert und für den Invasions Assay benutzt. Auf das konditionierte Medium im unteren Kompartiment wurde ein Filterpapier (Whatman International Ltd, Maidstode, England) mit einer Porengröße von 8 µm luftblasenfrei aufgelegt und der Aufsatz der Boydenkammer aufgeschraubt. Anschließend wurden 52 µl Matrigel (1:3 verdünnt) auf den Filter pipettiert und die Kammer leicht auf der

Tischoberfläche aufgeklopft, um das Gel gut zu verteilen. Das Gel wurde zum Gelieren für 15- 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Während des Gelierens wurden die jeweiligen Zelllinien bzw. Zellklone mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und gezählt, um eine Zellzahl von 200.000 Zellen pro ml einzustellen. Die Zellen wurden dabei in DMEM ohne FKS aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden je 800µl pro Boydenkammer auf den mit Matrigel beschichteten Filter in das obere Kompartiment aufgebracht und vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension aus allen Kammern abgegossen, der Aufsatz abgeschraubt und der Filter herausgenommen. Die mit Matrigel beschichtete Oberseite wurde an einem mit Wasser getränktem Papiertuch abgewischt und der Filter in einen Färberahmen eingelegt. Die Filter wurden in einer Hemacolor Schnellfärbung, bestehend aus Fixierlösung, roter Färbelösung und blauer Färbelösung gefärbt, mit Leitungswasser gespült und mit der Unterseite nach oben auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurde die Anzahl der gewanderten Zellen im Mikroskop bestimmt.

5.2 Literaturverzeichnis

Albelda, S. M., Mette, S. A., Elder, D. E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., and Buck, C. A. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50, 6757-6764.

Albert, L. S., Rhodes, A. R., and Sober, A. J. (1990). Dysplastic melanocytic nevi and cutaneous melanoma: markers of increased melanoma risk for affected persons and blood relatives. *J Am Acad Dermatol* 22, 69-75.

Anastasiadis, P. Z., Moon, S. Y., Thoreson, M. A., Mariner, D. J., Crawford, H. C., Zheng, Y., and Reynolds, A. B. (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* 2, 637-644.

Andreasen, P. A., Kjoller, L., Christensen, L., and Duffy, M. J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72, 1-22.

Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., al-Alawi, N., Schlessinger, J., and Karin, M. (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949-961.

Asai, M., Kato, M., Asai, N., Iwashita, T., Murakami, H., Kawai, K., Nakashima, I., and Takahashi, M. (1999). Differential regulation of MMP-9 and TIMP-2 expression in malignant melanoma developed in metallothionein/RET transgenic mice. *Jpn J Cancer Res* 90, 86-92.

Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12, 141-179.

Bar-Eli, M. (2001). Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor. *Pigment Cell Res* 14, 78-85.

Barbera, M. J., Puig, I., Dominguez, D., Julien-Grille, S., Guaita-Esteruelas, S., Peiro, S., Baulida, J., Franci, C., Dedhar, S., Larue, L., and Garcia de Herreros, A. (2004). Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* 23, 7345-7354.

Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89.

Becker, D., Meier, C. B., and Herlyn, M. (1989). Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligodeoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor. *Embo J* 8, 3685-3691.

Behrens, J. (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 18, 15-30.

- Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy, F. M., and Birchmeier, W. (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108, 2435-2447.
- Berking, C., Takemoto, R., Schaidler, H., Showe, L., Satyamoorthy, K., Robbins, P., and Herlyn, M. (2001). Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res* 61, 8306-8316.
- Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198, 11-26.
- Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., Kataoka, H., and Nabeshima, K. (1995). The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 55, 434-439.
- Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2003). Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22, 6524-6536.
- Bosserhoff, A. K., Echtenacher, B., Hein, R., and Buettner, R. (2001). Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Res* 11, 417-421.
- Bosserhoff, A. K., Hein, R., Bogdahn, U., and Buettner, R. (1996). Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J Biol Chem* 271, 490-495.
- Bosserhoff, A. K., Kaufmann, M., Kaluza, B., Bartke, I., Zirngibl, H., Hein, R., Stolz, W., and Buettner, R. (1997). Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res* 57, 3149-3153.
- Bosserhoff, A. K., Lederer, M., Kaufmann, M., Hein, R., Stolz, W., Apfel, R., Bogdahn, U., and Buettner, R. (1999a). MIA, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Anticancer Res* 19, 2691-2693.
- Bosserhoff, A. K., Moser, M., Hein, R., Landthaler, M., and Buettner, R. (1999b). In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J Pathol* 187, 446-454.
- Bosserhoff, A. K., Stoll, R., Sleeman, J. P., Bataille, F., Buettner, R., and Holak, T. A. (2003). Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Lab Invest* 83, 1583-1594.
- Brantjes, H., Barker, N., van Es, J., and Clevers, H. (2002). TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol Chem* 383, 255-261.
- Caca, K., Kolligs, F. T., Ji, X., Hayes, M., Qian, J., Yahanda, A., Rimm, D. L., Costa, J., and Fearon, E. R. (1999). Beta- and gamma-catenin mutations, but not E-cadherin inactivation, underlie T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional deregulation in gastric and pancreatic cancer. *Cell Growth Differ* 10, 369-376.
- Castanon, I., and Baylies, M. K. (2002). A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene* 287, 11-22.

- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2001). Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* 1552, 39-45.
- Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S., and Hynes, R. O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406, 532-535.
- Clark, W. H. (1991). Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 64, 631-644.
- Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D. t., Epstein, M. N., Greene, M. H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 15, 1147-1165.
- Cowden, J., and Levine, M. (2002). The Snail repressor positions Notch signaling in the *Drosophila* embryo. *Development* 129, 1785-1793.
- d'Ortho, M. P., Will, H., Atkinson, S., Butler, G., Messent, A., Gavrilovic, J., Smith, B., Timpl, R., Zardi, L., and Murphy, G. (1997). Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 250, 751-757.
- de Vries, T. J., Quax, P. H., Denijn, M., Verrijp, K. N., Verheijen, J. H., Verspaget, H. W., Weidle, U. H., Ruitter, D. J., and van Muijen, G. N. (1994). Plasminogen activators, their inhibitors, and urokinase receptor emerge in late stages of melanocytic tumor progression. *Am J Pathol* 144, 70-81.
- Deng, T., and Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev* 7, 479-490.
- Denkert, C., Siegert, A., Leclere, A., Turzynski, A., and Hauptmann, S. (2002). An inhibitor of stress-activated MAP-kinases reduces invasion and MMP-2 expression of malignant melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 19, 79-85.
- Dhawan, P., and Richmond, A. (2002). A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *J Biol Chem* 277, 7920-7928.
- Dogliani, C., Piccinin, S., Demontis, S., Cangi, M. G., Pecciarini, L., Chiarelli, C., Armellini, M., Vukosavljevic, T., Boiocchi, M., and Maestro, R. (2003). Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol* 163, 2277-2287.
- Doherty, P., Williams, G., and Williams, E. J. (2000). CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol Cell Neurosci* 16, 283-295.
- Dotto, G. P., Moellmann, G., Ghosh, S., Edwards, M., and Halaban, R. (1989). Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment. *J Cell Biol* 109, 3115-3128.

- Edbrooke, M. R., Burt, D. W., Cheshire, J. K., and Woo, P. (1989). Identification of cis-acting sequences responsible for phorbol ester induction of human serum amyloid A gene expression via a nuclear factor kappaB-like transcription factor. *Mol Cell Biol* 9, 1908-1916.
- Edmunds, S. C., Kelsell, D. P., Hungerford, J. L., and Cree, I. A. (2002). Mutational analysis of selected genes in the TGFbeta, Wnt, pRb, and p53 pathways in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2845-2851.
- Eliceiri, B. P., Puente, X. S., Hood, J. D., Stupack, D. G., Schlaepfer, D. D., Huang, X. Z., Sheppard, D., and Cheresh, D. A. (2002). Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. *J Cell Biol* 157, 149-160.
- Evers, E. E., Zondag, G. C., Malliri, A., Price, L. S., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (2000). Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer* 36, 1269-1274.
- Fagotto, F., Funayama, N., Gluck, U., and Gumbiner, B. M. (1996). Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* 132, 1105-1114.
- Felicetti, F., Bottero, L., Felli, N., Mattia, G., Labbaye, C., Alvino, E., Peschle, C., Colombo, M. P., and Care, A. (2004). Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene* 23, 4567-4576.
- Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J., and Voorhees, J. J. (1999). Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol* 69, 154-157.
- Forsberg, K., Valyi-Nagy, I., Heldin, C. H., Herlyn, M., and Westermarck, B. (1993). Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 393-397.
- Friedl, P., Zanker, K. S., and Bocker, E. B. (1998). Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech* 43, 369-378.
- Frohlich, E., Schaumburg-Lever, G., and Klessen, C. (1995). Immunocytochemical and immunoelectron microscopic demonstration of cathepsin B in human malignant melanoma. *Br J Dermatol* 132, 867-875.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 4, 222-231.
- Garbe, C., Buttner, P., Weiss, J., Soyer, H. P., Stocker, U., Kruger, S., Roser, M., Weckbecker, J., Panizzon, R., Bahmer, F., and et al. (1994). Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 102, 695-699.

- Garbe, C., Kruger, S., Stadler, R., Guggenmoos-Holzmann, I., and Orfanos, C. E. (1989). Markers and relative risk in a German population for developing malignant melanoma. *Int J Dermatol* 28, 517-523.
- Gottardi, C. J., and Gumbiner, B. M. (2004). Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 167, 339-349.
- Govindarajan, B., Bai, X., Cohen, C., Zhong, H., Kilroy, S., Louis, G., Moses, M., and Arbiser, J. L. (2003). Malignant transformation of melanocytes to melanoma by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) signaling. *J Biol Chem* 278, 9790-9795.
- Greene, M. H., Clark, W. H., Jr., Tucker, M. A., Elder, D. E., Kraemer, K. H., Guerry, D. t., Witmer, W. K., Thompson, J., Matozzo, I., and Fraser, M. C. (1985). Acquired precursors of cutaneous malignant melanoma. The familial dysplastic nevus syndrome. *N Engl J Med* 312, 91-97.
- Grego-Bessa, J., Diez, J., Timmerman, L., and de la Pompa, J. L. (2004). Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle* 3, 718-721.
- Grin-Jorgensen, C., Berke, A., and Grin, M. (1992). Ocular melanoma. *Dermatol Clin* 10, 663-668.
- Grin-Jorgensen CM, Rigel DS, Friedmann RJ (1992) The worldwide incidence of malignant melanoma. In Balch CM, Houghton AN, Mitton GW, Sober AJ, Soong S (eds) *Cutaneous melanoma*. JB Lippincott, Philadelphia, S 27-39.
- Grosheva, I., Shtutman, M., Elbaum, M., and Bershadsky, A. D. (2001). p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* 114, 695-707.
- Guba, M., Bosserhoff, A. K., Steinbauer, M., Abels, C., Anthuber, M., Buettner, R., and Jauch, K. W. (2000). Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Br J Cancer* 83, 1216-1222.
- Hai, T., and Hartman, M. G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1-11.
- Handschuh, G., Candidus, S., Lubber, B., Reich, U., Schott, C., Oswald, S., Becke, H., Hutzler, P., Birchmeier, W., Hofler, H., and Becker, K. F. (1999). Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18, 4301-4312.
- Heenen, M., and Laporte, M. (2003). [Molecular markers associated to prognosis of melanoma]. *Ann Dermatol Venereol* 130, 1025-1031.
- Herlyn, M., Balaban, G., Bannicelli, J., Guerry, D. t., Halaban, R., Herlyn, D., Elder, D. E., Maul, G. G., Steplewski, Z., Nowell, P. C., and et al. (1985). Primary melanoma cells of the vertical growth phase: similarities to metastatic cells. *J Natl Cancer Inst* 74, 283-289.

- Hilger-Eversheim, K., Moser, M., Schorle, H., and Buettner, R. (2000). Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260, 1-12.
- Hofmann, U. B., Westphal, J. R., Van Kraats, A. A., Ruitter, D. J., and Van Muijen, G. N. (2000a). Expression of integrin alpha(v)beta(3) correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 87, 12-19.
- Hofmann, U. B., Westphal, J. R., Van Muijen, G. N., and Ruitter, D. J. (2000b). Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 115, 337-344.
- Hordijk, P. L., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Oomen, L. C., and Collard, J. G. (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* 278, 1464-1466.
- Hsu, M., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J. L., and Herlyn, M. (2000a). Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* 113 (Pt 9), 1535-1542.
- Hsu, M. Y., Meier, F., and Herlyn, M. (2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 70, 522-536.
- Hsu, M. Y., Meier, F. E., Nesbit, M., Hsu, J. Y., Van Belle, P., Elder, D. E., and Herlyn, M. (2000b). E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 156, 1515-1525.
- Hsu, M. Y., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., and Herlyn, M. (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1, 188-194.
- Huang, E. Y., Madireddi, M. T., Gopalkrishnan, R. V., Leszczyniecka, M., Su, Z., Lebedeva, I. V., Kang, D., Jiang, H., Lin, J. J., Alexandre, D., *et al.* (2001). Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties. *Oncogene* 20, 7051-7063.
- Huang, S., DeGuzman, A., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. (2000). Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res* 6, 2573-2581.
- Huber, A. H., Stewart, D. B., Laurents, D. V., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 276, 12301-12309.
- Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 114, 569-581.
- Hulett, M. D., Freeman, C., Hamdorf, B. J., Baker, R. T., Harris, M. J., and Parish, C. R. (1999). Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* 5, 803-809.

- Hulsken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127, 2061-2069.
- Ip, Y. T., and Gridley, T. (2002). Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways. *Curr Opin Genet Dev* 12, 423-429.
- Jaffe, S. H., Friedlander, D. R., Matsuzaki, F., Crossin, K. L., Cunningham, B. A., and Edelman, G. M. (1990). Differential effects of the cytoplasmic domains of cell adhesion molecules on cell aggregation and sorting-out. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3589-3593.
- Janssen-Heininger, Y. M., Poynter, M. E., and Baeuerle, P. A. (2000). Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med* 28, 1317-1327.
- Johnson, G. L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2, 301-310.
- Kim, J. B., Islam, S., Kim, Y. J., Prudoff, R. S., Sass, K. M., Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (2000). N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility. *J Cell Biol* 151, 1193-1206.
- Kreft, B., Berndorff, D., Bottinger, A., Finnemann, S., Wedlich, D., Hortsch, M., Tauber, R., and Gessner, R. (1997). LI-cadherin-mediated cell-cell adhesion does not require cytoplasmic interactions. *J Cell Biol* 136, 1109-1121.
- Kuphal, S., Poser, I., Jobin, C., Hellerbrand, C., and Bosserhoff, A. K. (2004). Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* 23, 8509-8519.
- Kuphal, S, Bauer R., and Bosserhoff, A. K. (2004). Integrin Signaling in malignant melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews*. Im Druck.
- Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., *et al.* (1998). Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* 281, 832-835.
- Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., and Kaibuchi, K. (1999). Cdc42, Rac1, and their effector IQGAP1 as molecular switches for cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 1-6.
- Lambert, E., Boudot, C., Kadri, Z., Soula-Rothhut, M., Sowa, M. L., Mayeux, P., Hornebeck, W., Haye, B., and Petitfrere, E. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J* 372, 767-774.
- Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J. F., Boucher, M. J., and Rivard, N. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277, 8226-8234.

- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., and Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8263-8267.
- Lazar-Molnar, E., Hegyesi, H., Toth, S., and Falus, A. (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* *12*, 547-554.
- Levine, E., Lee, C. H., Kintner, C., and Gumbiner, B. M. (1994). Selective disruption of E-cadherin function in early *Xenopus* embryos by a dominant negative mutant. *Development* *120*, 901-909.
- Li, B., Paradies, N. E., and Brackenbury, R. W. (1997). Isolation and characterization of the promoter region of the chicken N-cadherin gene. *Gene* *191*, 7-13.
- Li, G., and Herlyn, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* *6*, 163-169.
- Li, G., Kalabis, J., Xu, X., Meier, F., Oka, M., Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2003a). Reciprocal regulation of MelCAM and AKT in human melanoma. *Oncogene* *22*, 6891-6899.
- Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* *61*, 3819-3825.
- Li, G., Satyamoorthy, K., Meier, F., Berking, C., Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2003b). Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene* *22*, 3162-3171.
- Liotta, L. A., and Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* *411*, 375-379.
- Lozano, E., Betson, M., and Braga, V. M. (2003). Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* *25*, 452-463.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., and Hendrix, M. J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* *155*, 739-752.
- Marks, R., and Kopf, A. W. (1995). Cancer of the skin in the next century. *Int J Dermatol* *34*, 445-447.
- Marrs, J. A., and Nelson, W. J. (1996). Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. *Int Rev Cytol* *165*, 159-205.
- Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* *103*, 295-309.
- McNulty, S. E., Tohidian, N. B., and Meyskens, F. L., Jr. (2001). RelA, p50 and inhibitor of kappa B alpha are elevated in human metastatic melanoma cells and respond aberrantly to ultraviolet light B. *Pigment Cell Res* *14*, 456-465.
- Meier, F., Satyamoorthy, K., Nesbit, M., Hsu, M. Y., Schitteck, B., Garbe, C., and Herlyn, M. (1998). Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci* *3*, D1005-1010.

- Meyskens, F. L., Jr., Buckmeier, J. A., McNulty, S. E., and Tohidian, N. B. (1999). Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanomacells and the effect of oxidative stress. *Clin Cancer Res* 5, 1197-1202.
- Mizutani, S., Inouye, K., Koide, H., and Kaziro, Y. (2001). Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Lett* 507, 295-298.
- Morel, V., Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003). Snail is required for Delta endocytosis and Notch-dependent activation of single-minded expression. *Dev Genes Evol* 213, 65-72.
- Morinaga, Y., Fujita, N., Ohishi, K., and Tsuruo, T. (1997). Stimulation of interleukin-11 production from osteoblast-like cells by transforming growth factor-beta and tumor cell factors. *Int J Cancer* 71, 422-428.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380, 360-364.
- Nagase, H., and Brew, K. (2003). Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors. *Biochem Soc Symp*, 201-212.
- Nakabeppu, Y., Ryder, K., and Nathans, D. (1988). DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell* 55, 907-915.
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., and Kaibuchi, K. (2001). Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci* 114, 1829-1838.
- Navarro, P., Lozano, E., and Cano, A. (1993). Expression of E- or P-cadherin is not sufficient to modify the morphology and the tumorigenic behavior of murine spindle carcinoma cells. Possible involvement of plakoglobin. *J Cell Sci* 105 (Pt 4), 923-934.
- Nieman, M. T., Kim, J. B., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J. (1999). Mechanism of extracellular domain-deleted dominant negative cadherins. *J Cell Sci* 112 (Pt 10), 1621-1632.
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-166.
- Niu, G., Bowman, T., Huang, M., Shivers, S., Reintgen, D., Daud, A., Chang, A., Kraker, A., Jove, R., and Yu, H. (2002). Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21, 7001-7010.
- Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 299, 551-572.
- Noren, N. K., Arthur, W. T., and Burridge, K. (2003). Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J Biol Chem* 278, 13615-13618.
- Noren, N. K., Liu, B. P., Burridge, K., and Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* 150, 567-580.
- Noren, N. K., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M., and Burridge, K. (2001). Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem* 276, 33305-33308.

- Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 54, 993-1001.
- Oda, H., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol* 203, 435-450.
- Ozawa, M., Engel, J., and Kemler, R. (1990a). Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell* 63, 1033-1038.
- Ozawa, M., Hoschutzky, H., Herrenknecht, K., and Kemler, R. (1990b). A possible new adhesive site in the cell-adhesion molecule uvomorulin. *Mech Dev* 33, 49-56.
- Ozawa, M., Ringwald, M., and Kemler, R. (1990c). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4246-4250.
- Panda, D. K., Miao, D., Lefebvre, V., Hendy, G. N., and Goltzman, D. (2001). The transcription factor SOX9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells. *J Biol Chem* 276, 41229-41236.
- Pece, S., Chiariello, M., Murga, C., and Gutkind, J. S. (1999). Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* 274, 19347-19351.
- Pece, S., and Gutkind, J. S. (2000). Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* 275, 41227-41233.
- Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48, 365-375.
- Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278, 21113-21123.
- Perlis, C., and Herlyn, M. (2004). Recent advances in melanoma biology. *Oncologist* 9, 182-187.
- Peyssonnaud, C., and Eychene, A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 93, 53-62.
- Piedra, M. E., and Ros, M. A. (2002). BMP signaling positively regulates Nodal expression during left right specification in the chick embryo. *Development* 129, 3431-3440.
- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14, 1837-1851.
- Pollock, P. M., and Hayward, N. (2002). Mutations in exon 3 of the beta-catenin gene are rare in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 12, 183-186.
- Poser, I., and Bosserhoff, A. K. (2004). Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histol Histopathol* 19, 173-188.

- Poser, I., Dominguez, D., de Herreros, A. G., Varnai, A., Buettner, R., and Bosserhoff, A. K. (2001). Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 276, 24661-24666.
- Poser, I., Golob, M., Buettner, R., and Bosserhoff, A. K. (2003). Upregulation of HMG1 leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype. *Mol Cell Biol* 23, 2991-2998.
- Poser, I., Tatzel, J., Kuphal, S., and Bosserhoff, A. K. (2004). Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene* 23, 6115-6124.
- Qian, X., Karpova, T., Sheppard, A. M., McNally, J., and Lowy, D. R. (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *Embo J* 23, 1739-1784.
- Quax, P. H., van Muijen, G. N., Weening-Verhoeff, E. J., Lund, L. R., Dano, K., Ruiten, D. J., and Verheijen, J. H. (1991). Metastatic behavior of human melanoma cell lines in nude mice correlates with urokinase-type plasminogen activator, its type-1 inhibitor, and urokinase-mediated matrix degradation. *J Cell Biol* 115, 191-199.
- Reed, J. A., McNutt, N. S., and Albino, A. P. (1994). Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression. *Am J Pathol* 144, 329-336.
- Reifenberger, J., Knobbe, C. B., Wolter, M., Blaschke, B., Schulte, K. W., Pietsch, T., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (2002). Molecular genetic analysis of malignant melanomas for aberrations of the WNT signaling pathway genes CTNNB1, APC, ICAT and BTRC. *Int J Cancer* 100, 549-556.
- Reifenberger, J., Wolter, M., Knobbe, C. B., Kohler, B., Schonicke, A., Scharwachter, C., Kumar, K., Blaschke, B., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (2005). Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 152, 43-51.
- Reynolds, A. B., Daniel, J., McCrea, P. D., Wheelock, M. J., Wu, J., and Zhang, Z. (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 14, 8333-8342.
- Rice, G. E., and Bevilacqua, M. P. (1989). An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246, 1303-1306.
- Rodeck, U., Bossler, A., Graeven, U., Fox, F. E., Nowell, P. C., Knabbe, C., and Kari, C. (1994). Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Res* 54, 575-581.
- Roh, J. Y., and Stanley, J. R. (1995). Plakoglobin binding by human Dsg3 (pemphigus vulgaris antigen) in keratinocytes requires the cadherin-like intracytoplasmic segment. *J Invest Dermatol* 104, 720-724.
- Rothhammer, T., Hahne, J. C., Florin, A., Poser, I., Soncin, F., Wernert, N., and Bosserhoff, A. K. (2004). The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci* 61, 118-128.

- Rumpler, G., Becker, B., Hafner, C., McClelland, M., Stolz, W., Landthaler, M., Schmitt, R., Bosserhoff, A., and Vogt, T. (2003). Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp Dermatol* 12, 761-771.
- Samowitz, W. S., Powers, M. D., Spirio, L. N., Nollet, F., van Roy, F., and Slattery, M. L. (1999). Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res* 59, 1442-1444.
- Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., and Collard, J. G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* 143, 1385-1398.
- Sanders, D. S., Blessing, K., Hassan, G. A., Bruton, R., Marsden, J. R., and Jankowski, J. (1999). Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol* 52, 151-157.
- Seftor, R. E., Seftor, E. A., and Hendrix, M. J. (1999). Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. *Cancer Metastasis Rev* 18, 359-375.
- Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R., and Hendrickson, W. A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374, 327-337.
- Shattuck-Brandt, R. L., and Richmond, A. (1997). Enhanced degradation of I-kappaB alpha contributes to endogenous activation of NF-kappaB in Hs294T melanoma cells. *Cancer Res* 57, 3032-3039.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., Johnson, K. R., Wheelock, M. J., Matsuyoshi, N., Takeichi, M., and et al. (1995). Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* 128, 949-957.
- Shih, I. M., and Herlyn, M. (1993). Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol* 100, 196S-203S.
- Silye, R., Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Poole, S., van Noorden, S., Batchelor, W., Regele, H., Sega, W., Boesmueller, H., Krausz, T., and Pignatelli, M. (1998). E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 186, 350-355.
- Simcha, I., Kirkpatrick, C., Sadot, E., Shtutman, M., Polevoy, G., Geiger, B., Peifer, M., and Ben-Ze'ev, A. (2001). Cadherin sequences that inhibit beta-catenin signaling: a study in yeast and mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12, 1177-1188.
- Sommers, C. L., Thompson, E. W., Torri, J. A., Kemler, R., Gelmann, E. P., and Byers, S. W. (1991). Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ* 2, 365-372.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85

- Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 1130-1134.
- Staddon, J. M., Smales, C., Schulze, C., Esch, F. S., and Rubin, L. L. (1995). p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J Cell Biol* 130, 369-381.
- Stoll, R., Renner, C., Buettner, R., Voelter, W., Bosserhoff, A. K., and Holak, T. A. (2003). Backbone dynamics of the human MIA protein studied by (15)N NMR relaxation: implications for extended interactions of SH3 domains. *Protein Sci* 12, 510-519.
- Stracke, M. L., Engel, J. D., Wilson, L. W., Rechler, M. M., Liotta, L. A., and Schiffmann, E. (1989). The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J Biol Chem* 264, 21544-21549.
- Stupack, D. G., Cho, S. Y., and Klemke, R. L. (2000). Molecular signaling mechanisms of cell migration and invasion. *Immunol Res* 21, 83-88.
- Suh, J., Payvandi, F., Edelstein, L. C., Amenta, P. S., Zong, W. X., Gelinas, C., and Rabson, A. B. (2002). Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* 52, 183-200.
- Tachibana, M. (2000). MITF: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res* 13, 230-240.
- Takahashi, E., Funato, N., Higashihori, N., Hata, Y., Gridley, T., and Nakamura, M. (2004). Snail regulates p21(WAF/CIP1) expression in cooperation with E2A and Twist. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1136-1144.
- Takahashi, K., Eto, H., and Tanabe, K. K. (1999). Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells. *Int J Cancer* 80, 387-395.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y. (1997). Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* 139, 1047-1059.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 619-627.
- Thiery, J. P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15, 740-746.
- Urabe, A., Nakayama, J., Taniguchi, S., Terao, H., and Hori, Y. (1992). Expression of the c-fos oncogene in chemically-induced mouse tumours and in human skin tumours. *J Pathol* 168, 281-286.
- van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Dooijes, D., and Clevers, H. (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *Embo J* 10, 123-132.
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Notebaert, S., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2002). Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem Pharmacol* 64, 963-970.

- Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J* 22, 1313-1324.
- Wagener, C.: Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren. Thieme; Stuttgart, New York: 1999.
- Wandel, E., Grasshoff, A., Mittag, M., Haustein, U. F., and Saalbach, A. (2000). Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. *Exp Dermatol* 9, 34-41.
- Wang, D., and Richmond, A. (2001). Nuclear factor-kappa B activation by the CXC chemokine melanoma growth-stimulatory activity/growth-regulated protein involves the MEKK1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276, 3650-3659.
- Weiss, J., Garbe, C., Bertz, J., Biltz, H., Burg, G., Hennes, B., Jung, E. G., Kreysel, H. W., Orfanos, C. E., Petzold, D., and et al. (1990). [Risk factors for the development of malignant melanoma in West Germany. Results of a multicenter-case control study]. *Hautarzt* 41, 309-313.
- Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 207-235.
- Widlund, H. R., and Fisher, D. E. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22, 3035-3041.
- Williams, E. J., Williams, G., Howell, F. V., Skaper, S. D., Walsh, F. S., and Doherty, P. (2001). Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J Biol Chem* 276, 43879-43886.
- Worm, J., Christensen, C., Gronbaek, K., Tulchinsky, E., and Guldberg, P. (2004). Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene* 23, 5215-5226.
- Yang, J., and Richmond, A. (2001). Constitutive I kappa B kinase activity correlates with nuclear factor-kappa B activation in human melanoma cells. *Cancer Res* 61, 4901-4909.
- Yap, A. S., and Kovacs, E. M. (2003). Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol* 160, 11-16.
- Yokoyama, K., Kamata, N., Fujimoto, R., Tsutsumi, S., Tomonari, M., Taki, M., Hosokawa, H., and Nagayama, M. (2003). Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 22, 891-898.
- Zanetti, A., Lampugnani, M. G., Balconi, G., Breviario, F., Corada, M., Lanfrancone, L., and Dejana, E. (2002). Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 617-622.
- Zhang, B. H., and Guan, K. L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *Embo J* 19, 5429-5439.

Eigene bereits veröffentlichte bzw. zur Veröffentlichung eingereichte Publikationen

Anhang I Kuphal, S., Poser, I., Jobin, C., Hellerbrand, C., and Bosserhoff, A. K. (2004). Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* 23, 8509-8519.

Anhang II Poser, I., Tatzel, J., Kuphal, S., and Bosserhoff, A. K. (2004). Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene* 23, 6115-6124.

Anhang III Kuphal, S., and Bosserhoff, A. K. (2005). Influence of the cytoplasmic domain of E-Cadherin on endogenous N-Cadherin Expression in malignant melanoma. *JBC* zur Veröffentlichung eingereicht.

Anhang IV Kuphal, S., Palm, H. G., Poser, I., and Bosserhoff, A. K. (2005). Snail regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma research* zur Veröffentlichung eingereicht.

Anhang I

Oncogene (2004) 23, 8509–8519

© 2004 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/04

www.nature.com/onc

Loss of E-cadherin leads to upregulation of NF κ B activity in malignant melanoma

S Kuphal^{1,4}, I Poser^{1,4}, C Jobin², C Hellerbrand³ and AK Bosserhoff^{*1}

¹Institute of Pathology, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, D-93053 Regensburg, Germany; ²Department of Medicine, University of North Carolina, USA; ³Internal Medicine I, University of Regensburg, D-93053 Regensburg, Germany

Loss of E-cadherin leads to upregulation of NF κ B activity in malignant melanoma

S Kuphal^{1,4}, I Poser^{1,4}, C Jobin², C Hellerbrand³ and AK Bosserhoff^{*1}

¹Institute of Pathology, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, D-93053 Regensburg, Germany; ²Department of Medicine, University of North Carolina, USA; ³Internal Medicine I, University of Regensburg, D-93053 Regensburg, Germany

Malignant transformation of melanocytes frequently coincides with loss of E-cadherin expression. Here, we show that loss of E-cadherin leads to induction of nuclear factor kappa B (NF κ B) activity in melanoma cell lines. Melanoma cells show constitutively active NF κ B, whereas no activity is found in primary melanocytes. After re-expression of E-cadherin in melanoma cells, strong downregulation of NF κ B activity was found. Consistently, NF κ B activity was induced in primary human melanocytes after inhibition of E-cadherin activity by functionally blocking anti-E-cadherin antibodies. Interestingly, re-expression of E-cadherin-blocked p38 MAPK activity and the p38 MAPK inhibitors SB203580 and SB202190 almost completely prevented NF κ B activation in melanoma cells. Furthermore, cytoplasmatic β -catenin induced p38 and NF κ B activation in malignant melanoma. To our knowledge, this is the first report suggesting a correlation between E-cadherin and NF κ B activity in melanocytes and melanoma cells. In summary, we conclude that loss of E-cadherin and cytoplasmatic β -catenin induces p38-mediated NF κ B activation, potentially revealing an important mechanism of tumorigenesis in malignant melanomas.

Oncogene (2004) 23, 8509–8519. doi:10.1038/sj.onc.1207831
Published online 20 September 2004

Keywords: melanoma; E-cadherin; p-p38; NF κ B

Introduction

The cell–cell adhesion molecule E-cadherin has been shown to execute important functions in embryogenesis and tissue architecture by forming intercellular junction complexes and establishing cell polarization (Gumbiner *et al.*, 1988). The extracellular domain of E-cadherin is involved in a molecular zipper mediating cell–cell adhesion, while the cytoplasmic tail is linked to the actin cytoskeleton via catenins (Cowin, 1994; Shapiro *et al.*, 1995). Owing to its critical function in intercellular

adhesion, E-cadherin has also been assumed to act as a tumor suppressor negatively regulating several critical steps of invasion and metastasis. Loss of E-cadherin expression during tumor development was recently observed in a variety of different tumor types including malignant melanomas (Berx *et al.*, 1995, 1996; Tamura *et al.*, 1996a, b; Silye *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 1999; Melki *et al.*, 2000; Poser *et al.*, 2001). Further, we have shown that inhibition of the expression of the transcriptional repressor *snail* induced re-expression of E-cadherin in Mel Im melanoma cells (Poser *et al.*, 2001). Transfection of E-cadherin cDNA into invasive carcinoma cells leads to a significant reduction of their invasive capacity *in vitro* (Frixen *et al.*, 1991; Vlemineckx *et al.*, 1991), and activation of E-cadherin expression results in growth retardation of tumor cell lines (Watabe *et al.*, 1994). Recent experiments suggest that E-cadherin is not only involved in cell–cell contact but multiple signalling pathways are activated or repressed by E-cadherin function. One of the most commonly discussed pathway is the β -catenin/LEF/T-cell factor (TCF) signalling cascade (Nollet *et al.*, 1999; Novak and Dedhar, 1999). Further, other groups could show a regulation of MAP kinases via E-cadherin (Pece and Gutkind, 2000).

Nuclear factor kappa B (NF κ B) is a heterodimeric transcription factor that is predominantly composed of 65 and 50 kDa subunits of the Rel family. In resting cells, NF κ B is mainly retained in the cytoplasm by the inhibitor of NF κ B (I κ B) family of proteins, which mask the nuclear translocation signal of the transcription factor. Upon stimulation of cells, two defined serine residues in the NH₂ terminus of I κ B proteins are phosphorylated triggering their ubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome. Hereby, the NF κ B proteins are released for translocation to the nucleus and induction of κ B-dependent genes.

NF κ B modulates multiple basic cellular functions like cell growth, differentiation, inflammatory response, and immune response. More recently, NF κ B activation has been connected with multiple aspects of oncogenesis, including the control of apoptosis, the cell cycle, differentiation, and cell migration (Baldwin, 2001). Several reports demonstrated strong and constitutive activity of NF κ B in malignant melanoma, possibly through enhanced I κ B kinase (IKK) activity and I κ B degradation (Shattuck-Brandt and Richmond, 1997;

*Correspondence: A Bosserhoff;

E-mail: anja.bosserhoff@klinik.uni-regensburg.de

[†]These authors contributed equally to this work

Received 18 July 2003; revised 22 April 2004; accepted 23 April 2004; published online 20 September 2004

Yang and Richmond, 2001). The upstream signalling pathways leading to IKK activity and NF κ B activity in malignant melanoma are unknown until today.

In this study, we examined the relationship between the loss of E-cadherin expression and NF κ B signalling in malignant melanoma.

Results

One early and tremendous change in the development of malignant melanoma is the loss of E-cadherin expression. Whereas human melanocytes show expression of this cell-cell adhesion molecule, melanoma cells lose E-cadherin but show expression of N-cadherin. Nuclear extracts from malignant melanoma display strong NF κ B DNA-binding activity as compared to melanocytes. Accordingly, transient transfection assays and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) data showed that NF κ B transcriptional and DNA-binding activity is higher in malignant melanoma cell lines than in melanocytes (Figure 1a and b).

We next examined the interplay between loss of E-cadherin and upregulation of NF κ B activity.

To induce E-cadherin expression in melanoma cells, we used two experimental models. The melanoma cell line Mel Im stably transfected with antisense snail cDNA showed induction of E-cadherin expression as previously shown by our group (Poser *et al.*, 2001). Furthermore, E-cadherin expression in the Mel Im cells was induced by transient transfection of an E-cadherin expression plasmid. Effectiveness of both transfection methods was shown previously (Poser *et al.*, 2001) and evaluated by quantitative reverse transcription (RT)-PCR and Western blots for E-cadherin revealing an E-cadherin expression of approximately 50% compared to normal human melanocytes (Figure 2a and b).

In further experiments, the antisense snail-transfected melanoma cells showed reduction of NF κ B DNA-binding activity and transcriptional activity (Figure 3a and c). Moreover, transient E-cadherin overexpression reduced NF κ B DNA binding and transcriptional activity (Figure 3b and c). The reduction of NF κ B was shown to be dependent on the amount of E-cadherin expression by a dose curve (data not shown). Immunofluorescence staining revealed translocation of p65 from the nucleus to the cytoplasm in the Mel Im as snail clones (re-expressing E-cadherin) in comparison to Mel Im cells (Figure 3d). Additionally, Western blots show

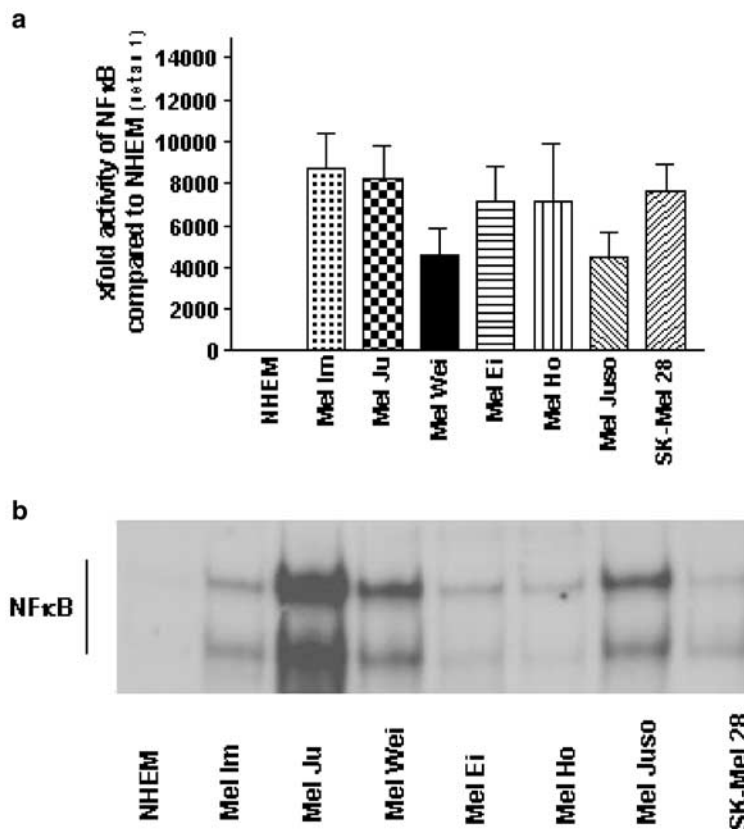


Figure 1 Reporter gene analysis and gel shift assays to analyse NF κ B activity in human primary melanocytes and melanoma cells. (a) Reporter gene assays using the NF κ B-luc construct were performed to detect NF κ B activity in normal human epidermal melanocytes (NHEM) and eight melanoma cell lines. Numbers are given as \times fold activation compared to NF κ B activity in NHEM (set as 1). (b) Nuclear NF κ B-binding activity was analysed comparing the human epidermal melanocytes (NHEM) to the seven melanoma cell lines used in (a)

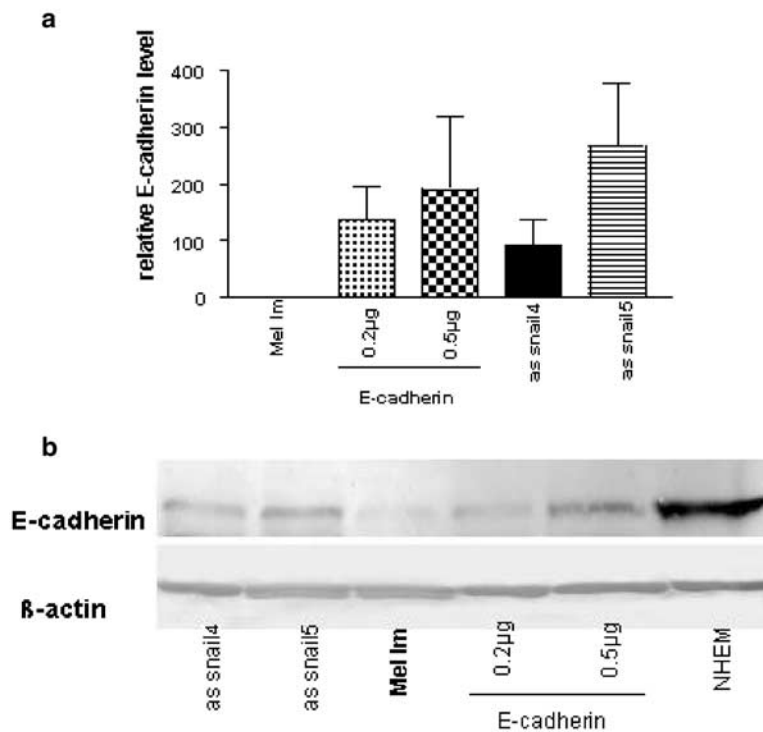


Figure 2 Real-time PCR and Western blot data for the expression level of E-cadherin in stably transfected antisense snail cell clones and transiently transfected Mel Im cells. **(a)** The transcriptional level of E-cadherin is documented with real-time PCR. **(b)** The translational level of E-cadherin protein is shown by Western blot using an antibody against E-cadherin

that the proportionate amount of p65 increases in the cytoplasm and decreases in the nucleus in the E-cadherin re-expressing cells, and the Mel Im cells show phosphorylation of p65 in the nucleus in comparison to the E-cadherin-expressing cells (Figure 3e).

Western blots analysing the amount of I κ B in the cell clones showed strong signals in the Mel Im as snail cell clones (Figure 3f).

To verify this regulatory effect, primary human melanocytes were treated with an inhibitory antibody against E-cadherin. Interestingly, NF κ B DNA-binding activity is induced in conditions where E-cadherin signalling is blocked, whereas the use of control antibodies had no effect on NF κ B DNA-binding activity (Figure 4).

Moreover, expression of the endogenous NF κ B-dependent gene interleukin 8 (IL-8) was reduced in melanoma cells transiently transfected with an E-cadherin expression plasmid, whereas expression of the NF κ B-independent gene transcriptional growth factor beta 2 (TGF β 2) remained unchanged (Figure 5).

The interplay between E-cadherin and NF κ B signalling pathway is unknown. However, it was shown that E-cadherin negatively regulates MAP kinase activity (Pece and Gutkind, 2000), a pathway that intersects with the NF κ B signalling cascade (Vanden Berghe *et al.*, 1998). Therefore, we speculated that E-cadherin may modulate NF κ B activity through the MAP kinase pathway. To verify this hypothesis, we investigated the effect of E-cadherin on the phosphorylation of four

members of the MAP kinase family (c-jun NH₂-terminal kinase (JNK), p42/44ERK1/2, p38) using the wild-type Mel Im cell line (E-cadherin negative) and two cell clones transfected with antisense snail (E-cadherin positive). Furthermore, we analysed the regulation of the protein kinase Akt.

p42ERK2 was expressed and constitutively phosphorylated in melanoma cells, whereas only weak expression and phosphorylation of p44ERK1 was found. p42ERK2 and p44ERK1 phosphorylation remained unchanged in the melanoma cell clones Mel Im as snail 4 and 5 (E-cadherin positive) as well as in Mel Im melanoma cells transiently transfected with E-cadherin (Figure 6a). Further, Western blots revealed no regulation of JNK (data not shown) which was further supported by the finding that we found no change of c-jun phosphorylation after re-expression of E-cadherin (Figure 6b) was detectable. Additionally, Figure 6c shows that the kinase Akt was not influenced by E-cadherin expression. The analysis of p38 was carried out using a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system and Western blots for phosphorylated and unphosphorylated p38. Marked downregulation of p38 phosphorylation was observed after re-expression of E-cadherin in melanoma cells with the ELISA system (Figure 6d). These data are supplemented by the Western blot for p-p38 and as the loading control p38 (Figure 6e).

To analyse the functional role of p38 MAP kinase on E-cadherin-mediated downregulation of NF κ B activity,

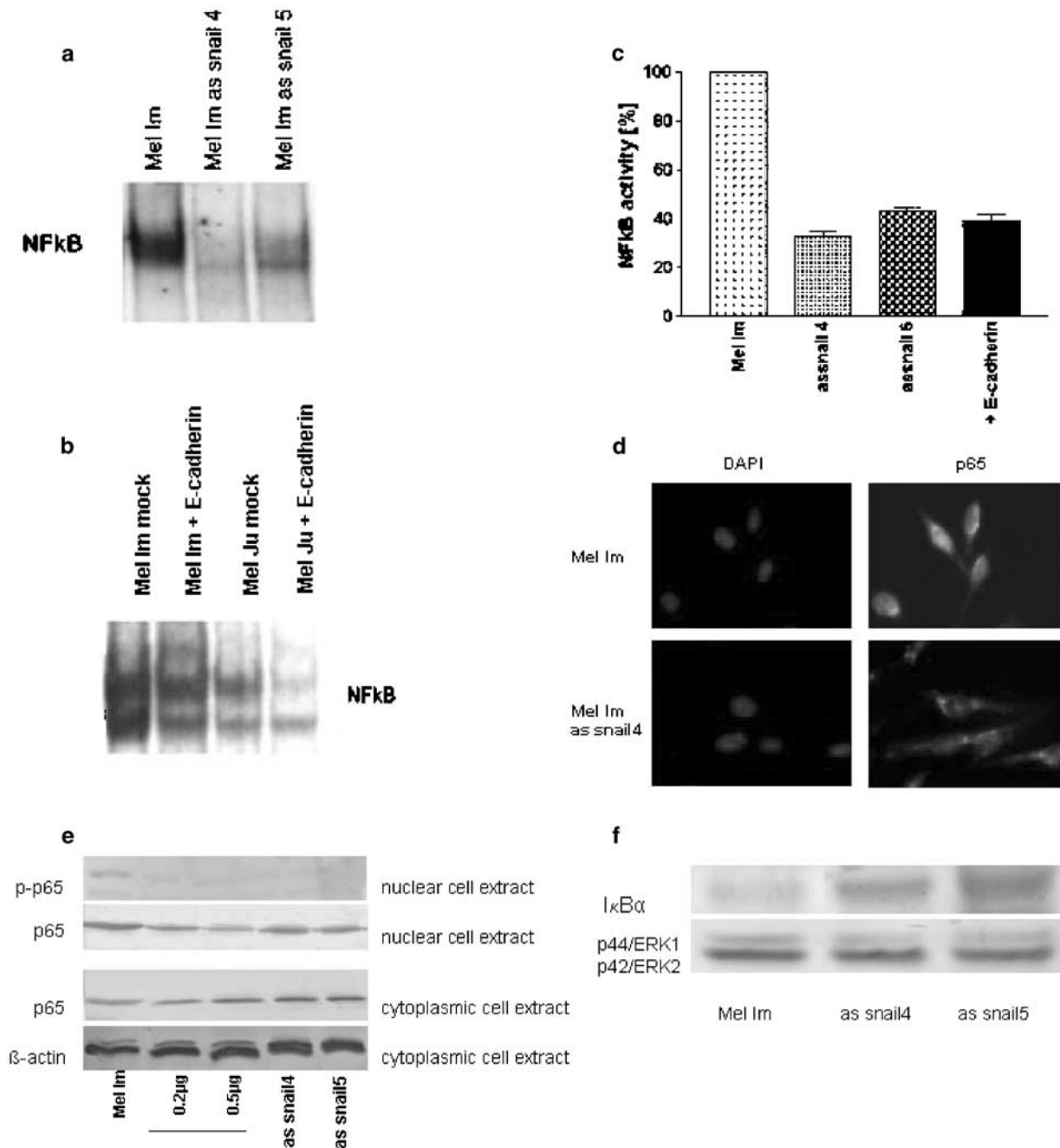


Figure 3 Reporter gene analysis, gel shift assays, Western blot, and immunofluorescence staining of p65 to analyse NF κ B activity after re-expression of E-cadherin in melanoma cells. (**a**, **b**) Nuclear NF κ B-binding activity was analysed using gel shift assays to compare the wild-type melanoma cell line Mel Im to the E-cadherin re-expressing melanoma cells. E-cadherin re-expression was induced either by stably downregulating snail expression in the melanoma cell line Mel Im (**a**, Mel Im as snail 4 and 5) or by transient transfection with an E-cadherin expression plasmid into the melanoma cell lines Mel Im and Mel Ju (**b**). (**c**) Reporter gene assays using the NF κ B-luc construct to detect NF κ B activity were performed in the melanoma cell line Mel Im in comparison to E-cadherin re-expressing cell clones generated either by stable transfection of antisense snail (Mel Im as snail 4 and 5) or transient transfection of an E-cadherin expression plasmid. Activity of NF κ B in Mel Im melanoma cells was set as 100%. (**d**) Immunofluorescence staining of p65 revealed nuclear staining in Mel Im cells, whereas in Mel Im as snail cells (with E-cadherin re-expression) p65 was located in the cytoplasm. (**e**) Western blot analysis to compare the proportional amount of nuclear and cytoplasmic p65 in the E-cadherin re-expressing as snail cells and the transiently transfected Mel Im cells. Staining of cytoplasmic β -actin ensures equal loading of the samples. (**f**) Western blot analysis of I κ B level in the melanoma cell line Mel Im compared to the E-cadherin re-expressing cell clone Mel Im as snail. Staining of p42/44 ERK ensures equal loading

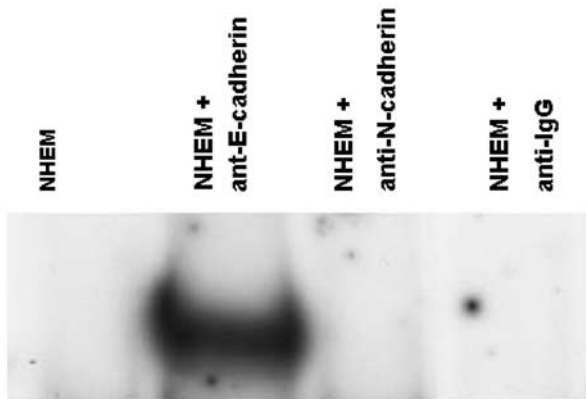


Figure 4 Gel shift assays to analyse NF κ B activity in primary human melanocytes after inhibition of E-cadherin activity. In normal human epidermal melanocytes (NHEM), no NF κ B binding to a consensus NF κ B-binding site was detectable. After treating the cells with an anti-E-cadherin antibody, which functionally blocks E-cadherin activity, induction of NF κ B was found. Anti-IgG and N-cadherin antibodies, respectively, were used as control. No NF κ B-binding activity was detectable in control treated NHEMs

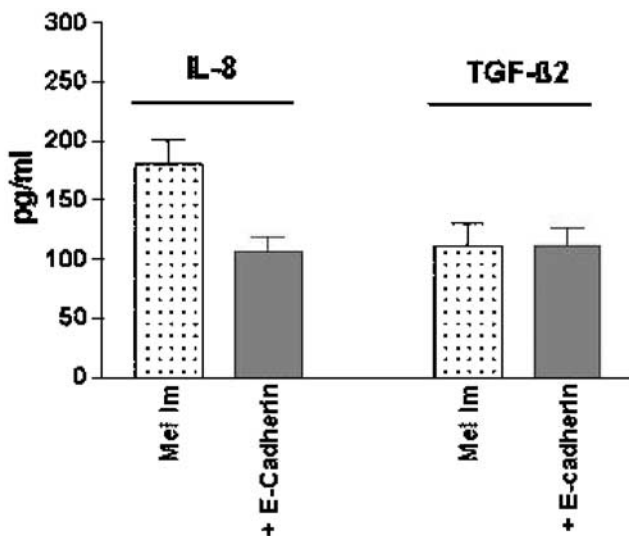


Figure 5 Expression of IL-8 and TGF β 2 in melanoma cells after re-expression of E-cadherin. The expression of IL-8 and TGF β 2 was quantified using ELISA systems. Expression was compared between Mel Im cells and the E-cadherin re-expressing Mel Im cells. A reduction of IL-8 expression was seen, whereas no change in TGF β 2 expression was found

we used inhibitors of MAP kinases. Interestingly, NF κ B transcriptional activity was strongly reduced following inhibition of p38 by SB203580 (4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole) and SB202190 (4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole) in Mel Im cells (data not shown), whereas inhibitors against p42/44ERK did not show an effect (PD98059, 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one). Further, we investigated whether MAP kinase kinase1 (MEKK1) was involved

as an upstream regulating factor but found it not to be involved in p38 regulation by E-cadherin (data not shown).

As loss of E-cadherin is accompanied by free cytoplasmatic β -catenin, we analysed the localization of β -catenin in melanoma tissue by immunohistochemistry and could clearly show strong cytoplasmatic but no membrane staining (data not shown).

Also, immunofluorescence data of Mel Im cells showed cytoplasmatic and not nuclear localization of β -catenin in this cells (Figure 7a). To trigger this effect of β -catenin in the melanoma cell line Mel Im, we transiently transfected the cells with β -catenin. To check the transfection efficiency, we used the quantitative RT-PCR and immunofluorescence. Figure 8a shows the increase in cytoplasmatic fluorescence in β -catenin transiently transfected cells in comparison to nontransfected Mel Im cells. Figure 7b engage this finding with the higher expression of β -catenin after transfection. We then measured the effect of free β -catenin on p38 and NF κ B activation in melanoma cells. Transient transfection of β -catenin into the melanoma cell line Mel Im resulted in an upregulation of p38 activity (Figure 7c) and enhanced NF κ B transcriptional activity (Figure 7d). No effect on p38 and on NF κ B activity was observed after transient transfection with a γ -catenin expression plasmid. Inhibitors of p38 MAPK (SB203580, SB202190) completely blocked the β -catenin-induced NF κ B activation, suggesting that this effect is mediated by p38 MAPK.

Discussion

In this study, we have shown for the first time that strong constitutive activity of NF κ B in malignant melanoma correlates with loss of E-cadherin and induction of p38 activation.

NF κ B is a key transcription factor activated by several cellular signal transduction pathways. It is of critical importance in regulating cellular processes such as inflammation, host defence, apoptosis and also tumorigenesis. We and others have shown that NF κ B is constitutively activated in malignant melanoma as well as in other types of cancer (Huang *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2001; McNulty *et al.*, 2001; Suh *et al.*, 2002). Strong induction of NF κ B in malignant melanoma was previously reported by Yang and Richmond (2001) and Shattuck-Brandt and Richmond (1997). They showed constitutive I κ B kinase activity and subsequent decrease in I κ B α steady-state levels in several melanoma cell lines. However, the molecular mechanisms of constitutive NF κ B activation in melanoma and involved upstream signalling pathways remained unclear so far.

In this study, we demonstrated that NF κ B activity is associated with the loss of E-cadherin in malignant melanoma. The experiments presented revealed that re-expression of E-cadherin in melanoma cells either by transient transfection of E-cadherin or stable by

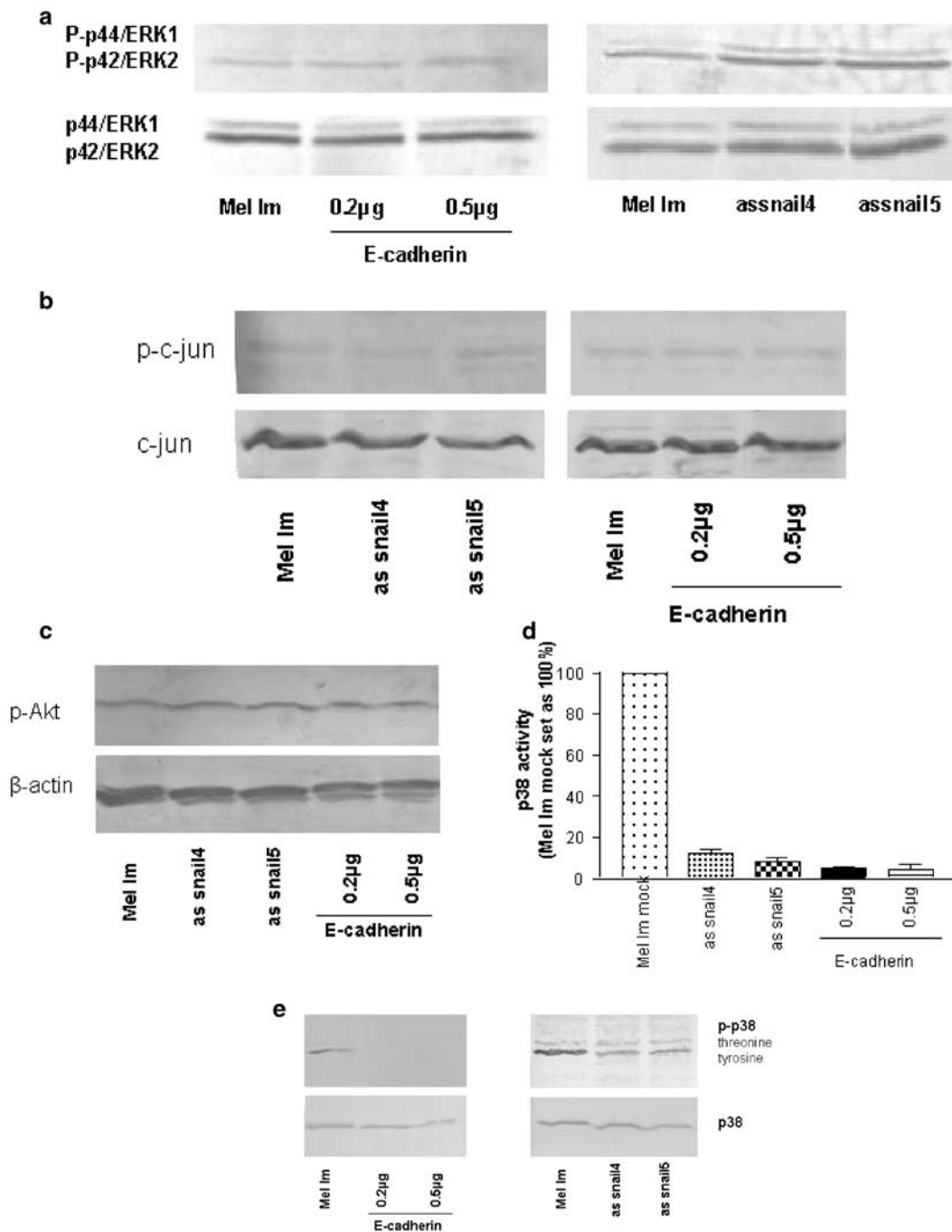


Figure 6 Analysis of MAP kinase activity in melanoma cells before and after re-expression of E-cadherin. ERK1/2 and c-jun expression and activity in the wild-type Mel Im cell line was compared to the two stably antisense snail-transfected cell clones (as snail 4 and 5, right panel) that show re-expression of E-cadherin and to Mel Im cells transiently transfected with E-cadherin (using 0.2 or 0.5 μ g plasmid DNA, left panel). **(a)** ERK2 was detected phosphorylated in melanoma cells, whereas only weak expression and phosphorylation of ERK1 was found. Upregulation of E-cadherin in the melanoma cells led to no changes in ERK1/2 phosphorylation. **(b)** The phosphorylation of c-jun was not changed comparing E-cadherin- and no E-cadherin (Mel Im)-expressing cells in Western blots for phosphorylated c-jun. The Western blot for unphosphorylated c-jun shows the equal loading of each lane. **(c)** The phosphorylation of Akt was not changed comparing E-cadherin- and no E-cadherin-expressing cells in a Western blot detecting phosphorylated Akt. β -Actin shows the equal loading of the samples. **(d)** The analysis of p38 was carried out using an ELISA system. Downregulation of p38 phosphorylation was observed after re-expression of E-cadherin in melanoma cells (as snail 4 and 5) and E-cadherin transiently transfected cells compared to the mock-transfected Mel Im cells (set as 100%). Equally in loading was assured by adjusting total protein amount. **(e)** Western blots were performed in addition to the ELISA analysis. Using an antibody against P-p38, downregulation of the phosphorylation of p38 could be shown. The Western blot of unphosphorylated p38 shows the equal loading of each lane

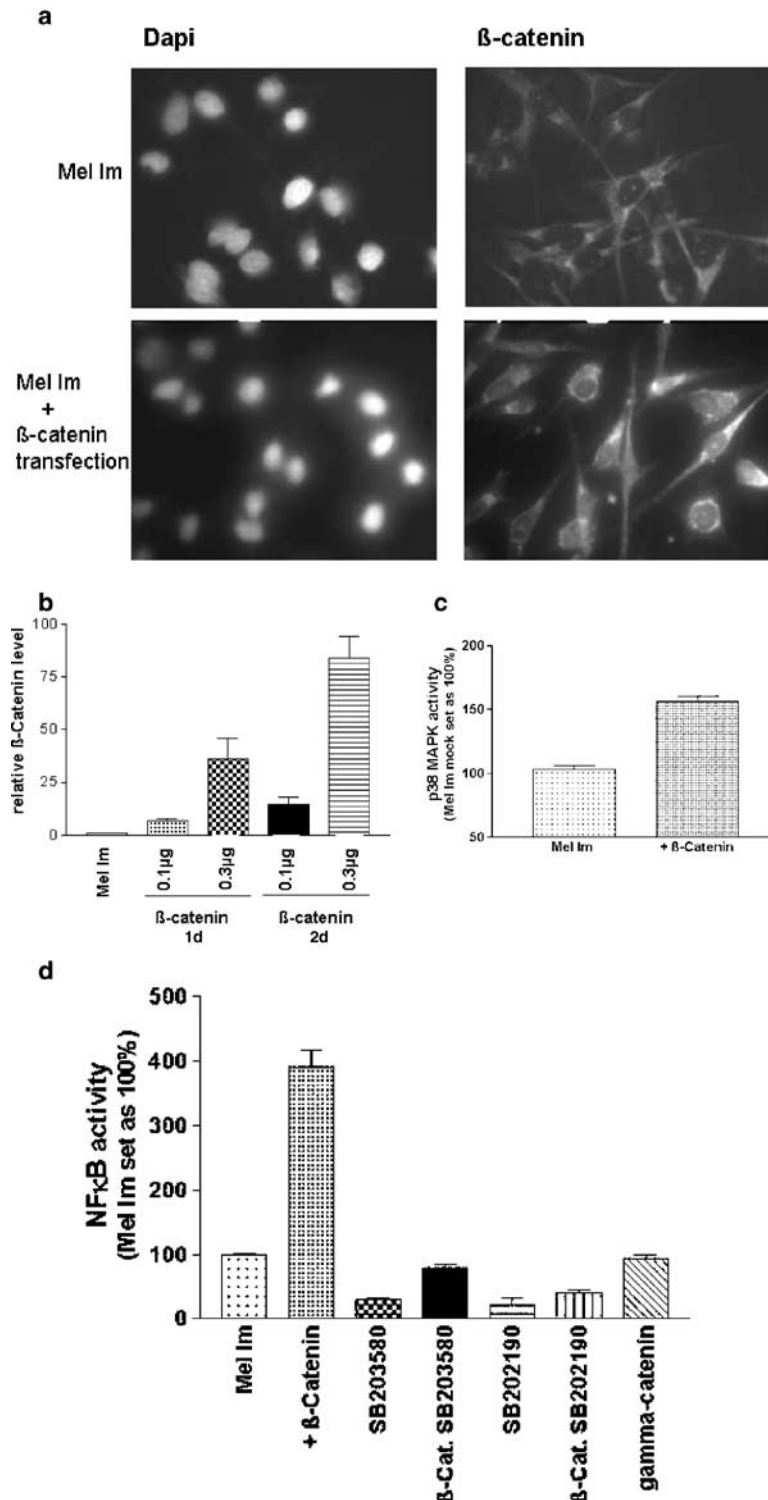


Figure 7 Influence of β -catenin on p38 MAPK and NF κ B activity. (a) Immunofluorescence staining of β -catenin revealed cytoplasmic staining in Mel Im cells. After transfection of β -catenin, the immunofluorescence staining in the cytoplasm of the transfected cells is stronger than the control Mel Im cells. (b) Upregulation of β -catenin mRNA expression in the transiently transfected Mel Im cells was analysed by real-time PCR after 24 and 48 h. (c) Regulation of p38 activity by β -catenin was analysed using transient transfection of a β -catenin expression plasmid into Mel Im melanoma cells followed by a p38 MAPK ELISA. The control Mel Im cells were mock transfected. An upregulation of p38 MAPK by β -catenin in comparison to the control was shown. The p38 activity in the mock-transfected control was set as 100%. (d) NF κ B reporter gene assays using the NF κ B-luc construct to detect NF κ B activity were performed in the melanoma cell line Mel Im. The cells were either mock transfected or transiently transfected with β -catenin or γ -catenin expression vectors. An upregulation of NF κ B activity by β -catenin in comparison to the control was shown, whereas γ -catenin had no effect

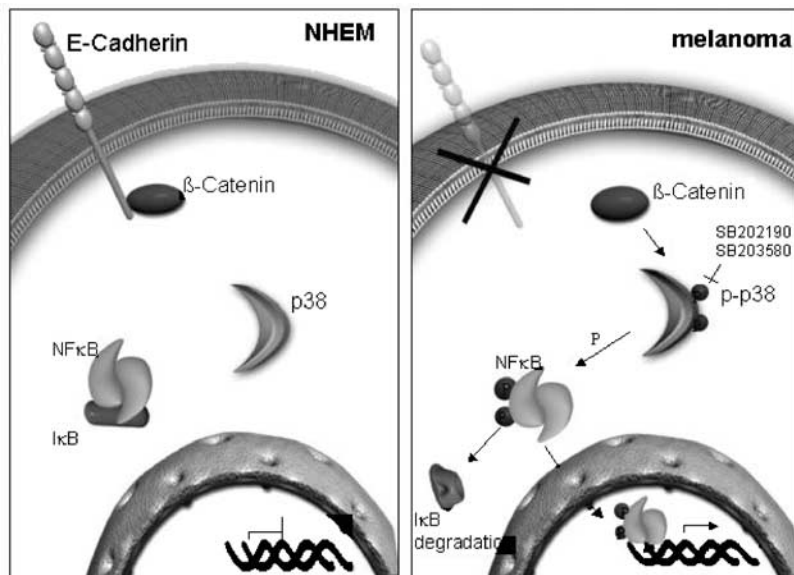


Figure 8 Model: Loss of E-cadherin stimulates the transactivation potential of NF κ B by targeting β -catenin and p38 in melanoma cells. We propose that loss of E-cadherin expression leads to enhanced free cytoplasmic β -catenin resulting in activation of p38 MAPK. p38 MAPK is inducing NF κ B binding and transcriptional activity

inhibiting snail expression (Poser *et al.*, 2001) led to downregulation of NF κ B DNA-binding activity and NF κ B transcriptional activity shown in Figure 3a–c. Furthermore, our data indicate the enhanced shift of p65 into the cytoplasm in E-cadherin-expressing cells. The non-E-cadherin-expressing Mel Im cells exhibit a higher amount of phosphorylated p65 in the nucleus. Figure 3f and 5 present enhanced I κ B level and reduced expression of NF κ B target genes after re-expression of E-cadherin. With the expression of E-cadherin, the amount of the inhibitory protein (I κ B) of NF κ B increases, the translocation of p65 into the nucleus is prevented and the therefore target genes will not be stimulated by NF κ B.

Normal human epithelial melanocytes (NHEM) show no NF κ B activity but strong E-cadherin expression. Consistently, we could show that treatment of primary human melanocytes with functionally blocking anti-E-cadherin antibodies led to induction of NF κ B activity. This gives the hint for the exceptional role of E-cadherin for the normal human melanocytes and the developing of consequences if E-cadherin expression is lost in melanoma cells.

Previously, other reports demonstrated a correlation between E-cadherin and regulation of MAP kinases. Pece and Gutkind (2000) analysed the activity of MAP kinases p42/p44 in keratinocytes after formation of adherent junctions and revealed remarkable increase in the state of activation. However, in this study, only an unspecific MAPK activity assay was used and consequently no information on the kind of MAPK could be gained. Here, to clarify the regulation of NF κ B by E-cadherin in more detail, we started to analyse the influence of E-cadherin on different MAP kinases. Our assays demonstrated strong activity of the MAP

kinases in the melanoma cell lines. After retransfection of E-cadherin, our data revealed marked downregulation of p38 MAPK activity in melanoma cells, whereas erk1, erk2, and JNK activity remained unchanged. In accordance to these results, the use of inhibitors of p38 MAPK activity resulted in an almost complete inhibition of NF κ B activity and enhanced I κ B level.

A possible interaction between p38 MAPK and NF κ B was first suggested by Maulik *et al.* (1998). They presented evidence that the p38 inhibitor SB203580 prevents NF κ B nuclear translocation during ischemic adaptation. Similarly, tumor necrosis factor (TNF)-induced NF κ B activity is blocked by p38 inhibitors (Beyaert *et al.*, 1996; Carpentier *et al.*, 1998). Carter *et al.* (1999) presented that this regulation is in part dependent on the modulation of the activation of transcription factor IID (TFIID). Further, activation of NF κ B can occur due to phosphorylation of the p65 subunit of NF κ B. This alternative mechanisms of NF κ B activation was discussed by several groups (Vanden Berghe *et al.*, 1998; Madrid *et al.*, 2001). It has been shown that the cytokines TNF and interleukin-1 β lead to phosphorylation of p65 through pathways distinct from induced nuclear translocation. Evidence has been presented that p38 MAP kinase is involved in p65 phosphorylation (Wesselborg *et al.*, 1997; Bergmann *et al.*, 1998). A study performed by Wang and Richmond (2001) revealed that NF κ B is not regulated by the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade in malignant melanoma, further supporting our data. These authors also demonstrated the importance of p38 MAPK in activating NF κ B, but, in contrast to our experiments, MEKK1 was involved in the analysed MGSA/GRO- α -induced signalling of E-cadherin.

The importance of p38 activity for invasion of malignant melanoma cells was determined by Denkert *et al.* (2002) This study revealed that p38 MAPK inhibition resulted in reduced invasive potential and downregulation of matrix-metalloproteinase 2 (MMP2) expression.

The strong and constitutive activity of the MAPK pathways has been reported previously for malignant melanoma (Englaro *et al.*, 1998; Kortylewski *et al.*, 2001; Denkert *et al.*, 2002). Here, we further investigated the mechanism leading to p38 MAPK activation in malignant melanoma. In our study, we have shown that β -catenin is involved in p38 MAPK activation. Transient transfection of β -catenin resulted in an enhanced p38 activity, which correlates with the enhancement of NF κ B activity. Owing to the loss of E-cadherin, enhanced amounts of free β -catenin can be found in the cytoplasm (Novak and Dedhar, 1999; Orsulic *et al.*, 1999). Further, Li *et al.* (2001) recently described stabilization of β -catenin in melanoma cells by N-cadherin. They suggest the stabilization to be controlled by activation of Akt/PBD through N-cadherin-mediated intercellular interaction.

It has been suggested by several reports that the switch from E-cadherin to N-cadherin expression in malignant melanoma has a main impact on tumor development and progression. For example, Li *et al.* (2001) demonstrated that N-cadherin promotes survival and migration of melanoma cells, processes otherwise being repressed and strictly controlled via E-cadherin.

Striking, NF κ B activation is connected to multiple aspects of oncogenesis, including the control of apoptosis and migration and NF κ B activity is elevated in malignant melanoma.

To our knowledge, this is the first report showing a correlation between E-cadherin expression and NF κ B activity (Figure 8). In summary, we conclude that loss of E-cadherin and cytoplasmatic β -catenin induces p38-mediated NF κ B activation. These findings potentially reveal an important mechanism of tumor genesis in malignant melanomas.

Materials and methods

Cell lines and cell culture conditions

The melanoma cell line Mel Im has been described in detail previously (Jacob *et al.*, 1998). It was derived from a metastasis of malignant melanomas. Further, melanoma cell lines Mel Ju, Mel Wei, Mel Juso, Mel Ho, Mel Ei, HTZ-19d, and SK-Mel 28 were used (Jacob *et al.*, 1998). For tissue culture, the cells were maintained in DMEM supplemented with penicillin (400 U/ml), streptomycin (50 μ g/ml), L-glutamine (300 μ g/ml), and 10% fetal calf serum (FCS; Sigma, Deisenhofen, Germany) and splitted 1:5 every 3 days.

Human primary melanocytes derived from normal skin were cultivated in melanocyte medium MGM-3 (Gibco, Eggenstein, Germany) under a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cells were used between passages 6 and 10 and not later than 3 days after trypsinization. Cells were detached for subcultivation or assay with 0.05% trypsin, 0.04% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS).

An inhibitory mouse monoclonal E-cadherin antibody (clone M106, 0.2 μ g/ μ l, Takara, Shiga, Japan) was used in a concentration of 1 μ g/ml to analyse the effect of E-cadherin inhibition on primary human melanocytes. The cells were incubated for 24 h.

SB203580 and SB202190 (Calbiochem, San Diego, USA) were used as specific inhibitors for p38 MAPK, and PD98059 as a specific inhibitor of p42/44 ERK. Cells were treated for 24 h with a concentration of 10 and 20 μ M (for SB203580 and SB202190) or 1 and 10 μ M (for PD98059).

Transfection experiments and luciferase measurements

For transient transfections 2 \times 10⁵ cells were seeded into each well of a six-well plate and transfected with 0.5 μ g plasmid DNA using the lipofectamine plus method (Gibco) according to the manufacturer's instructions. The cells were lysed 24 h after transfection and the luciferase activity in the lysate was quantified by a luminometric assay (Promega Corp., Madison, USA). Transfection efficiency was normalized according to renilla luciferase activity by cotransfecting 0.1 μ g of the plasmid pRL-TK (Promega). All transfections were repeated at least four times. For transient transfection, the plasmids NF κ B-luc (Promega), pBAT-E-cadherin (generous gift from Gabriele Handschuh (Institute of Pathology, LMU Munich, Germany)), and β - γ -catenin expression vectors (generous gift from Eric Fearon, University of Michigan Medical School, USA) were used.

Further, a panel of Mel Im cell clones was established by stable transfection with an antisense Snail expression plasmid (Poser *et al.*, 2001) under the control of a CMV promoter and cotransfected with the neo-selectable pcDNA3 plasmid (Invitrogen, Groningen, Holland). Transfection was performed using lipofectamine plus (Gibco) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were cultured under selective conditions using G418 (Sigma) in a concentration of 50 μ g/ml. Controls received pcDNA3 alone. After 25 days of selection, individual G418-resistant colonies were subcloned. E-cadherin expression levels of these clones were determined by Western blot analysis of the cell lysates.

Western blotting

Cells (3 \times 10⁶) were lysed in 200 μ l RIPA buffer (Roche, Mannheim, Germany) and incubated for 15 min at 4°C. Insoluble fragments were removed by centrifugation at 13000 r.p.m. for 10 min and the supernatant lysate was immediately shock frozen and stored at -80°C. In total, 7-40 μ g of RIPA complete cell lysate or nuclear and cytoplasmatic protein fraction were loaded per lane and separated on SDS-PAGE gradient gels (Invitrogen) and subsequently blotted onto a PVDF membrane. After blocking for 1 h with 3% BSA/PBS, the membrane was incubated for 16 h with one of the following antibodies: anti-Erk1/2, anti-P-ERK1/2, anti-p38, anti-P-SAPK/JNK, anti-I κ B α , anti-p-Akt (all from Cell signaling, Beverly, USA), anti-c-jun, and anti-P-c-jun (both from Upstate, Waltham, USA), anti E-cadherin (BD Transduction Laboratories), anti β -actin (Sigma), respectively. We used an alternative blocking method with 5% nonfat dry milk in TBS for the antibodies: anti p65 (Rockland) anti P-p65 (Cell signaling), and anti-P-p38 (Biosource). After three washing steps with PBS or TBS, respectively, the membrane was incubated for 1 h with an alkaline phosphate-coupled secondary anti-mouse or anti rabbit IgG antibody (AP303A, Chemicon, Hofheim, Germany) and then washed again. Finally, immunoreactions were visualized by NBT/BCIP (Sigma) staining.

Immunofluorescence

p65 immunofluorescence analysis was performed as described previously (Hellerbrand *et al.*, 1998). Briefly, 4×10^5 cells were seeded on four-well culture slides (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) and fixed after growing for 24 h with ice-cold acetone. Subsequently, slides were washed in PBS and unspecific binding was blocked using 5% BSA/PBS. Then slides were incubated with an anti p65 antibody (1:50; Rockland, Gilbertsville, PA, USA) and anti- β -catenin antibody (Santa Cruz Biotechnology) in 5% BSA/PBS, washed three times with PBS and incubated with FITC-anti-rabbit (1:400; DAKO, Glostrup, Denmark), washed again and finally sealed with VectaShield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) including 1 μ g/ml DAPI (Sigma). Slides were viewed using a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany) and images were taken with a cooled charge-coupled device camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA).

p38-ELISA

P-p38 MAPK was measured quantitatively using a phospho ELISA p38 MAPK (pTPY180/182) kit (BioSource International, USA). The ELISA was performed as described by the manufacturer.

IL-8 and TGF- β 2 ELISA

IL-8 and TGF- β 2 expression were analysed in the supernatant of melanoma cells using ELISAs from Promocell (Heidelberg, Germany) and R&D Systems (Minneapolis, USA), respectively. The assays were performed as described by the manufacturers.

References

- Baldwin AS. (2001). *J. Clin. Invest.*, **107**, 241–246.
 Bergmann M, Hart L, Lindsay M, Barnes PJ and Newton R. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 6607–6610.
 Bex G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C and van Roy F. (1995). *EMBO J.*, **14**, 6107–6115.
 Bex G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F and Cornelisse C. (1996). *Oncogene*, **13**, 1919–1925.
 Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P and Fiers W. (1996). *EMBO J.*, **15**, 1914–1923.
 Bosserhoff AK, Hein R, Bogdahn U and Buettner R. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 490–495.
 Carpentier I, Declercq W, Malinin NL, Wallach D, Fiers W and Beyaert R. (1998). *FEBS Lett.*, **425**, 195–198.
 Carter AB, Knudtson KL, Monick MM and Hunninghake GW. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 30858–30863.
 Cowin P. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10759–10761.
 Davis RE, Brown KD, Siebenlist U and Staudt LM. (2001). *J. Exp. Med.*, **194**, 1861–1874.
 Denkert C, Siegert A, Leclere A, Turzynski A and Hauptmann S. (2002). *Clin. Exp. Metast.*, **19**, 79–85.
 Englaro W, Bertolotto C, Busca R, Brunet A, Pages G, Ortonne JP and Ballotti R. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 9966–9970.
 Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D and Birchmeier W. (1991). *J. Cell Biol.*, **113**, 173–185.

Gel shift experiments

A double-stranded oligomeric binding site for NF κ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', Promega) was phospholabelled and used for gel mobility-shift assays. Nuclear extracts were prepared from primary melanocytes and Mel Im cells and gel shifts were performed as described previously (Bosserhoff *et al.*, 1996).

Abbreviations

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; I κ B (IkappaB), inhibitor of NF κ B; IL-8, interleukin 8; JNK, c-jun NH₂-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Mekk1, MAP kinase kinase1; MMP2, matrix-metalloproteinase 2; NF κ B, nuclear factor kappa B; NHEM, normal human epidermal melanocytes; PBS, phosphate-buffered saline; PD98059, 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one; PKB, protein kinase B; RT, reverse transcription; SAPK, stress-activated protein kinase; SB202190, 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole; SB203580, 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole; TCF, T-cell factor; TGF β 2, transcriptional growth factor beta 2.

Acknowledgements

We are indebted to Astrid Hamm and Claudia Abschlag for technical assistance and to Eric Fearon and Gabriele Handschuh for providing β - γ -catenin- and pBAT-E-cadherin expression vectors, respectively. We thank Guy Haegeman for helpful discussions. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to AB.

- Gumbiner B, Stevenson B and Grimaldi A. (1988). *J. Cell Biol.*, **107**, 1575–1587.
 Hellerbrand C, Jobin C, Licato LL, Sartor RB and Brenner DA. (1998). *Am. J. Physiol.*, **275**, G269–G278.
 Huang S, DeGuzman A, Bucana CD and Fidler IJ. (2000). *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2573–2581.
 Jacob K, Wach F, Holzapfel U, Hein R, Lengyel E, Buettner R and Bosserhoff AK. (1998). *Melanoma Res.*, **8**, 211–219.
 Kortylewski M, Heinrich PC, Kauffmann ME, Bohm M, MacKiewicz A and Behrmann I. (2001). *Biochem. J.*, **357**, 297–303.
 Li G, Satyamoorthy K and Herlyn M. (2001). *Cancer Res.*, **61**, 3819–3825.
 Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY and Baldwin Jr AS. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 18934–18940.
 Maulik N, Sato M, Price BD and Das DK. (1998). *FEBS Lett.*, **429**, 365–369.
 McNulty SE, Tohidian NB and Meyskens Jr FL. (2001). *Pigment Cell Res.*, **14**, 456–465.
 Melki JR, Vincent PC, Brown RD and Clark SJ. (2000). *Blood*, **95**, 3208–3213.
 Nollet F, Bex G and van Roy F. (1999). *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, **2**, 77–85.
 Novak A and Dedhar S. (1999). *Cell Mol. Life Sci.*, **56**, 523–537.
 Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S and Kemler R. (1999). *J. Cell Sci.*, **112**, 1237–1245.
 Peco S and Gutkind JS. (2000). *J. Biol. Chem.*, **275**, 41227–41233.

- Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R and Bosserhoff AK. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 24661–24666.
- Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR and Jankowski J. (1999). *Mol. Pathol.*, **52**, 151–157.
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR and Hendrickson WA. (1995). *Nature*, **374**, 327–337.
- Shattuck-Brandt RL and Richmond A. (1997). *Cancer Res.*, **57**, 3032–3039.
- Silye R, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Poole S, van Noorden S, Batchelor W, Regele H, Sega W, Boesmueller H, Krausz T and Pignatelli M. (1998). *J. Pathol.*, **186**, 350–355.
- Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, Amenta PS, Zong WX, Gelinas C and Rabson AB. (2002). *Prostate*, **52**, 183–200.
- Tamura G, Sakata K, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Terashima M, Saito K and Satodate R. (1996a). *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 1153–1159.
- Tamura S, Shiozaki H, Miyata M, Kadowaki T, Inoue M, Matsui S, Iwazawa T, Takayama T, Takeichi M and Monden M. (1996b). *Br. J. Surg.*, **83**, 1608–1614.
- Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W and Haegeman G. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 3285–3290.
- Vleminckx K, Vakaet Jr L, Mareel M, Fiers W and van Roy F. (1991). *Cell*, **66**, 107–119.
- Wang D and Richmond A. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 3650–3659.
- Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S and Takeichi M. (1994). *J. Cell Biol.*, **127**, 247–256.
- Wesselborg S, Bauer MK, Vogt M, Schmitz ML and Schulze-Osthoff K. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 12422–12429.
- Yang J and Richmond A. (2001). *Cancer Res.*, **61**, 4901–4909.

Anhang II

Oncogene (2004), 1–10
© 2004 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/0
www.nature.com/onc

ORIGINAL PAPER

Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma

Ina Poser¹, Jutta Tatzel¹, Silke Kuphal¹ and Anja K Bosserhoff^{ff*1}

¹*Institute of Pathology, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, D-93053 Regensburg, Germany*

ORIGINAL PAPER

Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma

Ina Poser¹, Jutta Tatzel¹, Silke Kuphal¹ and Anja K Bosserhoff^{*1}

¹Institute of Pathology, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, D-93053 Regensburg, Germany

The protein MIA (melanoma inhibitory activity) is highly expressed in malignant melanomas but not in melanocytes. Furthermore, expression of MIA correlates with tumor progression *in vivo*. Here, MIA-dependent changes of gene expression after long-term inhibition of MIA expression in the human melanoma cell line HMB2 were investigated. Primarily, we observed characteristic changes in cell morphology, and also found re-established cell–cell contacts in MIA-deficient cell clones grown in monolayer culture. Real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) showed a downregulation of N-cadherin expression and a reinduction of E-cadherin expression in the MIA-deficient cell clones. Further, both cancer cDNA array and protein arrays verified a marked downregulation of several other melanoma-associated genes (e.g. membrane-type 1 matrix metalloproteinase tissue-type plasminogen activator integrin $\beta 3$, secreted protein acidic and rich in cysteins and fibronectin) in the MIA-deficient melanoma cells, confirmed by real-time RT–PCR and Western blotting. As all these molecules are associated with migration, the effect of MIA on migration of human primary melanocytes was analysed. In the presence of MIA, we observed enhanced migratory ability of melanocytic cells, induction of melanoma-associated genes as well as inhibition of apoptosis due to anoikis. These results suggest that expression of MIA promotes melanoma progression by inducing further melanoma-associated genes.

Oncogene advance online publication, 21 June 2004;
doi:10.1038/sj.onc.1207797

Keywords: melanocytes; melanoma; migration; MIA; array

Introduction

Melanoma inhibitory activity (MIA) was cloned as a secreted protein from human melanoma cell lines (Blesch *et al.*, 1994; van Groningen *et al.*, 1995). Later, it was shown that MIA is expressed in malignant melanomas and chondrosarcomas (Bosserhoff *et al.*, 1996, 1999). Today, increased serum levels of MIA serve as a reliable clinical marker to detect and monitor

metastatic disease in patients with malignant melanomas (Bosserhoff *et al.*, 1997; Stahlecker *et al.*, 2000), indicating an important role for them in tumor progression and metastasis.

For a deeper insight into the functional properties of MIA, multidimensional NMR (Stoll *et al.*, 2000, 2001, 2003) and X-ray crystallography (Lougheed *et al.*, 2001) were used to solve the three-dimensional structure of MIA. The corresponding data indicate that MIA defines a novel type of secreted protein, which adopts an SH3 domain-like fold in solution. Furthermore, nuclear magnetic resonance (NMR) spectra revealed that MIA interacts with peptides matching to type III human fibronectin repeats that are closely related to integrin-binding sites (Stoll *et al.*, 2001). These findings are supported by recent data showing that MIA shares significant structural homologies with the binding pockets of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins, suggesting that secreted MIA masks the respective integrin-binding epitopes on extracellular matrix molecules (Bosserhoff *et al.*, 2003). These results are consistent with initial findings that MIA expression causes detachment of melanoma cells from the extracellular matrix or cell culture dishes, respectively (Stoll *et al.*, 2001), implicating a model, in which MIA regulates attachment/detachment of melanoma cells and promotes their migratory behavior.

This hypothesis is strengthened by *in vivo* experiments. In animal models, it was shown that MIA expression levels correlate closely with the capability of melanoma cells to form metastases (Guba *et al.*, 2000; Bosserhoff *et al.*, 2001). In the study of Guba *et al.*, A-mel 3 hamster melanoma cells were transfected with sense and antisense MIA cDNA and analysed subsequently for changes in their tumorigenic and metastatic potential. Enforced expression of MIA in A-mel 3 cells significantly increased their metastatic potential as compared with control or antisense transfected cells. In addition, MIA-overexpressing transfectants showed a higher rate of both tumor cell invasion and extravasation. Consistently, cell clones transfected with an antisense MIA cDNA expression plasmid revealed significantly reduced metastatic potential. The changes in metastatic behavior in correlation with the expression level of MIA provide evidence that upregulation of MIA during malignant transformation of melanocytic cells is causally involved in the acquisition of pathophysiologically relevant malignant characteristics. These results were further confirmed by a second study using B16 mouse melanoma cells in C57Bl6 mice. Here, B16 mouse

*Correspondence: A Bosserhoff;

E-mail: anja.bosserhoff@klinik.uni-regensburg.de

Received 18 December 2003; revised 9 March 2004; accepted 9 April 2004

melanoma cells secreting different amounts of MIA were generated by stable transfection (Bosserhoff *et al.*, 2001). The capacity of these cell clones to form lung metastases in syngeneic C57Bl6 mice was strictly correlated to the level of MIA secretion.

Despite the extracellular effects of MIA on attachment of the cells by masking binding sites of the cellular matrix and therefore facilitating migration and metastasis of melanoma cells, endogenous effects on gene expression are also hypothesized.

In this study, we aimed to analyse the effect of MIA on expression of specific genes involved in the aggressive migration behavior of melanoma cells using an established model system of MIA-expressing melanoma cells and cell clones consistently lacking MIA expression. To verify MIA-induced changes of gene expression, primary human melanocytes were treated with MIA and further analysed with respect to expression of melanoma-relevant genes and altered migration behavior.

Results

The acquisition of an invasive and metastatic phenotype is a key event in tumor progression. Recent evidence revealed that the secreted protein MIA is highly expressed in malignant melanomas and associated with tumor progression *in vivo*. Here, we further investigated the role of MIA in the early process of tumor development by inhibiting MIA expression of the human melanoma cell line HMB2 consistently.

Establishing MIA-deficient melanoma cell clones

Long-term MIA-deficient melanoma cell clones were generated by stable transfection of the melanoma cell line HMB2 with an antisense MIA cDNA expression construct. Two cell clones completely lacking MIA expression (HMB2-5; HMB2-8) were chosen for further analysis. A cell clone expressing β -galactosidase (HMB2lacZ) was used as a mock control to verify the specificity of the MIA-deficient melanoma cell clones HMB2-5 and HMB2-8. Downregulation of MIA expression in HMB2-5 and HMB2-8 cell clones was confirmed by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) (data not shown) and by determining the amount of MIA protein in the supernatant of the cells. HMB2lacZ showed MIA expression comparable to the parental cell line HMB2 (MIA expression of 1 million cells in 24 h: HMB2: 75 ng MIA/ml \pm 2.3 and HMB2lacZ: 79 ng MIA/ml \pm 4.8, compared to HMB2-5 and HMB2-8: 0 ng MIA/ml).

Changes in cell morphology

MIA-deficient cell clones revealed characteristic changes in cell morphology (Figure 1a). Interestingly, in monolayer culture, HMB2-5 and HMB2-8 cells formed clusters, whereas HMB2 and HMB2lacZ cells showed the typical scattered growth pattern of melanoma cells. Further, HMB2-5 and HMB2-8 cells were significantly

smaller than the parental melanoma cells (HMB2) (Figure 1b). These findings implicated multiple alterations in gene expression induced by the long-term reduction of MIA in the MIA-deficient cell clones.

Comparison of mRNA expression pattern

To compare easily mRNA expression pattern of the cell clones, cDNA arrays resembling 588 cDNAs were performed using cDNA from HMB2 and HMB2-5 cells. Interestingly, the cancer cDNA array presented a marked downregulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) (MMP14; membrane-type 1 matrix metalloproteinase), t-PA (tissue-type plasminogen activator), integrin β 3, SPARC (BM40, 'secreted protein acidic and rich in cysteins') and fibronectin mRNA in the MIA-deficient cell clone. All these genes are known to be associated with migration, metastasis and progression in melanoma and other kinds of cancer. Downregulation of the genes was confirmed by real-time RT–PCR analysing all four cell clones (HMB2, HMB2lacZ, HMB2-5, HMB2-8) as shown in Table 1 and Figure 2a and b. Expression levels of all genes analysed were strongly downregulated in the MIA-deficient cell clones. To verify the regulation of gene expression in MIA-deficient melanoma cells in other melanoma cell lines and species, additional cell clones previously generated from B16 mouse melanoma cells were analysed (Bosserhoff *et al.*, 2001). Here, two cell clones were used: one cell clone showed reduction to 60% MIA expression compared to the original B16 cells (B16 60% MIA), the second cell clone only expressed 10% MIA (B16 10% MIA). Real-time PCR measuring mRNA expression of tPA, fibronectin, MT1-MMP, SPARC and integrin β 3 revealed, in analogy to the HMB2 cell system, a markedly reduced expression in the MIA-deficient cell clones (Figure 2c). Additionally, the results suggest a dose-dependent effect as the downregulation in the cell clones expressing still 60% MIA is smaller.

Comparison of protein expression pattern

To further confirm the findings on mRNA level, two different technologies were used to screen the protein expression pattern of HMB2 and MIA-deficient melanoma cells (HMB2-5 cell clone). Both antibody microarray (analysing expression of 380 proteins) and the 'Power Blot' method (analysing expression of 600 proteins) detected altered protein expression comparing the parental melanoma cell line to the HMB2-5 cell clone.

Downregulation of fibronectin (ratio HMB2-5/HMB2: 0.342) and integrin β 3 (ratio HMB2-5/HMB2: 0.58) protein expression in the MIA-deficient cell clone as shown in the cDNA cancer array was confirmed using the antibody microarray (t-PA, SPARC and MT1-MMP were not represented on this protein array). Furthermore, other genes associated with melanoma development and progression that were not represented on the cDNA array were found to be differentially

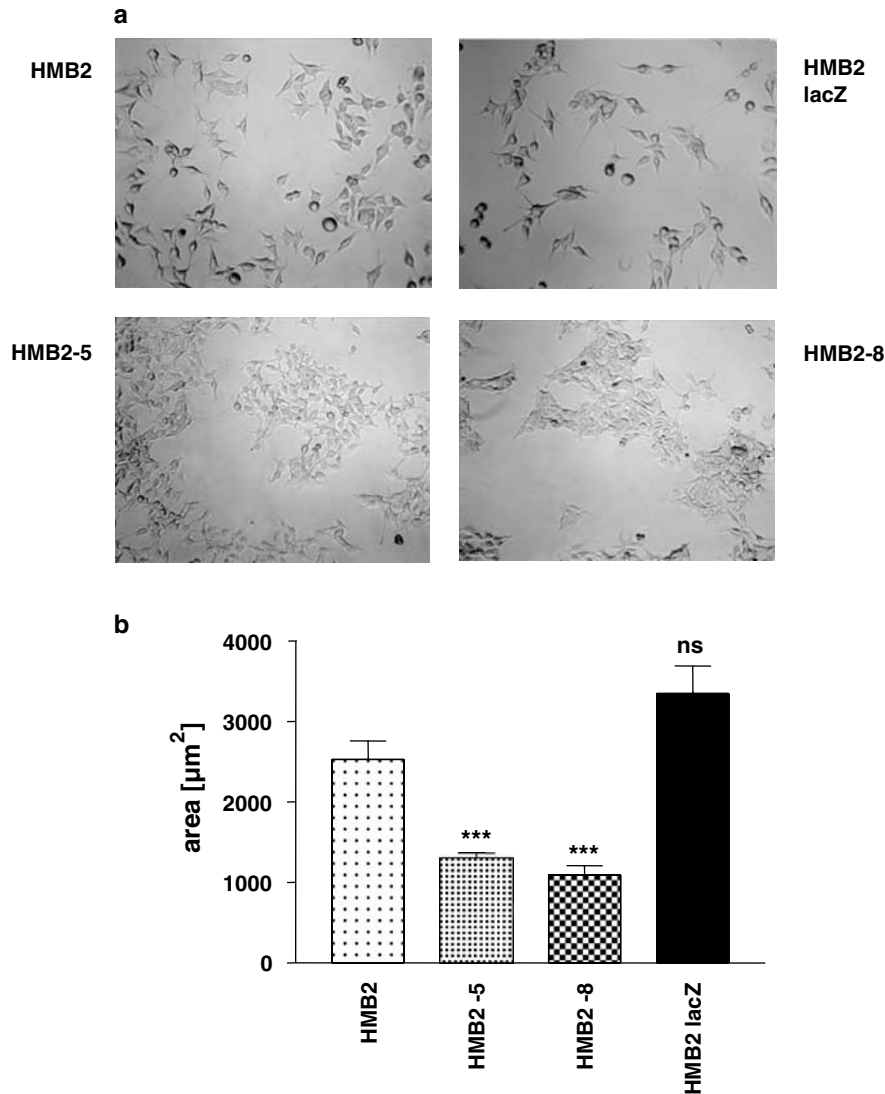


Figure 1 Growth pattern of the MIA-deficient melanoma cells compared to the original HMB2 cell line. In the original cell line HMB2 and HMB2lacZ, a scattered growth pattern was observed (a) In contrast, the HMB2-5 and -8 cells formed clusters. Furthermore, the HMB2-5 and -8 cells were smaller, as determined by quantitative measurement using the K300 software (Carl Zeiss Vision). (b) (all pictures were taken at same magnification: 20-fold)

Table 1 Analysis of mRNA expression by quantitative real-time PCR comparing melanoma cells HMB2 and HMB2lacZ to the MIA-deficient cell clones HMB2-5 and HMB2-8

Gene	HMB2/HMB2lacZ	HMB2-5/HMB2-8
Fibronectin	1	0.004
Integrin β 3	1	0.002
SPARC	1	0.01
t-PA	1	0.04
MT1-MMP	1	0.00

The data are presented as \times fold change compared to HMB2/HMB2lacZ set as 1

expressed: L1 protein (ratio HMB2-5/HMB2: 0.025) and protein kinase C α (ratio HMB2-5/HMB2: 0.151) was also strongly downregulated in the MIA-deficient cell clone.

Using the ‘Power Blot’ method, downregulation in SPARC (ratio HMB2-5/HMB2: 0.22) and fibronectin (ratio HMB2-5/HMB2: 0.41) expression was observed reconfirming the results obtained by the cDNA array. Again, additional genes associated with melanoma development and progression were found to be differentially regulated comparing HMB2 to the MIA-deficient HMB2-5 cell clone. For example, the melanoma adhesion molecule MCAM (MUC18) was shown to only be expressed in the melanoma cells but not in the MIA-deficient cell clones. Additionally, N-cadherin, a known adhesion molecule only expressed in melanoma cells but not in melanocytes, is markedly downregulated in the MIA-deficient cell clone HMB2-5 (ratio HMB2-5/HMB2: 0.12). Since neither MT1-MMP nor t-PA was included in both protein arrays (antibody array and Power Blot), expression levels of these proteins were

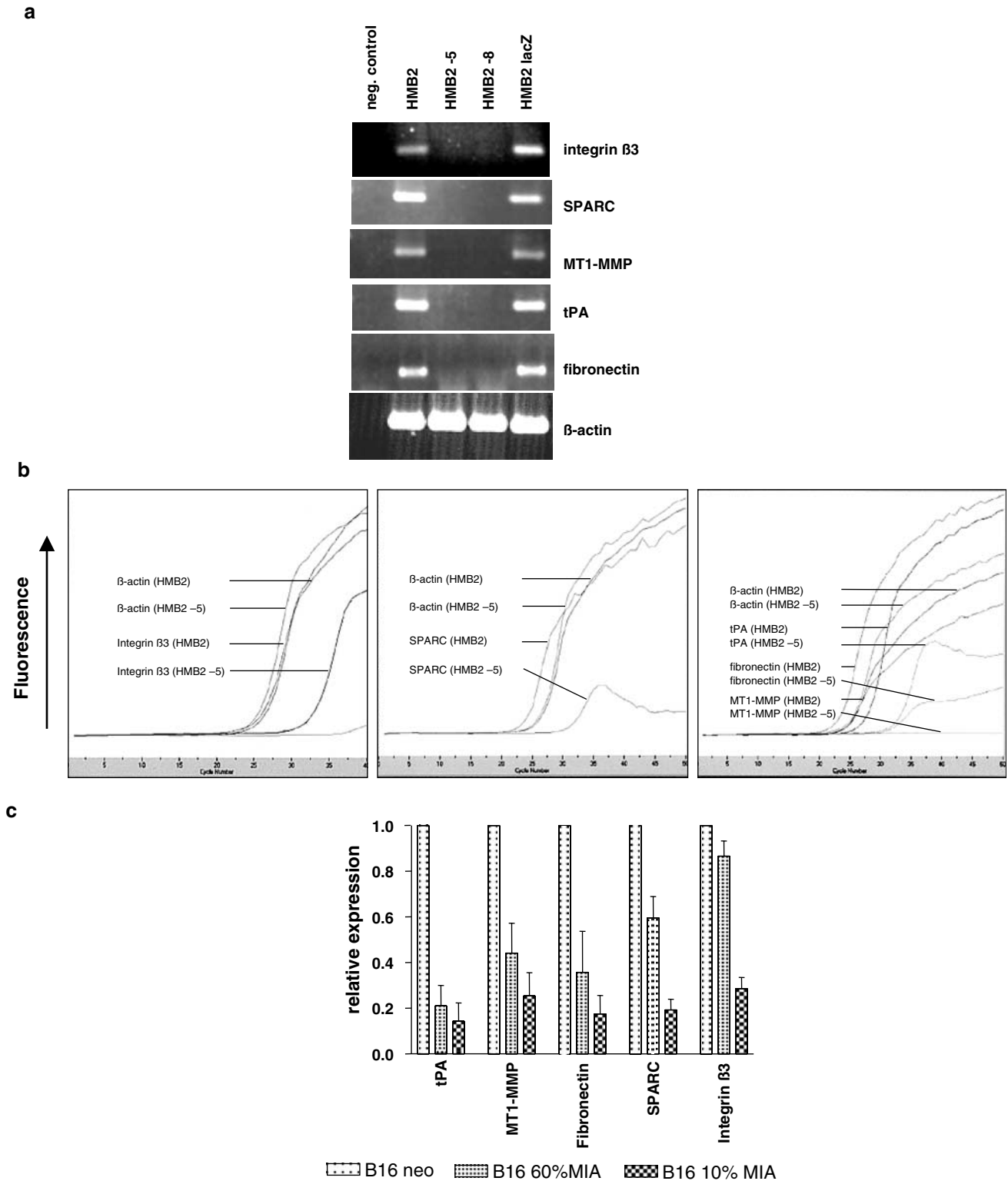


Figure 2 RT-PCR results of HMB2 and B16 MIA-deficient cell clones. **(a, b)** Expression of integrin β 3, fibronectin, SPARC, t-PA and MT1-MMP was measured in HMB2, HMB2lacZ, HMB2-5 and HMB2-8 cell clones by RT-PCR. β -Actin was used as a control to ensure integrity of the samples. PCR products were separated on an agarose gel **(a)** Further real-time PCR was performed to quantify differences in gene expression. **(b)** (results are summarized in Table 1). **(c)** Expression of integrin β 3, fibronectin, SPARC, t-PA and MT1-MMP was further measured in B16, B16 60% MIA and B16 10% MIA cell clones by real-time PCR. The relative expression compared to the original B16 cell line is shown (B16 set as 1)

verified by Western blot (Figure 3). Here, a clear reduction in protein expression level of MT1-MMP and t-PA was shown, confirming the mRNA data obtained from the cDNA array.

Alterations in expression of cell adhesion molecules

As we observed changes in cell morphology of the MIA-deficient cell clones as well as alterations in expression of melanoma-associated adhesion molecules (N-cadherin, MCAM), we further focused on the analysis of cell-cell adhesion. In melanoma, the switch from E-cadherin expression to N-cadherin expression presents an early and essential step for transition of melanocytes to migrating melanoma cells. Therefore, we analysed the expression pattern of N- and E-cadherin in the parental cell line HMB2 and the MIA-deficient cell clones. Real-time RT-PCR demonstrated a downregulation of N-cadherin expression in the MIA-deficient cell clones as shown on protein level by Power Blot technology (Figure 4). *Vice versa*, strong upregulation of E-cadherin mRNA expression was seen in HMB2-5 and -8. Western blot analysis was performed to confirm an induction of E-cadherin expression in the MIA-deficient cell clones (Figure 3) as E-cadherin was neither represented on the antibody array nor by the Power Blot analysis.

Role of MIA in melanocytic migration

Comparing the melanoma cell line HMB2 and MIA-deficient cell clones, several genes known to be associated with migration in malignant melanoma, including molecules of the cadherin system, were shown to be regulated by MIA. It is well known that loss of E-cadherin expression and subsequent loss of growth control of melanocytes mediated by keratinocytes is a very important and early step in melanoma progression. Therefore, we speculated that the extracellular presence

of MIA might have an influence on the migratory potential of melanocytic cells.

Given that MIA is a secreted protein, primary human melanocytes were treated with recombinant MIA (rMIA, 100 ng/ml), and the effect on migration and colony-forming abilities was monitored. Migration behavior of melanocytes with and without MIA treatment was analysed in the Boyden Chamber model (Figure 5). Nonstimulated melanocytes showed almost no migratory capacity whereas migration was significantly induced by treatment with rMIA (100ng/ml).

To answer the question as to whether the observed changes in migration behavior of primary human melanocytes after MIA treatment were due to altered expression of the same genes found downregulated in the MIA-deficient melanoma cell clones, we investigated whether MIA treatment induced an upregulation of t-

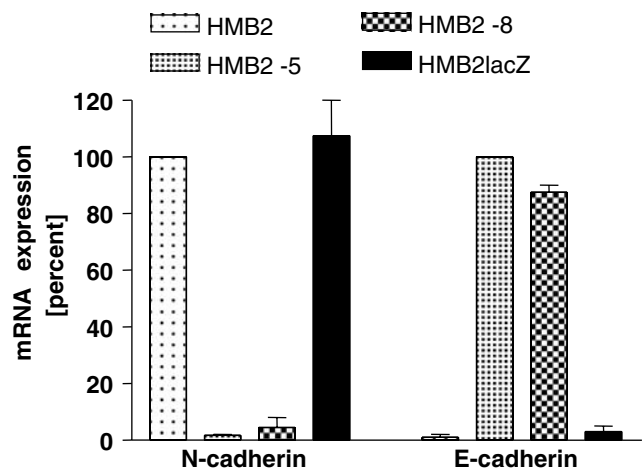


Figure 4 Cadherin mRNA expression measured by quantitative RT-PCR. Expression of N- and E-cadherin mRNA was measured in HMB2, HMB2-5, HMB2-8 and HMB2lacZ using quantitative real-time PCR. For comparison, N-cadherin expression of HMB2 and E-cadherin expression of HMB2-5 was set as 100%, respectively

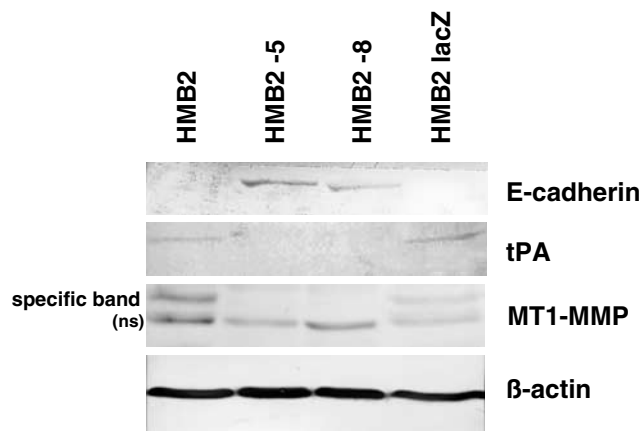


Figure 3 Western blot analysing t-PA, MT1-MMP and E-cadherin expression of the different HMB2 melanoma cell clones. Expression of E-cadherin, t-PA and MT1-MMP was measured in HMB2, HMB2lacZ, HMB2-5 and HMB2-8 cell clones by Western blot. β -Actin was used as a control to ensure equal loading and to show integrity of the samples

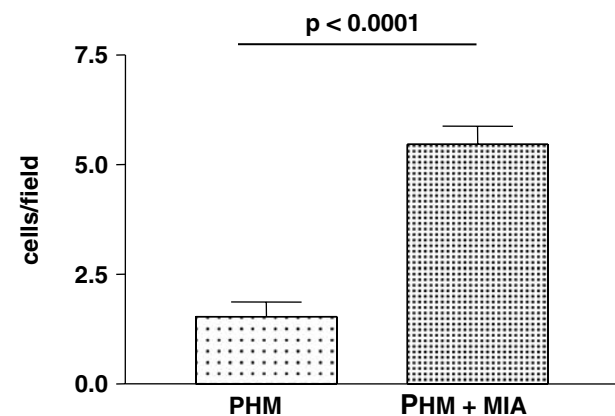


Figure 5 Migration of primary human melanocytes after MIA treatment. Boyden Chamber experiments were performed to analyse the migratory potential of primary human melanocytes (PHM) with and without MIA treatment (100 ng/ml)

PA, integrin $\beta 3$, MT1-MMP, SPARC (BM40) and fibronectin in primary human melanocytes. Gene expression of primary melanocytes with and without MIA treatment was determined by quantitative RT-PCR (Table 2). This analysis clearly revealed that in MIA-treated primary human melanocytes, all five genes important for migratory processes were strongly upregulated.

Usually, in the epidermis of the human skin, melanocytes are located solitary on the basement membrane and detachment of the cells would result in induction of apoptosis due to anoikis. To analyse whether induction of migration of human primary melanocytes via MIA treatment was accomplished by suppression of anoikis/apoptosis, colony-forming assays were performed (Figure 6). Compared to untreated human melanocytes, attachment-independent growth and colony-forming was observed by MIA-treated human melanocytes implicating that induction of apoptosis was inhibited.

Table 2 Regulation of gene expression in primary human melanocytes after treatment with MIA

Gene	Melanocytes	Melanocytes plus MIA
Fibronectin	1	2.1
Integrin $\beta 3$	1	16.6
SPARC	1	9.8
t-PA	1	4.3
MT1-MMP	1	8.1

The data are presented as \times fold change compared to untreated melanocytes set as 1

Evaluation of cDNA array, Power Blot and/or antibody array data comparing the melanoma cell line HMB2 and MIA-deficient cell clones revealed no changes in expression of apoptosis-related genes like *bcl-2*, *bax* and *bcl-x* (data not shown), but showed a strong induction of Apaf-1 expression in the MIA-deficient cell clones (Figure 7). It is well known that, in contrast to other tumor types, in malignant melanoma loss of apoptosis protease activating factor 1 (Apaf-1) but not the presence of mutated p53 is crucial to avoid apoptosis (Soengas *et al.*, 2001). Further, it was described recently that E2F transcription factor 1 (E2F-1) is an upstream regulator of Apaf-1 (Furukawa *et al.*, 2002). Consistent with upregulated Apaf-1, 'Power Blot' analysis revealed that (E2F-1) expression was also upregulated in the MIA-deficient cell clone HMB2-5 (Figure 7).

Additionally, we analysed Apaf-1 expression in melanocytes treated with MIA for 24 h by quantitative real-time PCR. In MIA-treated human melanocytes, we detected a 2.4-fold downregulation of Apaf-1 expression (± 0.37) confirming MIA-induced inhibition of apoptotic mechanisms to promote enhanced migratory abilities.

Discussion

MIA is a protein known to play an important role in melanoma metastasis (Bossertoff and Buettner, 2002). As there is evidence that MIA is expressed in some nevi and in all small primary melanoma analysed, but not in

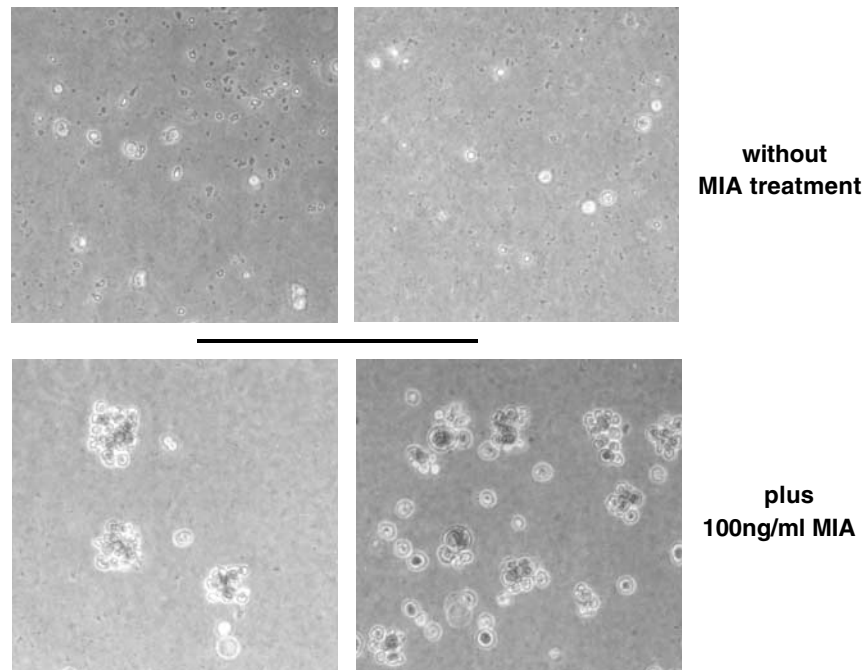


Figure 6 Influence of MIA treatment on colony formation of primary human melanocytes. Colony-forming assays were performed using primary human melanocytes (PHM). Treatment with MIA was performed by addition of 100 ng/ml MIA to the cells. Representative pictures (two for each condition) were taken after 14 days of cultivation (magnification 10-fold)

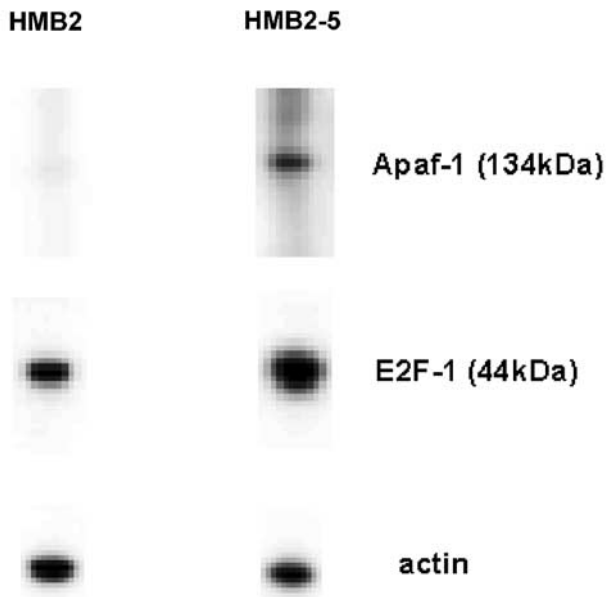


Figure 7 Expression of Apaf-1 and E2F-1 in HMB2 and HMB2-5. The results of the Power Blot analysis (Western Blot) for Apaf-1 and E2F-1 are shown. Actin served as a control for equal loading

normal human epidermal melanocytes (Bosserhoff and Buettner, 1999), we speculated a function of MIA in early melanoma development. To determine endogenous effects of MIA clearly, we generated melanoma cells completely and consistently lacking MIA expression by stable antisense MIA cDNA transfection. These cells were analysed for differences compared to the parental cell line on mRNA and protein level by cDNA arrays, antibody arrays and high throughput Western blot analysis (Power Blot). Interestingly, several genes known to be important and strongly overexpressed in malignant melanoma were shown to be downregulated in MIA-deficient cell clones: *t-PA*, *SPARC* (BM40, osteonectin), *MT1-MMP*, *integrin β 3* and *fibronectin*. A large body of evidence suggests a role for *t-PA* (Saksela *et al.*, 1984; Meissauer *et al.*, 1991; Alizadeh *et al.*, 1995; de Vries *et al.*, 1996), *SPARC* (Ledda *et al.*, 1997a, b; Massi *et al.*, 1999; Sturm *et al.*, 2002), *MT1-MMP* (Hofmann *et al.*, 2000a, b; Seftor *et al.*, 2001; Krenzel *et al.*, 2002; Sounni *et al.*, 2002; Iida *et al.*, 2004), *integrin β 3* (Nip *et al.*, 1992; Natali *et al.*, 1995; Van Belle *et al.*, 1999; Felding-Habermann *et al.*, 2002; Sturm *et al.*, 2002) and *fibronectin* (Wollina *et al.*, 1991; Natali *et al.*, 1995) in migration, invasion and metastatic spread of melanoma cells.

Since these proteins are directly or indirectly involved in matrix degradation (*t-PA*, *MT1-MMP*), in the transition of melanomas being in radial growth phase to a vertical growth phase (induction of *SPARC* by *integrin β 3*) and enforced cell proliferation (*fibronectin*), induction of gene expression by MIA could account for several abilities that melanoma cells harbor during tumor development and progression.

Additionally, further genes associated with melanoma development and progression were identified as differentially expressed as *MCAM*/ *MUC18*, *L1* protein and protein kinase C α (Hsu *et al.*, 2002).

Interestingly, in the presence of MIA, primary human melanocytes showed upregulation of all five analysed migration-relevant genes: *t-PA*, *fibronectin*, *MT1-MMP*, *integrin β 3* and *SPARC*.

Importantly, not only genes directly linked to migration of melanoma cells were displayed to be regulated by changes in MIA expression but also proteins of the cadherin family. It is known that the switch from E- to N-cadherin expression is an early and important step in melanoma development enabling the cells to escape the growth control mediated by keratinocytes (Li *et al.*, 2001).

Here, it was clearly shown that MIA-deficient melanoma cells re-express E-cadherin but lose N-cadherin expression. Further experiments need to address the question of whether the switch in cadherin expression is primarily or secondarily induced by the presence of MIA. For nevi, it was recently stated that loss of E-cadherin expression is controlled by the microenvironment (Krenzel *et al.*, 2004). It is possible that MIA may not be the leading impulse but the maintaining factor of N-cadherin expression in melanoma cells.

Another aspect of enhanced migratory abilities of melanoma cells and possibly of melanocytes in a temporary manner is protection from apoptosis due to reduced cell-cell- and cell-matrix contacts (anoikis). Consequently, we analysed genes such relevant for control of apoptosis. In several apoptosis-related genes such as *bcl-2*, *bax* or *bcl-x*, no significant changes in expression were determined. In accordance, Selzer *et al.* (1998) could show that these genes such are equally expressed comparing melanocytes and melanoma. Recently, several groups presented Apaf-1 as the main regulator of apoptosis in malignant melanoma (Soengas *et al.*, 2001; Bowen *et al.*, 2003; Paggi *et al.*, 2003). Furthermore, Apaf-1 was shown to be regulated by the transcription factor E2F-1 (Furukawa *et al.*, 2002). In our analysis, we found Apaf-1 and E2F-1 to be upregulated in the MIA-deficient melanoma cells HMB2-5. Further, enhanced colony-forming abilities of MIA-treated human melanocytes in soft agar accomplished by inhibition of apoptosis (due to upregulation of Apaf-1) implicates complex interactions of signaling pathways and alteration of gene expression.

Extended studies have to clarify whether melanocytes do express MIA during embryogenesis, nevi formation and/or wound healing. It is obvious that well-controlled expression and secretion of MIA by melanocytes coupled with inhibition of apoptosis could serve as a proliferation stimulus and would enable the cells to temporarily adhesion-independent growth.

In summary, we could clearly show that expression of MIA by malignant melanoma regulates expression of a variety of several melanoma-associated genes, being mainly associated to migration. Furthermore, our data implicate that MIA either directly or indirectly induces the switch from E- to N-cadherin expression. Since this event constitutes a crucial basis for malignant progres-

sion, the escape of growth control, MIA expression may be an early event in melanoma development. The role of MIA in inducing migration and migration-associated genes was also demonstrated in primary human melanocytes. These cells required migratory abilities and exhibited reduced expression of apoptotic genes after treatment with MIA. We speculate that under physiological conditions (wound healing or embryogenesis), melanocytes are able to induce a precisely restricted expression of MIA. The exact mechanisms regulating defined MIA expression in melanocytes as well as MIA's precise function in regulating gene expression in melanoma cells still remain to be revealed and are subject to further investigations.

Materials and methods

Cell lines and cell culture conditions

The melanoma cell lines HMB2 and B16 have been described in detail previously (Jacob *et al.*, 1998; Bosserhoff *et al.*, 2001). HMB2 was derived from a metastasis of malignant melanomas. For tissue culture, the cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with penicillin (400 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), L-glutamine (300 µg/ml) and 10% fetal calf serum (FCS; Sigma, Deisenhofen, Germany) and splitted 1:5 every 3 days. A panel of HMB2 cell clones varying with respect to MIA expression were established by stable transfection with MIA-antisense expression plasmids, controlled by a CMV-promoter and cotransfected with pCDNA3 (Invitrogen NV Leek, Holland), containing the selectable marker for neomycin resistance. Controls received pCDNA3 plus pCMVβ, a plasmid for expression of β-galactosidase (Invitrogen). Transfections were performed using the lipofectamin (Gibco, Eggenstein, Germany) method. At 1 day after transfection, cells were placed in selection medium containing 50 µg/ml G418 (Sigma Aldrich Deisenhofen, Germany). After 25 days of selection, individual G418-resistant colonies were subcloned. The amount of MIA expression in these clones was determined by measuring MIA in the 24h tissue culture supernatants using a quantitative MIA specific enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) (Roche, Mannheim, Germany).

Primary human melanocytes (PHM) derived from normal skin were cultivated in melanocyte medium, melanocyte growth medium no. 3 (MGM-3) (Gibco) under a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cells were used in passages 1–3 and not later than 3 days after trypsinization. Cells were detached for subcultivation or assay with 0.05% trypsin, 0.04% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in phosphate-buffered saline (PBS).

For measuring MIA expression, a commercially available MIA-ELISA (Roche) was used according to the manufacturer's instruction.

Measurement of the cell size was performed using a Carl Zeiss microscope and the K300 software (Carl Zeiss Vision GmbH, Germany). For each cell clone the area of 20 cells was determined and statistics were calculated.

cDNA expression array

Commercially available cDNA expression arrays (Atlas human cancer cDNA expression array, Clontech, Palo Alto, USA) were used to compare the gene expression of the two cell clones HMB2 and HMB2-5. Arrays were screened according

to the manufacturer's protocol. Total RNA (10 µg) from each cell clone was radiolabeled using MMLV reverse transcriptase and a specific primer set (10 × CDS Primer Mix) supplied by the manufacturer. Probes were purified on Chroma Spin-200 columns and the specific radioactivity was then measured. Hybridization was performed overnight at 68°C in a solution of ExpressHyb, sheared salmon testes DNA and labeled cDNA (final concentration 0.5–1 × 10⁶ c.p.m./ml). Blots were washed three times for 20 min in 2 × SSC, 1% SDS at 68°C, followed by two additional washes for 20 min in 0.1x SSC, 0.5% SDS at 68°C. The damp membrane was wrapped immediately and exposed both to an X-ray film and to a Phospho-imager screen, respectively. For interpretation of the results, two different software programs were used (Molecular Devices, Clontech).

Antibody microarray

To analyse proteins regulated by MIA, we used a fluorescence-based antibody microarray (Clontech) in which a solid-phase antibody captures fluorescently labeled antigen. The array was performed according to the manufacturer's instructions.

Briefly, total protein was extracted from the melanoma cell line HMB2 expressing strong levels of MIA and HMB2-5 cell clones with reduced MIA level by multiple freezing and thawing cycles and resuspended in labeling buffer. Each protein sample (500 µg) was labeled with Cy3 and Cy5, respectively, to produce four samples. After removing unbound dye, one microarray slide was incubated with 25 µg total protein of combined HMB2-Cy3 and HMB2-5-Cy5 and the other slide with HMB2-Cy5 and HMB2-5-Cy3 to normalize labeling efficiency. For example, if Cy5 reacts more efficiently with the protein targets than Cy3 does, the results will be biased in favor of the sample labeled with Cy5. With this sampling method these differences are eliminated. Therefore, after scanning both slides with a Chipreader (ScanArray 4000, Packard BioChip Technology, USA), the internally normalized ratio (INR) was calculated (square root of division of ratio1 by ratio2).

Prelabeled bovine serum albumin (BSA) spots with Cy3 and Cy5 served as orientation markers on the slide, while other unlabeled spots served as negative control.

'Power Blot' protein array

To analyse protein expression pattern comparing HMB2 to the MIA-deficient cell clones, HMB2-5, Power Blot analysis was performed by BD Clontech. Protein extracts of the cell lines were prepared following the manufacturer's instruction and analysed in triplicate using 600 antibodies via Western blot technology. Evaluation was performed semiquantitatively by densitometrically evaluation of each signal.

Quantitative RT-PCR

To quantify precisely the expression of cDNAs, the real-time PCR the LightCycler system (Roche) was used. For PCR, 1–3 µl cDNA preparation, 0.5–2.4 µl 25 mM MgCl₂, 0.5 µM of forward and reverse primer (Atlas RT-PCR Primer, Clontech) and 2 µl of SybrGreen LightCycler Mix in a total of 20 µl were applied. The following PCR program was performed: 60 s 95°C (initial denaturation); 20°C/s temperature transition rate up to 95°C for 15 s, 10 s 58–68°C, 22 s 72°C, 10 s 82°C including single acquisition mode, repeated for 40 times (amplification). MgCl₂ concentration and annealing temperature were optimized for each primer set. The PCR reaction was evaluated by melting curve analysis following the manufacturer's instructions and checking the PCR products on 1.8%

agarose gels. Each quantitative PCR was performed at least in duplicate for two sets of RNA preparations. RNA was isolated using a Mini RNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Western blotting

Cells (3×10^6) were lysed in 200 μ l RIPA-buffer (Roche) and incubated for 15 min at 4°C. Insoluble fragments were removed by centrifugation at 13000 r.p.m. for 10 min and the supernatant lysate was immediately shock frozen and stored at -80°C. Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA)-cell lysate was loaded and separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) gradient gels (Invitrogen) and subsequently blotted onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. After blocking for 1 h with 3% BSA/PBS, the membrane was incubated for 16 h at 4°C with the primary antibody (MT1-MMP (Chemicon, 1:2500), t-PA (Chemicon, 1:200), E-cadherin (Transduction Lab, 1:2500) and β -actin (Sigma, 1:2500)). Then the membrane was washed three times in PBS, incubated for 1 h with 1:3000 of an alkaline phosphate-coupled secondary antibody (Chemicon, Hofheim, Germany) and then washed again. Finally, immunoreactions were visualized by nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) (Sigma) staining.

Assays for cell function

Migration and invasion experiments (using the Boyden Chamber Model) as well as analysis of the ability of human primary melanocytes to grow in soft agar (with or without 100 ng/ml MIA-treatment) were carried out as described previously. Production of recombinant MIA (rMIA) was described elsewhere (Stoll *et al.*, 2001).

References

- Alizadeh H, Ma D, Berman M, Bellingham D, Comerford SA, Gething MJ, Sambrook JF and Niederkorn JY. (1995). *Curr. Eye Res.*, **14**, 449–458.
- Blesch A, Bosserhoff AK, Apfel R, Behl C, Hessdoerfer B, Schmitt A, Jachimczak P, Lottspeich F, Buettner R and Bogdahn U. (1994). *Cancer Res.*, **54**, 5695–5701.
- Bosserhoff AK and Buettner R. (2002). *Histol. Histopathol.*, **17**, 289–300.
- Bosserhoff AK, Echtenacher B, Hein R and Buettner R. (2001). *Melanoma Res.*, **11**, 417–421.
- Bosserhoff AK, Hein R, Bogdahn U and Buettner R. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 490–495.
- Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R, Stolz W and Buettner R. (1997). *Cancer Res.*, **57**, 3149–3153.
- Bosserhoff AK, Moser M, Hein R, Landthaler M and Buettner R. (1999). *J. Pathol.*, **187**, 446–454.
- Bosserhoff AK, Stoll R, Sleeman JP, Bataille F, Buettner R and Holak TA. (2003). *Lab. Invest.*, **83**, 1583–1594.
- Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, Alexander A, Diedrich MJ and Grossman D. (2003). *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 48–55.
- de Vries TJ, van Muijen GN and Ruiter DJ. (1996). *Melanoma Res.*, **6**, 79–88.
- Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B and Hensler M. (2002). *Clin. Exp. Metast.*, **19**, 427–436.
- Furukawa Y, Nishimura N, Furukawa Y, Satoh M, Endo H, Iwase S, Yamada H, Matsuda M, Kano Y and Nakamura M. (2002). *J. Biol. Chem.*, **277**, 39760–39768.
- Guba M, Bosserhoff AK, Steinbauer M, Abels C, Anthuber M, Buettner R and Jauch KW. (2000). *Br. J. Cancer*, **83**, 1216–1222.
- Hofmann UB, Westphal JR, Van Kraats AA, Ruiter DJ and van Muijen GN. (2000a). *Int. J. Cancer*, **87**, 12–19.
- Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruiter DJ and van Muijen GN. (2000b). *J. Pathol.*, **191**, 245–256.
- Hsu MY, Meier F and Herlyn M. (2002). *Differentiation*, **70**, 522–536.
- Iida J, Wilhelmson KL, Prie MA, Wilson CM, Pei D, Furcht LT and McCarthy JB. (2004). *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 167–176.
- Jacob K, Wach F, Holzapfel U, Hein R, Lengyel E, Buettner R and Bosserhoff AK. (1998). *Melanoma Res.*, **8**, 211–219.
- Krengel S, Alexander M, Brinckmann J and Tronnier M. (2002). *J. Cutan. Pathol.*, **29**, 390–396.
- Krengel S, Groteluschen F, Bartsch S and Tronnier M. (2004). *J. Cutan. Pathol.*, **31**, 1–7.
- Ledda F, Bravo AI, Adris S, Bover L, Mordoh J and Podhajcer OL. (1997a). *J. Invest. Dermatol.*, **108**, 210–214.
- Ledda MF, Adris S, Bravo AI, Kairiyama C, Bover L, Chernajovsky Y, Mordoh J and Podhajcer OL. (1997b). *Nat. Med.*, **3**, 171–176.
- Li G, Satyamoorthy K and Herlyn M. (2001). *Cancer Res.*, **61**, 3819–3825.
- Lougheed JC, Holton JM, Alber T, Bazan JF and Handel TM. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5515–5520.
- Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM and Santucci M. (1999). *Hum. Pathol.*, **30**, 339–344.

- Meissauer A, Kramer MD, Hofmann M, Erkell LJ, Jacob E, Schirrmacher V and Brunner G. (1991). *Exp. Cell Res.*, **192**, 453–459.
- Natali PG, Nicotra MR, Di Filippo F and Bigotti A. (1995). *Br. J. Cancer*, **71**, 1243–1247.
- Nip J, Shibata H, Loskutoff DJ, Cheresch DA and Brodt P. (1992). *J. Clin. Invest.*, **90**, 1406–1413.
- Paggi MG, Catricala C, Amantea A, Picardo M, Natali PG, Baldi F and Baldi A. (2003). *Pigment Cell Res.*, **16**, 589.
- Saksela O, Vaheri A, Schleuning WD, Mignatti P and Barlati S. (1984). *Int. J. Cancer*, **33**, 609–616.
- Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V and Hendrix MJ. (2001). *Cancer Res.*, **61**, 6322–6327.
- Selzer E, Schlagbauer-Wadl H, Okamoto I, Pehamberger H, Potter R and Jansen B. (1998). *Melanoma. Res.*, **8**, 197–203.
- Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C and Lowe SW. (2001). *Nature*, **409**, 207–211.
- Sounni NE, Baramova EN, Munaut C, Maquoi E, Franckne F, Foidart JM and Noel A. (2002). *Int. J. Cancer*, **98**, 23–28.
- Stahlecker J, Gauger A, Bosserhoff A, Buttner R, Ring J and Hein R. (2000). *Anticancer Res.*, **20**, 5041–5044.
- Stoll R, Renner C, Ambrosius D, Golob M, Voelter W, Buettner R, Bosserhoff AK and Holak TA. (2000). *J. Biomol. NMR*, **17**, 87–88.
- Stoll R, Renner C, Buettner R, Voelter W, Bosserhoff AK and Holak TA. (2003). *Protein Sci.*, **12**, 510–519.
- Stoll R, Renner C, Zweckstetter M, Bruggert M, Ambrosius D, Palme S, Engh RA, Golob M, Breibach I, Buettner R, Voelter W, Holak TA and Bosserhoff AK. (2001). *EMBO J.*, **20**, 340–349.
- Sturm RA, Satyamoorthy K, Meier F, Gardiner BB, Smit DJ, Vaidya B and Herlyn M. (2002). *Cancer Res.*, **62**, 226–232.
- Van Belle PA, Elenitsas R, Satyamoorthy K, Wolfe JT, Guerry D, Schuchter L, Van Belle TJ, Albelda S, Tahin P, Herlyn M and Elder D. (1999). *Hum. Pathol.*, **30**, 562–567.
- van Groningen JJ, Bloemers HP and Swart GW. (1995). *Cancer Res.*, **55**, 6237–6243.
- Wollina U, Kilian U, Henkel U, Schaarschmidt H and Knopf B. (1991). *Anticancer Res.*, **11**, 1405–1414.

Anhang III

2005 zur Veröffentlichung im Journal of Biological Chemistry (JBC) eingereicht

Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma

Silke Kuphal and Anja K. Bosserhoff

From the Institute of Pathology, University of Regensburg, D-93053 Regensburg; GERMANY

Running title: E-cadherin negatively regulates N-cadherin expression

Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma

Silke Kuphal and Anja K. Bosserhoff

From the Institute of Pathology, University of Regensburg, D-93053 Regensburg; GERMANY

Running title: E-cadherin negatively regulates N-cadherin expression

Address correspondence to: Anja Bosserhoff, University of Regensburg, Institute of Pathology, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, GERMANY, Tel: +49-941-944-6705, Fax: +49-941-944-6602, Email: anja.bosserhoff@klinik.uni-regensburg.de

E-cadherin is known to be an important molecule in epithelial-mesenchymal transition (EMT). Malignant transformation of melanocytes frequently attend with loss of E-cadherin expression and induction of expression of mesenchymal molecules like N-cadherin. The switch of the cadherin class is an interesting phenomenon of melanoma cells and in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in general. Therefore, we analyzed the capacity of E-cadherin to regulate expression of N-cadherin in melanocytic cells.

Our experiments revealed that melanoma cells downregulate endogenous N-cadherin expression after transient transfection of full length E-cadherin but also of the cytoplasmic domain of E-cadherin. Therefore, we concluded that the extracellular domain of E-cadherin and cell-cell contacts are not necessary for negative regulation of N-cadherin. Melanoma cells re-expressing full length or cytoplasmic E-cadherin have reduced NFkappaB activity in comparison to mock transfected cells. Downregulation of NFkappaB activity, either directly or by re-expression of E-cadherin led to a suppression of N-cadherin promoter activity and expression. Consequently, an NFkappaB binding site in the N-cadherin promoter was characterized. In summary, our results suggest that N-cadherin is directly regulated by the E-cadherin. Loss of E-cadherin induces NFkappaB activity and N-cadherin expression in tumorigenic EMT.

Introduction

E-cadherin is an important adhesion molecule that is down regulated in embryonic cells which undergo epithelial mesenchymal transition (EMT). During this process epithelial cell layers lose polarity and cell-cell contacts

and undergo dramatic remodeling of the cytoskeleton, which is important for the correct development of the embryo (1). The formerly epithelial cells acquire the expression of mesenchymal components after passing through EMT, and get a migratory phenotype. As a consequence of the mesenchymal phenotype the adhesion molecule N-cadherin is expressed. Such a dramatic change in cadherin expression is not just a phenomenon in embryonic development, as EMT is an important event in the progression of many carcinomas. The cadherin switch is also found in malignant melanoma development (2-9). Normal melanocytes and the surrounding keratinocytes express E-cadherin for stable tissue assembly (10;11). After the switch to N-cadherin expression the cells acquire a migratory phenotype.

The homophilic cadherin contact of the melanocytes is mediated through the extracellular domain of cadherins. This N-terminal domain consists of five 110 amino acid repeats and is stabilized through calcium (12). Additionally, several studies were focused upon the conserved cytoplasmic domain of cadherins which interact with intracellular proteins, termed catenins (13-16). The catenins connect the cytoplasmic tail of cadherin to the actin cytoskeleton of the cells (17-19).

Analyzing the assembly of cadherin molecules, different publications investigated the function of defined cadherin domains, mainly by separating the cadherin molecule into its intracellular- and extracellular domain function. In general, it is important to differentiate between the basic tasks of cadherins as cell-cell adhesion molecules or anchor to the cytoskeleton and the important involvement of cadherins in signaling cascades.

Several investigations are focusing on cell-cell adhesion activity of cadherins. Cadherins with

an extracellular deletion prevent cadherin self association whereas cadherins with an intracellular deletion prevent association with the cytoskeleton. (20-23).

The biological activity maintained through cadherins can be indirect, e.g. via signaling through small GTPases Rho, Rac, and Cdc42, which in turn link E-cadherin to a number of downstream signaling pathways (24;25). Cadherin function is regulated through receptor tyrosine kinases (RTKs) which phosphorylate β -catenin (26). In particular, E-cadherin has been proposed to account for tumor suppressor activity; however the exact molecular mechanism has not been clearly established (27-31).

The idea that adhesion alone may not be sufficient to suppress invasion is supported by the observations that enhanced adhesion does not always lead to reduced invasion (17;32). These findings suggest that the inhibition of invasion by E-cadherin may also occur through effects other than adhesion.

For malignant melanoma the loss of E-cadherin and gain of N-cadherin expression appears to be one of the critical steps in development and progression of melanoma. Restoration of E-cadherin-mediated interaction represents a legitimate strategy to reverse melanocytic malignancy (33;34). As a consequence our group is not only interested in cadherins as adhesion molecule but also in investigating new signaling pathways with cadherins as signal molecule at the plasma membrane accomplishing juxtacrine signaling events (35-39). To understand possible mechanisms involved in E-cadherin mediated changes we performed experiments with full length E-cadherin and two additional E-cadherin derivatives. The influence of E-cadherin and E-cadherin derivatives on constitutive, endogenous N-cadherin expression in melanoma was of special interest as the switch of the cadherin classes in melanoma development and the ability of E-cadherin to reverse the migratory phenotype of melanoma cells are not fully investigated until today.

As a mediator for E-cadherin signaling NFkappaB was analyzed. NFkappaB is a heterodimeric transcription factor that is predominantly composed of 65kDa and 50kDa subunits of the Rel family. In resting cells, NFkappaB is mainly retained in the cytoplasm by the IkappaB family of proteins which mask the nuclear translocation signal of the transcription factor. Upon stimulation of cells

two defined serine residues in the NH2 terminus of IkappaB proteins are phosphorylated triggering their ubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome. Hereby, the NFkappaB proteins are released for translocation to the nucleus and induction of kappaB-dependent genes. NFkappaB modulates multiple basic cellular functions like cell growth, differentiation, inflammatory response and immune response. More recently, NFkappaB activation has been connected with multiple aspects of oncogenesis, including the control of apoptosis, the cell cycle, differentiation, and cell migration (40). New publications reveal the fact that NFkappaB is also required for the induction and maintenance of EMT in cancer models (41;42).

Recently, we could show that loss of E-cadherin in melanoma cells leads to induction of NFkappaB activity and that re-expression of E-cadherin results in downregulation of NFkappaB activity in melanoma cells (43). New findings presented here show that NFkappaB activity also regulates further EMT processes in malignant melanoma development. Hence, we are interested in EMT signaling events affected through NFkappaB.

Experimental Procedures

Cell lines and cell culture conditions

The melanoma cell line Mel Im has been described in detail previously (44). It was derived from a metastasis of malignant melanomas. Further, melanoma cell lines Mel Ju, Mel Wei, Mel Juso, Mel Ho, Mel Ei, HTZ-19d and SK-Mel 28 were used (44). For tissue culture the cells were maintained in DMEM supplemented with penicillin (400 U/ml), streptomycin (50 μ g/ml), L-glutamine (300 μ g/ml) and 10% fetal calf serum (FCS; Sigma, Deisenhofen, Germany) and splitted 1:5 every three days.

Human primary melanocytes derived from normal skin were cultivated in melanocyte medium MGM-3 (Gibco, Eggenstein, Germany) under a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cells were used between passages 6 to 10 and not later than 3 days after trypsinization. Cells were detached for subcultivation or assay with 0.05% trypsin, 0.04% EDTA in PBS.

For further experiments the cells were treated with 2,5 μ g/ μ l of the proteasome inhibitor MG-132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal, Sigma) for 4 and 8h.

Molecular constructs

The cadherin constructs E-cadherin CD (cytoplasmic domain) and E-cadherin M (membrane anchored domain) were a generous gift from Margaret J. Wheelock and Keith R. Johnson (Department of Biology, University of Toledo, USA).

DNAs encoding for the complete cytoplasmic domain of E-cadherin were generated using PCR and were ligated into the pLK-pac expression vector (45). To target the cadherin intracellular domain to the plasma membrane, E-cadherin M (figure 3) were constructed by ligating the cytoplasmic domain of E-cadherin to the myristylation signal from the vector M (Aronheim *et al.*, 1994). The myristylation signal (MGSSKSKPKDPSQR) derived from src was added to the cadherin intracellular domain. During translation of src the N-terminal methionine is removed leaving glycine at the N terminus. Glycine is then modified by covalent attachment of myristic acid through an amide bond (46). Myristylation is not sufficient for src to be directed to the plasma membrane; the basic nature of the amino acid sequence is also important for proper targeting and for stable interaction with the membrane (47;48).

Transfection experiments and luciferase measurements

For transient transfections 2×10^5 cells were seeded into each well of a 6-well plate and transfected with 0.5 μ g plasmid DNA using the lipofectamine plus method (Gibco) according to the manufacturer's instructions. The cells were lysed 24 hours after transfection and the luciferase activity in the lysate was quantified by a luminometric assay (Promega Corp., Madison, USA). Transfection efficiency was normalized according to renilla luciferase activity by cotransfecting 0.1 μ g of the plasmid pRL-TK (Promega). All transfections were repeated at least four times. For transient transfection the plasmids NFkappaB-luc (Promega), pBAT-E-cadherin (generous gift from Gabriele Handschuh, Munich, Germany) and p50/p65 (generous gift from J. A. Schmid, Vienna, Austria) were used. Additionally, the N-cadherin chicken promoter-luc construct first cloned by Li *et al.* (49) and subcloned from Panda *et al.* (50) was a generous gift from David Goltzman, (Montreal, Canada).

Further, a panel of Mel Im cell clones were established by stable transfection of pCMX E-cadherin CD and pCMX E-cadherin M under the control of a CMV promoter and cotransfected with the neo-selectable pcDNA3 plasmid

(Invitrogen, Groningen, Holland). Mock transfected cells are the Mel Im cells with the empty vector. Transfection was performed using lipofectamine plus (Gibco). Transfected cells were cultured under selective conditions using G418 (Sigma) in a concentration of 50 μ g/ml. After 25 days of selection, individual G418-resistant colonies were subcloned. E-cadherin expression levels of these clones were determined by western blot analysis of the cell lysates.

Adenoviral vectors and infection of melanoma cells

The recombinant replication-deficient adenovirus Ad5IkappaB was constructed by the method described in (51) (52). Briefly, the insert of the plasmid pRc/CMV-IkappaBalph S32A/S36A which expresses a super-repressor of NFkappaB was subcloned into the Xba1 site of the pACCMV.PLPASR (+) plasmid to construct the plasmid pACCMV/ IkappaB, in which IkappaB is driven by the cytomegalovirus-promoter/ enhancer Ad5lacZ, which contains the the *E. coli* beta-galactosidase (beta-Gal) gene driven by the CMV-promoter/enhancer, was used as a control virus throughout the study. Mel Im and Mel Ei cells were infected with Ad5IkappaB or Ad5lacZ in serum-free medium at a multiplicity of infection (moi) of 100. After 2 ½ h the serum-free medium was changed to medium with FCS. The experiment was stopped at 24 and 48h.

Western blotting

3×10^6 cells were lysed in 200 μ l RIPA-buffer (Roche, Mannheim, Germany) and incubated for 15 minutes at 4°C. Insoluble fragments were removed by centrifugation at 13000 rpm for 10 minutes and the supernatant lysate was immediately shock frozen and stored at -80 °C. 10-20 μ g of RIPA-cell lysate was loaded per lane and separated on 10% SDS-PAGE gels and subsequently blotted onto a PVDF membrane. After blocking for 1 hour with 3% BSA / PBS the membrane was incubated for 16 hours with one of the following antibodies: anti E-cadherin and anti-N-cadherin (BD Transduction Laboratories), anti beta actin (Sigma). After three washing steps with PBS, the membrane was incubated for 1 hour with an alkaline phosphate-coupled secondary anti-mouse or anti rabbit IgG antibody (AP303A, Chemicon, Hofheim, Germany) and then washed again. Finally, immunoreactions were visualized by NBT / BCIP (Sigma) staining.

Electrophoretic mobility shift assays

A double stranded oligomeric binding site for NFkappaB, specific for the human N-cadherin promoter (5`GCT CTT GGG GAG CGC CAT CCG CTC3`) was phospholabeled. Additionally, two double stranded oligomeric binding sites for NFkappaB, specific for the chicken N-cadherin promoter (5`GGA GAG GGG CGG GCA CGA TCC GGG C 3`) and (5`GCG TGC AGC AGG GCT GGG GCC GGG GC 3`) were phospholabeled and used for gel mobility-shift assays.

A double stranded oligomeric binding site for the classical NFkappaB (5`AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C 3`, PROMEGA) was used for competition experiments.

Nuclear extracts were prepared from primary melanocytes and Mel Im cells and gel shifts were performed as described previously (53).

Quantitative real time PCR for N-cadherin and E-cadherin

Quantitative real time PCR was performed on a Lightcycler (Roche, Mannheim, Germany). 2 µl cDNA template, 2 µl 25mM MgCl₂, 0.5 µl (20 mM) of forward and reverse primers and 2µl of SybrGreen LightCycler Mix in a total of 20 µl were applied to the following PCR programs: N-cadherin CD/E-cadherin CD: 30 sec 95°C (initial denaturation); 20°C/sec temperature transition rate up to 95°C for 15 sec, 3 sec 60°C, 5 sec 72°C, 85°C acquisition mode single, repeated for 40 times (amplification). The PCR reaction was evaluated by melting curve analysis and checking the PCR products on 1.8% agarose gels. β-actin was the control gene for the quality of the mRNA/cDNA which was used in the quantitative real time PCR. And β-actin primer were used for standardization of the concentration of the cDNA.

Subcellular Proteome Extraction kit

Protein isolation for membrane, cytoplasm and nuclear fraction was performed using the extraction kit from Calbiochem as described by the manufacturer (Calbiochem, EMD Biosciences, Darmstadt, Germany).

Results

In most, if not all, types of cancer of epithelial origin, E-cadherin mediated cell-cell adhesion is lost concomitant with progression towards malignancy. By the loss of E-cadherin in melanoma development, cells escape the control

of neighboring keratinocytes. In melanoma cells which have lost E-cadherin expression, de novo synthesis of N-cadherin has been observed (34;54).

Re-establishing the functional E-cadherin complex, e.g. by re-expression of full length E-cadherin, results in a reversion from an invasive, mesenchymal, to a benign, epithelial phenotype of cultured tumor cells (55;56).

Influence of full length E-cadherin on endogenous N-cadherin expression

The current study was designed to elucidate the influence of E-cadherin on the expression of N-cadherin and to analyze the molecular basis of this effect.

Quantitative real time PCR of nine melanoma cell lines revealed that melanoma cells express N-cadherin strongly in a constitutive manner. The N-cadherin expression level was analyzed in comparison to normal human epidermal melanocytes (NHEM, which were set as 1) showing nearly no N-cadherin expression (**figure 1A**).

In transiently full-length E-cadherin transfected melanoma cells, N-cadherin expression was found to be down regulated. This was revealed by quantitative real time PCR and by western blot analysis of mock transfected cells in comparison to full length E-cadherin transfected Mel Im cells (**figure 1B and 1C**). Additionally, analysis of N-cadherin promoter activity revealed a clear downregulation of N-cadherin transcription (**figure 1D**). This first experiment led to the hypothesis that E-cadherin can regulate the endogenous expression level of N-cadherin in melanoma cells.

Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on N-cadherin expression

Two types of E-cadherin derivatives have been used for the following experiments. Both have a deleted extracellular domain thus avert cadherin-cadherin self-association. One construct used was the cytoplasmic domain of E-cadherin which results in a soluble fragment within the cytoplasm (**figure 2**). In the second construct the intracellular domain of E-cadherin was membrane anchored by the myristylation signal (MGSSKSKPKDPSQR) derived from src added to the cadherin intracellular domain.

We established stably transfected cell clones for each cytoplasmic E-cadherin derivative in the melanoma cell line Mel Im. The stably transfected cell clones were controlled for E-cadherin expression by quantitative real time

PCR with specific primer against the intracellular domain of E-cadherin and in case of the membrane anchored E-cadherin additionally with specific primer against the myristylation signal (**figure 3A, 3B and 3C**). Translation of the 20.2kDa membrane bound E-cadherin cytoplasmic domain and the 18.8kDa soluble cytoplasmic E-cadherin was shown in western blots (**figure 3D**). Three stably transfected Mel Im cell clones for each cytoplasmic E-cadherin construct were chosen: E-cadherin CDc, E-cadherin CDd, E-cadherin CDe were the cell clones established for expression of the soluble cytoplasmic domain of E-cadherin and E-cadherin M2, E-cadherin M3, E-cadherin M7 were the cell clones created for expression of the membrane anchored cytoplasmic of E-cadherin. The soluble cytoplasmic cadherin was only detectable in the cytoplasmic fraction of the cellular extract whereas the membrane anchored cytoplasmic E-cadherin was detectable in the membrane and the cytoplasmic fraction (**figure 3D**).

In subsequent experiments the endogenous level of N-cadherin in the stable transfected cell clones was determined. The E-cadherin derivative transfected cells M and CD showed a decrease in expression of endogenous N-cadherin on mRNA and protein level (**figure 4A-C**) as revealed before for the full length E-cadherin transfected cells. Only the stable cell clone E-cadherin CDc had little deviation in the quantitative real time PCR but the western blot clearly showed the downregulation of endogenous N-cadherin. The N-cadherin promoter activity was measured by reporter gene assays after transfection of the cytoplasmic membrane anchored and cytoplasmic soluble domain of E-cadherin. The N-cadherin promoter activity was down regulated after transfection of the derivatives (**figure 4D**).

NFkappaB as mediator for the cadherin switch in melanoma development

The search for a mediator of cadherin switch in melanoma cells resulted in the analysis of NFkappaB.

In a recent study, we could show that nuclear extracts from malignant melanoma cells displayed strong NFkappaB activity compared to melanocytes. Accordingly, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) data showed that NFkappaB DNA-binding activity were higher in malignant melanoma cell lines than in melanocytes. Furthermore, after re-expression of E-cadherin in melanoma cells NFkappaB

activity was down regulated (43). These findings result in the new hypothesis that NFkappaB could be the master regulator of N-cadherin in dependence on E-cadherin expression in the cells.

We, therefore, compared the N-cadherin promoter sequences of chicken and human and searched for putative NFkappaB binding motifs. Search of transcription-factor-binding to the N-cadherin promoter sequence was performed using the search engine Genomatix / MatInspector (www.genomatix.de). The NFkappaB binding sequences of the chicken and the human N-cadherin promoter are displayed in **figure 5A**, both are about 460 nucleotides upstream of the translation start of N-cadherin. EMSA experiments were performed to prove NFkappaB binding. The nuclear extract of Mel Im cells displayed strong NFkappaB binding activity to the putative N-cadherin promoter of chicken (**figure 5B**). The DNA binding was competed after incubation of the samples with two different concentrations of the classical NFkappaB consensus sequence (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C 3')

(**figure 5B**). Additionally, we detect NFkappaB binding activity to the human N-cadherin promoter in EMSA experiments (data not shown). After transfection of full length E-cadherin and of the cytoplasmic domains CD and M the relative NFkappaB activity was measured in reporter gene assays (**figure 6A, B**). All led to down regulation of NFkappaB activity. Comparison to data shown in figures 1D and 4D revealed that E-cadherin re-expression not only led to downregulation of NFkappaB promoter activity but also to downregulation of N-cadherin promoter activity.

To verify the regulatory function of NFkappaB on N-cadherin, the effect of NFkappaB overexpression on N-cadherin promoter activity was analyzed. We, therefore, transfected the NFkappaB subunits p50 and p65 and the N-cadherin promoter construct transiently into two melanoma cell lines (Mel Im and Mel Ei) and, to prove cell type independence, into the colon carcinoma cell lines SW480 and CaCo. In all four cell lines upregulation of N-cadherin promoter activity in comparison to mock transfected cells was clearly seen (**figure 6C**).

To further analyze the interplay between NFkappaB signaling and N-cadherin as a target, we made adenoviral transduction experiments with Mel Im and Mel Ei melanoma cell lines. The transduction of the IkappaB super-repressor (Ad5IkappaB) provides a non-degradable

IkappaB which leads to a cytoplasmic arrest of p65 and to an interrupted NFkappaB signaling cascade (52). A beta-galactosidase expressing adenoviral-vector (Ad5LacZ) was used as a control. As a control for successful viral infection and inhibition of NFkappaB activity, expression of the endogenous NFkappaB-dependent gene interleukin 8 (IL-8) was measured by quantitative real time PCR. The expression of IL-8 was reduced in the melanoma cells transduced with stable IkappaB (data not shown). Further, expression of the NFkappaB-independent gene MMP-1 was not influenced through the expression of the super-repressor IkappaB (data not shown). After expression of stable IKappaB and inhibition of NFkappaB signaling the N-cadherin expression was quantified and ascertained that N-cadherin expression was down regulated in comparison to beta-galactosidase expressing cells after 24h and 48h (**figure 7A**).

Additionally, NFkappaB activity was inhibited by the treatment of Mel Im cells with the proteasome inhibitor MG-132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal), which reduces the degradation of ubiquitin-conjugated proteins in mammalian cells, blocked the degradation of IkappaB and the nuclear translocation of p65 NFkappaB. After the blockade of NFkappaB signaling for 4h and 8h the N-cadherin expression was down regulated (**figure 7B**).

We, therefore, concluded that E-cadherin regulates NFkappaB activity and proximate N-cadherin expression was regulated by NFkappaB.

Vice versa, the stimulation of NFkappaB activity with LPS and TNFalpha in NHEM led to upregulation of N-cadherin expression measured by quantitative real time PCR. NHEM treated with TNF showed a six time upregulation of N-cadherin expression (**figure 7C**). Quantification of the expression level of the endogenous NFkappaB-dependent gene interleukin 8 (IL-8) in a control experiment showed the upregulation of the expression level through NFkappaB (**figure 7D**).

Discussion

Here, we were interested to find factors regulating the endogenous N-cadherin expression in melanoma cells during epithelial mesenchymal transition and development and progression of the disease. We have shown in this study that full length E-cadherin but also the cytoplasmic domain of E-cadherin can regulate

expression of endogenous N-cadherin in melanoma cells and that NFkappaB is the mediator for this E-cadherin signaling.

Previous studies have demonstrated the functional importance of cadherin molecules in normal skin homeostasis and in melanoma development (34;57;58). It has been observed that the function of E-cadherin during tumor progression is frequently replaced or even overruled by the expression of mesenchymal cadherins, such as N-cadherin (reviewed by (59)). Re-establishing the functional cadherin complex, e.g. by forced expression of full-length E-cadherin, results in a reversion from an invasive, mesenchymal, to a benign, epithelial phenotype of cultured tumor cells (55;56). However, the impulse of the cadherin switch in malignant melanoma remains to be elucidated.

Our data demonstrate for the first time that the re-expression of the cytoplasmic domain of E-cadherin led to a downregulation of endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma cells. Additionally, this regulatory effect of cytoplasmic E-cadherin was not just a competition between the endogenous N-cadherin of the plasma membrane and transfected E-cadherin but rather a downregulation of N-cadherin transcription, displayed through down regulated N-cadherin promoter activity (**figure 4D**). Particularly, the cytoplasmic domain of E-cadherin was able to accomplish signaling effects like the full-length E-cadherin. Additionally, our data implicated that it is not important that the cytoplasmic domain is attached to the cell membrane or is soluble in the cytoplasm. The stable cell clones with membrane anchored cytoplasmic E-cadherin (Mel Im E-cadherin M) achieve the same signaling effect as the soluble E-cadherin domain (Mel Im E-cadherin CD). This is in contrast to a publication on human epidermoid carcinoma cells (A431) which demonstrated that expression of intracellular cadherin domains lead to decreased cell-cell interactions only when these are membrane-associated (45).

The loss of E-cadherin in malignant melanoma is in particular regulated by the zinc-finger transcriptional repressor Snail which has been described to directly repress transcription of the E-cadherin gene by binding to the E-boxes on the E-cadherin promoter (9;60;61). The functionally block of E-cadherin in melanocytes through saturation of extracellular E-cadherin through an E-cadherin blocking antibody did not lead to a re-expression of N-cadherin in these cells. Additionally, stably transfected antisense

N-cadherin cell clones showed no re-expression of E-cadherin, suggesting that the sole loss of one cadherin subtype does not lead necessarily to expression of another new cadherin subtype. Previously, other reports demonstrated that Twist, a master regulator of embryonic morphogenesis, is capable of inducing an EMT and is associated with a migratory behavior in normal epithelial cells. Additionally, Twist plays an essential role in cancer metastasis. MDCK cells expressing Twist have N-cadherin up regulated and E-cadherin, the marker for epithelial morphology, down regulated (62). Our experiments led initially to the impression that E-cadherin could influence Twist expression as normal human epidermal melanocytes (NHEM) and full-length E-cadherin re-expressing melanoma cells showed down regulated Twist expression in comparison to different melanoma cell lines which have high Twist expression. This correlates with constitutively up regulated N-cadherin expression detected in melanoma cells. However, the stably cytoplasmic E-cadherin expressing cell clones showed no down regulated Twist expression, although they showed regulation of N-cadherin. In agreement with our results, the publication of Yang *et al.* indicated that E-cadherin does not influence Twist expression (63).

NFkappaB was discussed in several publications as transcription factor responsible for epithelial plasticity and EMT (41;42;64). Inhibition of NFkappaB signaling prevented EMT in Ras-transformed epithelial breast cancer cells, while activation of this pathway promoted the transition to a mesenchymal phenotype. We found that the molecule E-cadherin, a marker for the epithelial phenotype of cells, downregulates NFkappaB after re-expression in melanoma cells (43). We therefore questioned if NFkappaB inactivation can influence endogenous N-cadherin expression level in melanoma cells and if NFkappaB can participate in EMT of melanoma cells, especially in the switch of the cadherin class during melanoma development. After comparison of presumptive N-cadherin promoter sequences of chicken and human and finding of the putative NFkappaB binding sites, EMSA data revealed NFkappaB binding to the promoter sequence of the N-cadherin gene (figure 5). Here, we demonstrate for the first time to our knowledge that N-cadherin exhibits a direct NFkappaB binding site in its promoter

and its expression is directly regulated through NFkappaB. Further experiments revealed that NFkappaB was the mediator of E-cadherin regulating N-cadherin expression in melanoma cells.

Infection of the melanoma cells with the super-repressor IkappaB (Ad5IkappaB), which blocked the NFkappaB translocation into the nucleus resulted in reduced expression of N-cadherin (figure 7A). Additionally, the proteasome inhibitor MG-132, which leads to stabilization of IkappaB, led to the downregulation of N-cadherin expression after NFkappaB translocation into the nucleus was blocked (figure 7B). Vice versa, the stimulation of NFkappaB activity in normal melanocytes through treatment of the cells with LPS and TNFalpha led to the upregulation of N-cadherin expression in these cells (figure 7C).

We, therefore, conclude that E-cadherin negatively controls the activity of NFkappaB and as consequence N-cadherin expression in melanocytic cells. So, inhibition of NFkappaB in normal human melanocytes prevented the upregulation of the mesenchymal marker N-cadherin. Loss of expression of E-cadherin in malignant melanoma cells results in upregulated NFkappaB activity leading to upregulation of the EMT marker N-cadherin. Normally, melanoma cells have a high NFkappaB activity and a high endogenous N-cadherin expression rate.

There is a suggestive evidence that experimental re-establishment of E-cadherin expression, specially the expression of the cytoplasmic domain of E-cadherin, could be therapeutically beneficial, as overexpression of E-cadherin reduces growth, invasion, and survival of melanoma cells (65).

Acknowledgements

We are indebted to Sibylla Lodermeier for technical assistance, Gabriele Handschuh for providing the pBAT-E-cadherin-expression vector, David Goltzman for the chicken N-cadherin-luc vector and Margaret J. Wheelock and Keith R. Johnson for the derivative E-cadherin expression vectors. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to A.K. Bosserhoff.

References

1. Thiery, J. P. (2002) *Nat.Rev.Cancer* **2**, 442-454
2. Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Nollet, F., de Leeuw, W. J., van, d., V, Cornelisse, C., and van Roy, F. (1995) *EMBO J.* **14**, 6107-6115
3. Berx, G., Staes, K., van Hengel, J., Molemans, F., Bussemakers, M. J., van Bokhoven, A., and van Roy, F. (1995) *Genomics* **26**, 281-289
4. Tamura, G., Sakata, K., Nishizuka, S., Maesawa, C., Suzuki, Y., Iwaya, T., Terashima, M., Saito, K., and Satodate, R. (1996) *Jpn.J.Cancer Res.* **87**, 1153-1159
5. Tamura, S., Shiozaki, H., Miyata, M., Kadowaki, T., Inoue, M., Matsui, S., Iwazawa, T., Takayama, T., Takeichi, M., and Monden, M. (1996) *Br.J.Surg.* **83**, 1608-1614
6. Silye, R., Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Poole, S., van Noorden, S., Batchelor, W., Regele, H., Segal, W., Boesmueller, H., Krausz, T., and Pignatelli, M. (1998) *J.Pathol.* **186**, 350-355
7. Sanders, D. S., Blessing, K., Hassan, G. A., Bruton, R., Marsden, J. R., and Jankowski, J. (1999) *Mol.Pathol.* **52**, 151-157
8. Melki, J. R., Vincent, P. C., Brown, R. D., and Clark, S. J. (2000) *Blood* **95**, 3208-3213
9. Poser, I., Dominguez, D., de Herreros, A. G., Varnai, A., Buettner, R., and Bosserhoff, A. K. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 24661-24666
10. Furukawa, F., Fujii, K., Horiguchi, Y., Matsuyoshi, N., Fujita, M., Toda, K., Imamura, S., Wakita, H., Shirahama, S., and Takigawa, M. (1997) *Microsc.Res.Tech.* **38**, 343-352
11. Hsu, M. Y., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., and Herlyn, M. (1996) *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* **1**, 188-194
12. Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J. M. (1996) *Nature* **380**, 360-364
13. Ozawa, M. and Kemler, R. (1998) *J.Biol.Chem.* **273**, 6166-6170
14. Ozawa, M. and Kemler, R. (1992) *J.Cell Biol.* **116**, 989-996
15. Ozawa, M., Ringwald, M., and Kemler, R. (1990) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 4246-4250
16. Stappert, J. and Kemler, R. (1994) *Cell Adhes.Commun.* **2**, 319-327
17. Sommers, C. L., Gelmann, E. P., Kemler, R., Cowin, P., and Byers, S. W. (1994) *Cancer Res.* **54**, 3544-3552
18. Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J. (1995) *J.Cell Biol.* **130**, 67-77
19. Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D., and Morrow, J. S. (1995) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 8813-8817
20. Jaffe, S. H., Friedlander, D. R., Matsuzaki, F., Crossin, K. L., Cunningham, B. A., and Edelman, G. M. (1990) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 3589-3593
21. Roh, J. Y. and Stanley, J. R. (1995) *J.Cell Biol.* **128**, 939-947

22. Vestal, D. J. and Ranscht, B. (1992) *J.Cell Biol.* **119**, 451-461
23. Kreft, B., Berndorff, D., Bottinger, A., Finnemann, S., Wedlich, D., Hortsch, M., Tauber, R., and Gessner, R. (1997) *J.Cell Biol.* **136**, 1109-1121
24. Fukata, M., Nakagawa, M., Kuroda, S., and Kaibuchi, K. (1999) *J.Cell Sci.* **112**, 4491-4500
25. Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M., and Nakagawa, M. (1999) *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 591-596
26. Soler, C., Rousselle, P., and Damour, O. (1998) *Cell Adhes.Commun.* **5**, 13-25
27. Rasbridge, S. A., Gillett, C. E., Sampson, S. A., Walsh, F. S., and Millis, R. R. (1993) *J.Pathol.* **169**, 245-250
28. Schipper, J. H., Frixen, U. H., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K., and Birchmeier, W. (1991) *Cancer Res.* **51**, 6328-6337
29. Behrens, J., Weidner, K. M., Frixen, U. H., Schipper, J. H., Sachs, M., Arakaki, N., Daikuhara, Y., and Birchmeier, W. (1991) *EXS* **59**, 109-126
30. Shiozaki, H., Tahara, H., Oka, H., Miyata, M., Kobayashi, K., Tamura, S., Iihara, K., Doki, Y., Hirano, S., Takeichi, M., and . (1991) *Am.J.Pathol.* **139**, 17-23
31. Sommers, C. L., Thompson, E. W., Torri, J. A., Kemler, R., Gelmann, E. P., and Byers, S. W. (1991) *Cell Growth Differ.* **2**, 365-372
32. Navarro, P., Lozano, E., and Cano, A. (1993) *J.Cell Sci.* **105**, 923-934
33. Herlyn, M., Berking, C., Li, G., and Satyamoorthy, K. (2000) *Melanoma Res.* **10**, 303-312
34. Li, G. and Herlyn, M. (2000) *Mol.Med.Today* **6**, 163-169
35. Hsu, M., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J. L., and Herlyn, M. (2000) *J.Cell Sci.* **113**, 1535-1542
36. Buckley, C. D. and Simmons, D. L. (1997) *Mol.Med.Today* **3**, 449-456
37. Zhu, A. J. and Watt, F. M. (1996) *J.Cell Sci.* **109**, 3013-3023
38. Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., and Aaronson, S. A. (2000) *J.Cell Biol.* **148**, 779-790
39. Fagotto, F. and Gumbiner, B. M. (1996) *Dev.Biol.* **180**, 445-454
40. Baldwin, A. S. (2001) *J.Clin.Invest* **107**, 241-246
41. Huber, M. A., Beug, H., and Wirth, T. (2004) *Cell Cycle* **3**,
42. Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004) *J.Clin.Invest* **114**, 569-581
43. Kuphal, S., Poser, I., Jobin, C., Hellerbrand, C., and Bosserhoff, A. K. (2004) *Oncogene* **23**, 8509-8519
44. Jacob, K., Wach, F., Holzapfel, U., Hein, R., Lengyel, E., Buettner, R., and Bosserhoff, A. K. (1998) *Melanoma Res.* **8**, 211-219

45. Nieman, M. T., Kim, J. B., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J. (1999) *J.Cell Sci.* **112**, 1621-1632
46. Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P., and Glaser, L. (1988) *Annu.Rev.Biochem.* **57:69-99**, 69-99
47. Gordon, J. I., Duronio, R. J., Rudnick, D. A., Adams, S. P., and Gokel, G. W. (1991) *J.Biol.Chem.* **266**, 8647-8650
48. Resh, M. D. (1994) *Cell* **76**, 411-413
49. Li, B., Paradies, N. E., and Brackenbury, R. W. (1997) *Gene* **191**, 7-13
50. Panda, D. K., Miao, D., Lefebvre, V., Hendy, G. N., and Goltzman, D. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 41229-41236
51. Imuro, Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behrns, K. E., Schoonhoven, R., Grisham, J. W., and Brenner, D. A. (1998) *J.Clin.Invest* **101**, 802-811
52. Hellerbrand, C., Jobin, C., Imuro, Y., Licato, L., Sartor, R. B., and Brenner, D. A. (1998) *Hepatology* **27**, 1285-1295
53. Bosserhoff, A. K., Hein, R., Bogdahn, U., and Buettner, R. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 490-495
54. Tomita, K., van Bokhoven, A., van Leenders, G. J., Ruijter, E. T., Jansen, C. F., Bussemakers, M. J., and Schalken, J. A. (2000) *Cancer Res.* **60**, 3650-3654
55. Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M., Fiers, W., and van Roy, F. (1991) *Cell* **66**, 107-119
56. Birchmeier, W. and Behrens, J. (1994) *Biochim.Biophys.Acta* **1198**, 11-26
57. Hsu, M. Y., Meier, F. E., Nesbit, M., Hsu, J. Y., Van Belle, P., Elder, D. E., and Herlyn, M. (2000) *Am.J.Pathol.* **156**, 1515-1525
58. Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001) *Cancer Res.* **61**, 3819-3825
59. Cavallaro, U., Schaffhauser, B., and Christofori, G. (2002) *Cancer Lett.* **176**, 123-128
60. Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia, D. H. (2000) *Nat.Cell Biol.* **2**, 84-89
61. Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsvan, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001) *Mol.Cell* **7**, 1267-1278
62. Kang, Y. and Massague, J. (2004) *Cell* **118**, 277-279
63. Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R. A. (2004) *Cell* **117**, 927-939
64. Bates, R. C., DeLeo, M. J., III, and Mercurio, A. M. (2004) *Exp.Cell Res.* **299**, 315-324
65. Haass, N. K., Smalley, K. S., and Herlyn, M. (2004) *J.Mol.Histol.* **35**, 309-318

Figure legends

Figure 1: Quantitative real time PCR, western blot analysis and promoter analysis to measure expression levels of N-cadherin in nine melanoma cell lines and in transiently E-cadherin transfected Mel Im cells.

A Quantitative real time PCR was performed to measure relative expression levels of N-cadherin in nine different melanoma cell lines. The melanoma cell lines are presented in comparison to normal human epidermal melanocytes (NHEM) showing no N-cadherin expression. NHEM set as 1.

B Quantitative real time PCR was performed to analyze the relative expression level of N-cadherin after transfection of Mel Im cells with full length E-cadherin. Mock transfected cells were set as 1. The E-cadherin transfected Mel Im cells show reduced N-cadherin expression.

C Western blot analysis was used to detect N-cadherin level in the melanoma cell line Mel Im (mock) compared to Mel Im cells which were transiently transfected with full-length E-cadherin (0.5 μ g E-cadherin). The E-cadherin re-expressing cells show reduced N-cadherin protein level. Beta-actin was used to control for loading of equal protein amounts.

D Reporter gene assays using a N-cadherin-luc promoter construct were performed to detect the N-cadherin promoter activity in Mel Im cells (mock) in comparison to full length E-cadherin transfected Mel Im cells (0.5 μ g E-cadherin). N-cadherin promoter activity of mock transfected cells was set as 1. After transfection of E-cadherin the N-cadherin promoter activity is down regulated.

Figure 2: Schematic overview of the E-cadherin derivative constructs used.

A The domain structure of full length E-cadherin is shown.

B Schematic overview showing the E-cadherin cytoplasmic domain construct (CD).

C Schematic overview showing the membrane anchored cytoplasmic domain of E-cadherin (located at the plasma membrane through the lipid tag).

TM, transmembrane domain; C, cytoplasmic domain; N, extracellular domain; black box, catenin binding site.

Figure 3: Quantitative real time PCR and western blot analysis to prove expression of the cytoplasmic domain of E-cadherin in the generated cell clones.

A Quantitative real time PCR using primers against the cytoplasmic domain of E-cadherin was performed to verify efficient expression of the stably transfected membrane anchored cytoplasmic E-cadherin construct.

B Additionally, quantitative real time PCR with primers against the myristylation signal of the transmembrane construct was conducted. The membrane-anchored domain could be detected in the cell clones E-cadherin M2, M3 and M7 in comparison to mock (empty vector) transfected cells.

C Quantitative real time PCR using primers against the soluble cytoplasmic domain of E-cadherin was performed to check for efficient expression of the stably transfected soluble cytoplasmic E-cadherin construct. The soluble cytoplasmic domain could be detected in the cell clones named E-cadherin CDc, CDd and CDe.

D Extracts of the membrane fraction and the cytoplasmic fraction of stably transfected cells were used in western blots to test if the E-cadherin derivatives are targeted to their respective location. The soluble cytoplasmic domain of E-cadherin (CDc,CDd,CDe) is located in the cytoplasm and the membrane anchored cytoplasmic domain of E-cadherin (M2,M3,M7) is located at the plasma membrane and in the cytoplasm. Beta actin staining was used for quality control of the extraction method and equal loading of the samples.

Figure 4: Quantitative real time PCR and western blot analysis were performed to measure the expression level of N-cadherin in Mel Im cells expressing the cytoplasmic domain of E-cadherin. Additionally, reporter gene analysis using the N-cadherin promoter were conducted to detect its activity after transient transfection of the cytoplasmic domain of E-cadherin in Mel Im cells.

- A** The results shown were generated by quantitative real time PCR for N-cadherin expression of stably transfected Mel Im cells. The cell clones E-cadherin M2, M3 and M7 show down regulated N-cadherin expression in comparison to mock (empty vector) transfected cells.
- B** The results shown were generated by quantitative real time PCR for N-cadherin expression of stably transfected Mel Im cells. The cell clones E-cadherin CDc, CDd and CDe show down regulated N-cadherin expression in comparison to mock (empty vector) transfected cells.
- C** Western blot analysis showing the reduced N-cadherin level in Mel Im cells stably transfected with the soluble (CD) and membrane anchored (M) cytoplasmic domain of E-cadherin. Mock cells are transfected with an empty vector.
- D** Reporter gene analysis was performed analyzing a N-cadherin-luc promoter construct in the Mel Im cells transiently transfected with the soluble and membrane-anchored domain of E-cadherin. The N-cadherin promoter activity was down regulated in comparison to cells transfected with the empty vector (mock).

Figure 5: Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) of the binding capacity of nuclear NFkappaB to the N-cadherin promoter sequence.

A Schematic overview of the classical NFkappaB binding motif (top) and the binding sites of NFkappaB in the chicken (middle) and human (bottom) N-cadherin promoter sequence. (R is an A or G purine; Y is a C or T pyrimidine; H is A, C, or T; N is any nucleotide).

B The EMSA analysis showed the binding capacity of nuclear extracts of Mel Im cells to the NFkappaB binding motifs (NFkappaB site I, NFkappaB site II) found in the chicken N-cadherin promoter sequence. Additionally, the shifts were competed with two different concentrations of unlabelled classical NFkappaB consensus sequence to prove NFkappaB binding.

Figure 6: Reporter gene analysis to quantify the NFkappaB and N-cadherin promoter activity.

A, B Reporter gene analysis was performed to quantify the NFkappaB activity after transfection of full-length E-cadherin (**A**) and the soluble (CD) and membrane (M) anchored cytoplasmic domain of E-cadherin (**B**) using an NFkappaB-luc construct. The NFkappaB activity was downregulated after re-expression of E-cadherin in Mel Im cells. Mel Im cells transfected with the vector pCDNA3 (mock) were set as 1.

C Reporter gene analysis to quantify the N-cadherin promoter activity after transfection of the NFkappaB subunits p50 and p65 of the Rel family into the melanoma cell lines Mel Im and Mel Ei and into the colon carcinoma cell lines SW480 and CaCo. The mock transfection with pCDNA3 was set as 1.

Figure 7: Quantitative real time PCR for the relative expression level of N-cadherin after inhibition of NFkappaB signaling.

A Cells were transduced with the control adenoviral vector (Ad5LacZ) containing the *E. coli* beta-galactosidase cDNA and the adenoviral vector Ad5IkappaB, which leads to the expression of a super-repressor IkappaB. The expression of the stable IkappaB leads to blockade of NFkappaB signaling. Transduced were the melanoma cell lines Mel Im and Mel Ei for 24h and 48h. The expression level of N-cadherin in these cells was quantified by real time PCR and the Ad5LacZ transduced cells were set as 1. The expression level of N-cadherin was down regulated after blocking NFkappaB.

B Treatment of Mel Im cells with the proteasome inhibitor MG-132 which reduces the degradation of ubiquitin-conjugated proteins (like IkappaB) led to inhibition of NFkappaB activation. After this treatment for 4h and 8h relative N-cadherin expression was determined by quantitative real time PCR. Untreated cells were set as 1.

C, D Normal human epidermal melanocytes were treated with LPS and TNFalpha to stimulate the NFkappaB activity in these cells. The stimulated NFkappaB activity led to the upregulation of N-cadherin expression (**C**) and IL-8 expression (**D**) in comparison to untreated melanocytes.

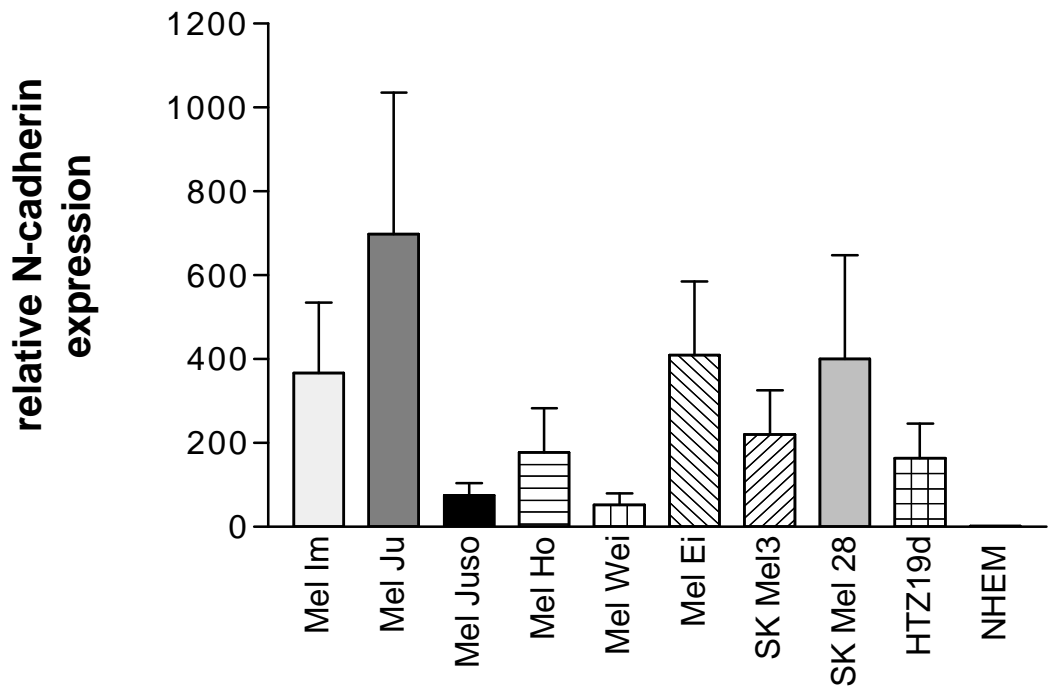


figure 1A

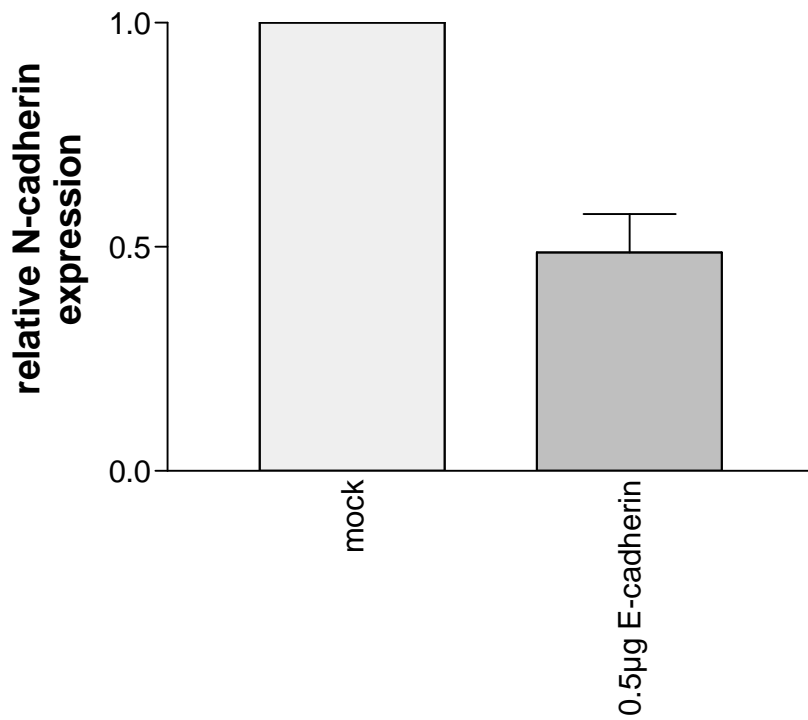


figure 1B

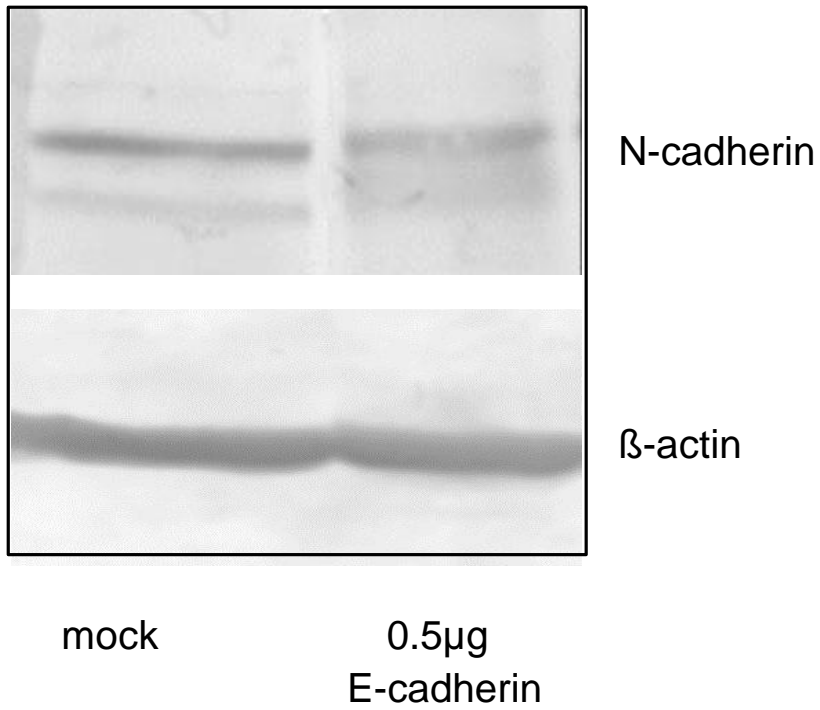


figure 1C

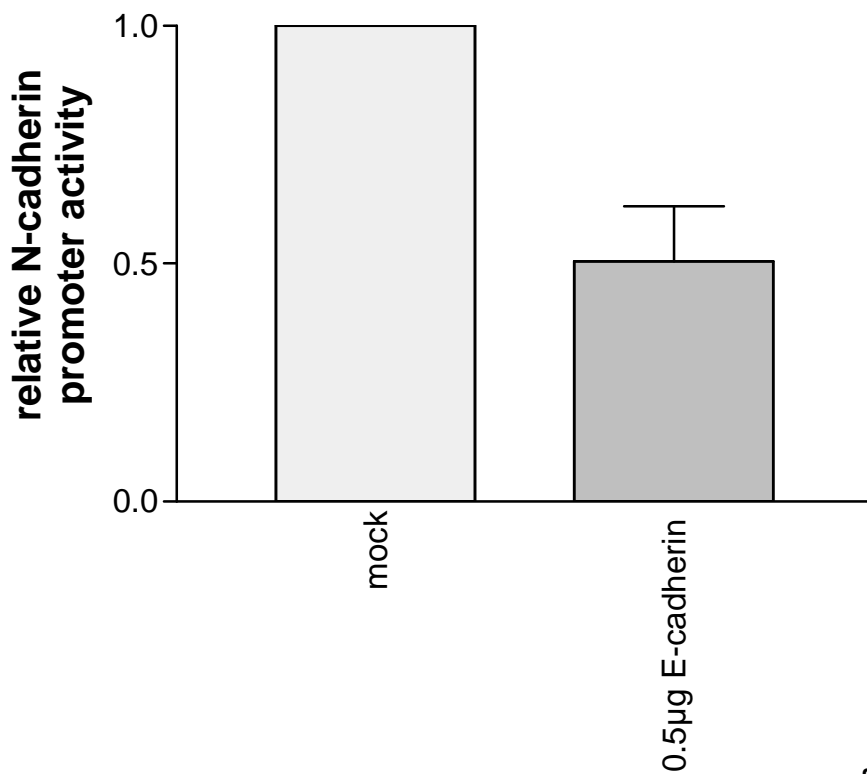


figure 1D

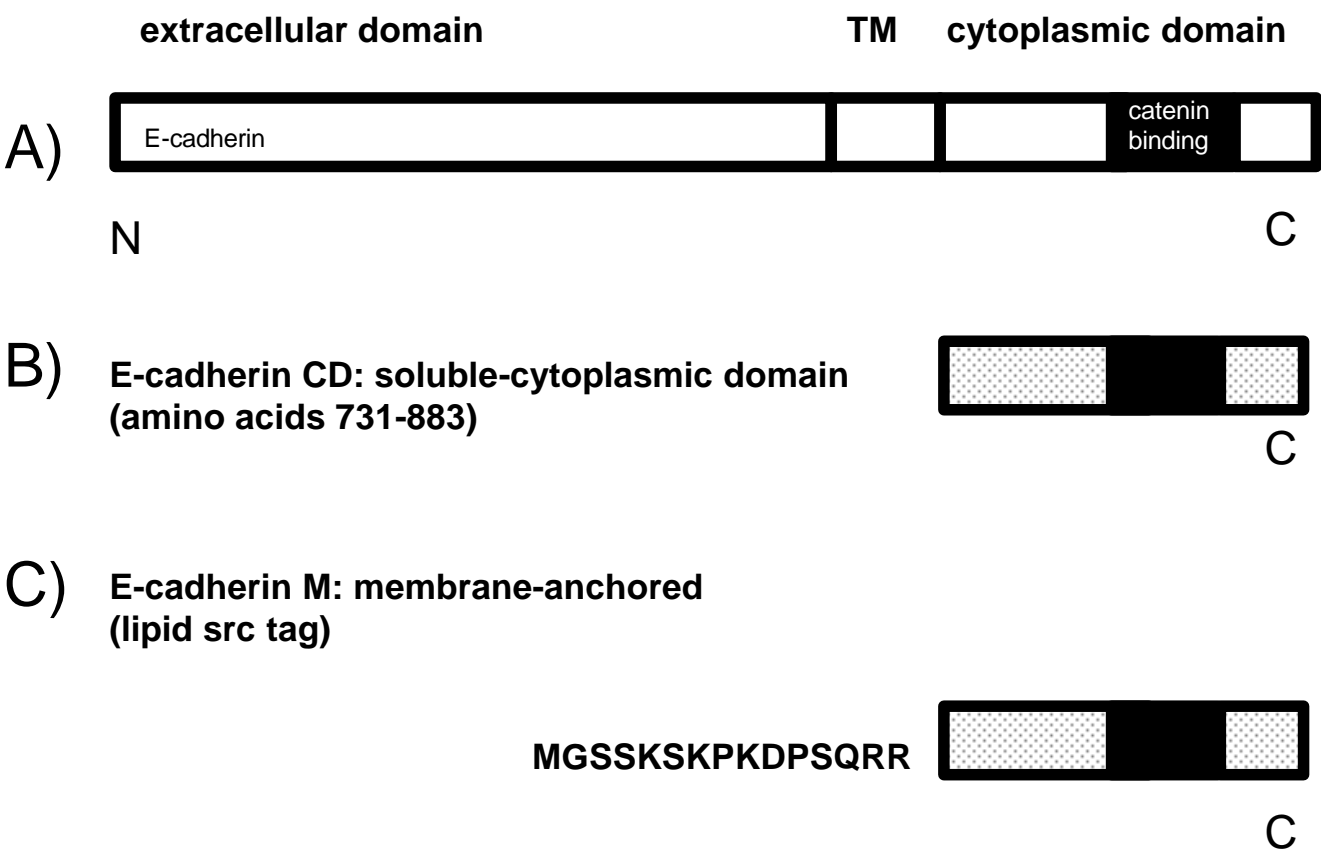


figure 2

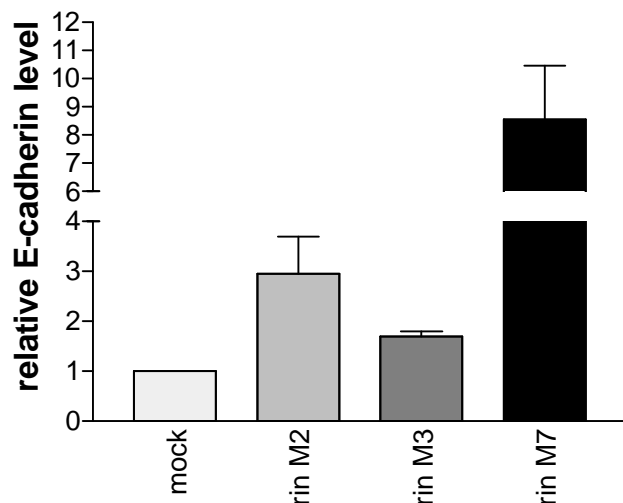


figure 3A

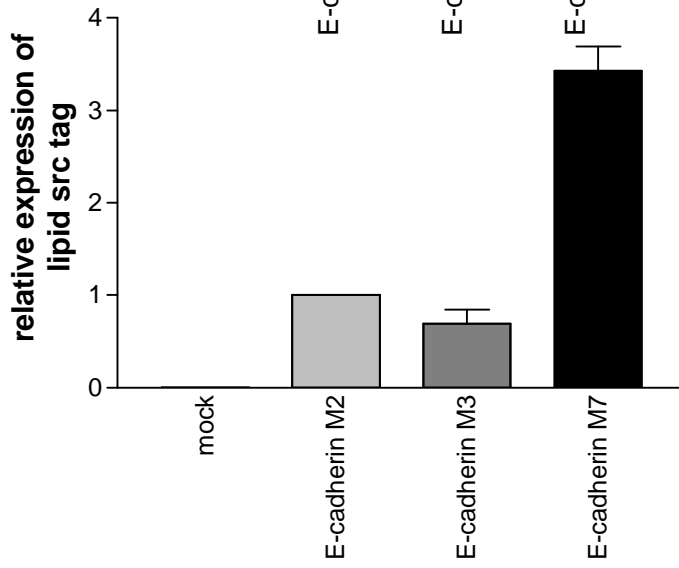


figure 3B

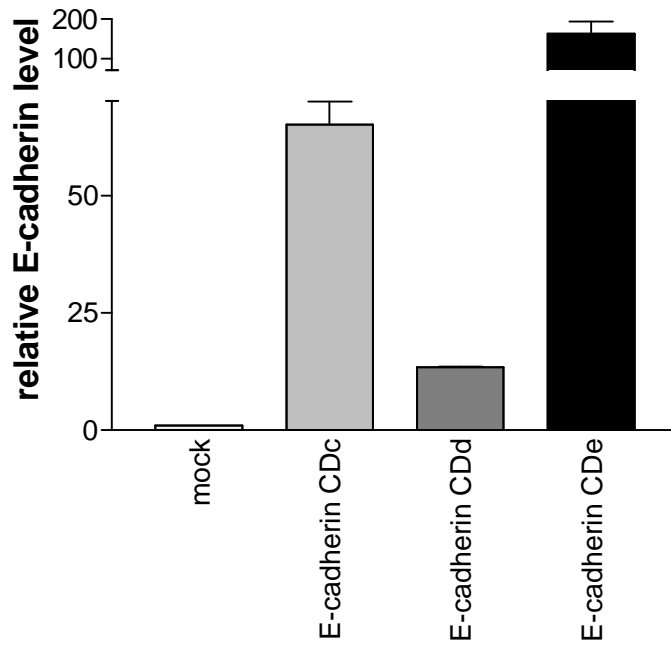


figure 3C

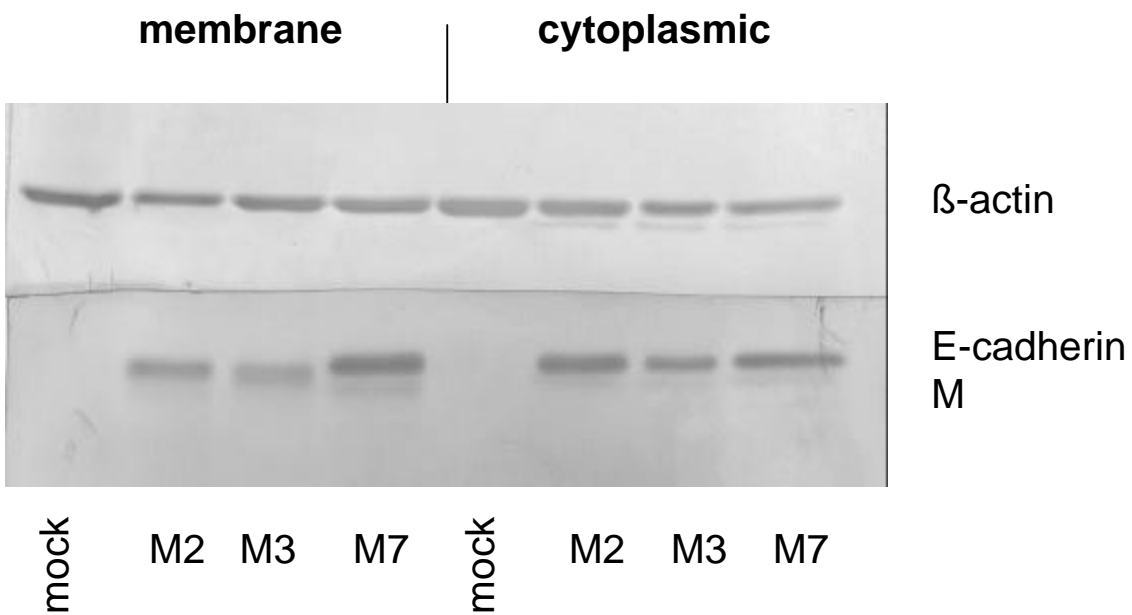
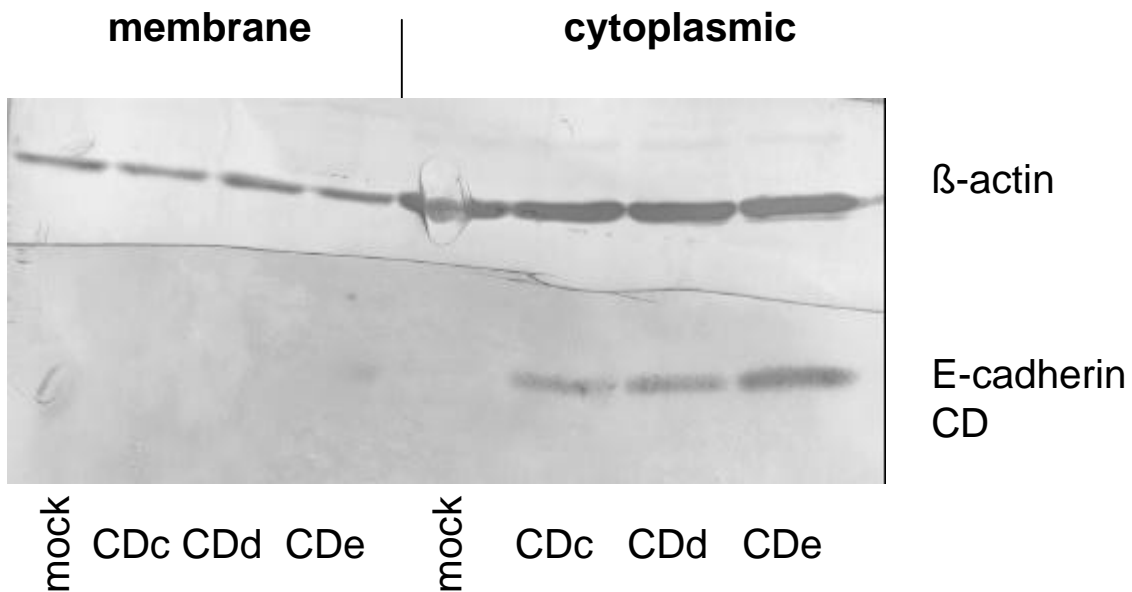


figure 3D

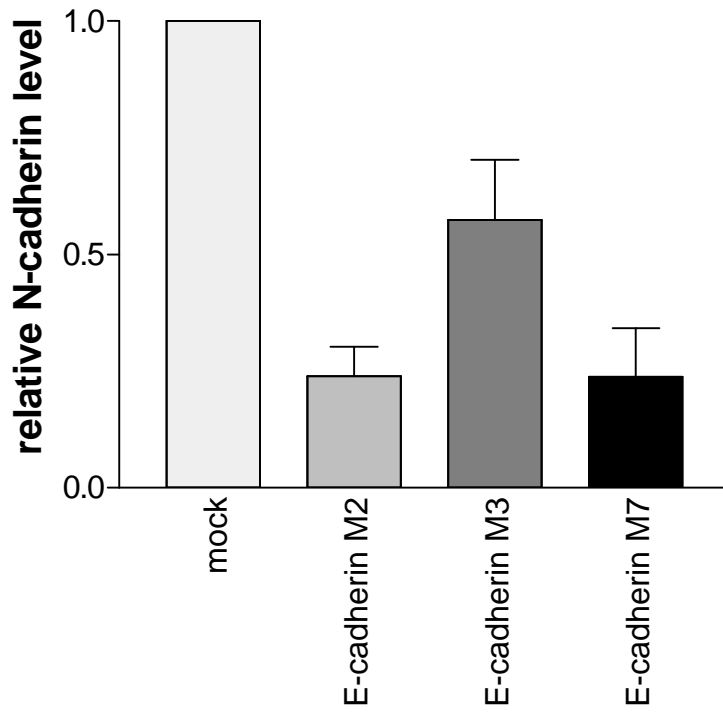


figure 4A

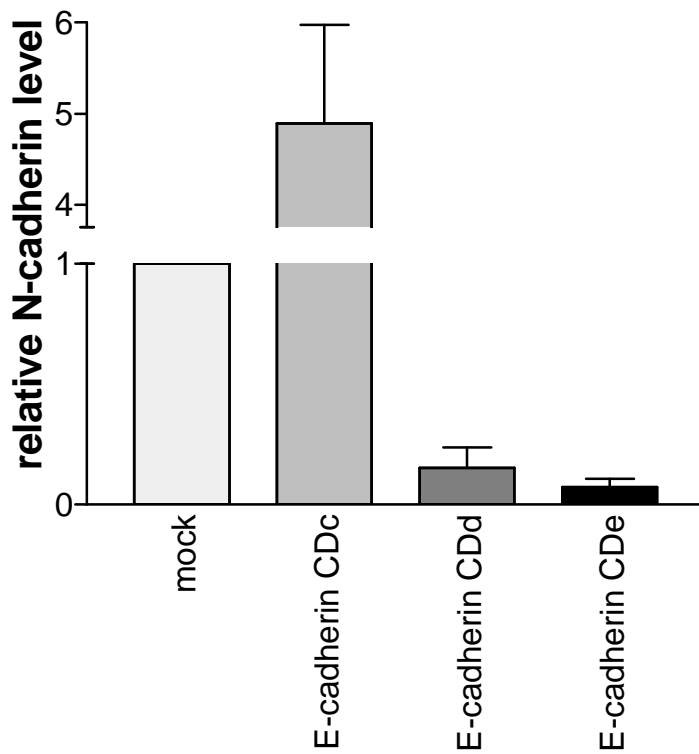


figure 4B

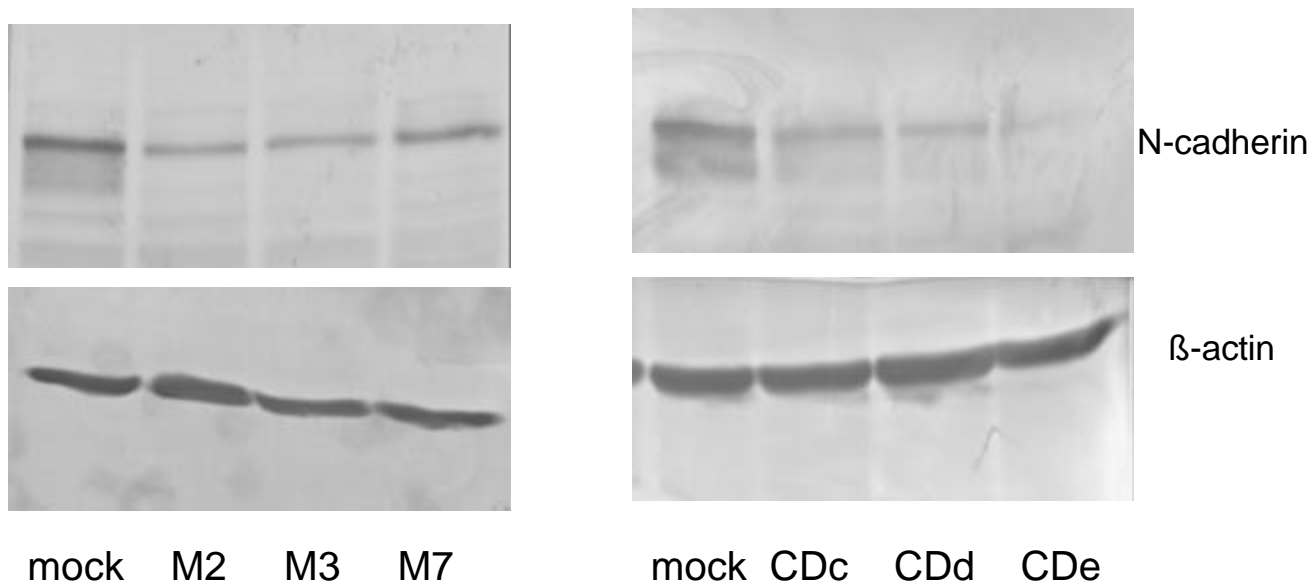


figure 4C

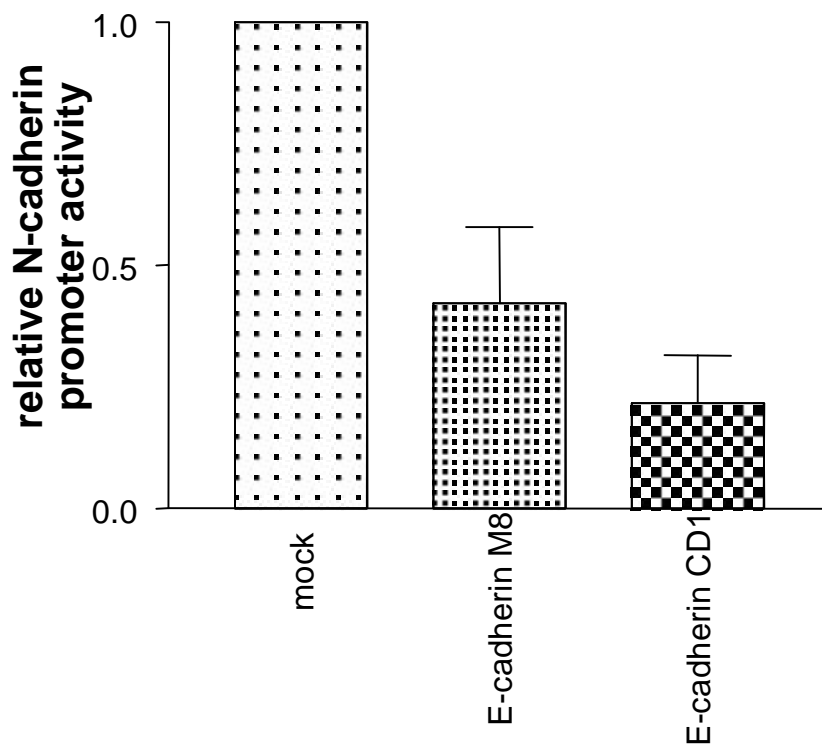


figure 4D

classical NFkappa-B-binding motif:

5` GGG R NN YY CC 3`
5` **H** GGA R N YY CC 3`

NFkappa-B-binding motif
chicken N-cadherin promoter (I):

5` GGAGAGGGGC**GGGCACGAT** CCGGGC 3`

NFkappa-B-binding motif
chicken N-cadherin promoter (II):

5` GCGTGCAGC**AGGGCTGGGGC**CGGGGC 3`

NFkappa-B-binding motif
human N-cadherin promoter:

5` GCTCTT**GGGAGCGCC**ATCCGCTC 3`

figure 5A

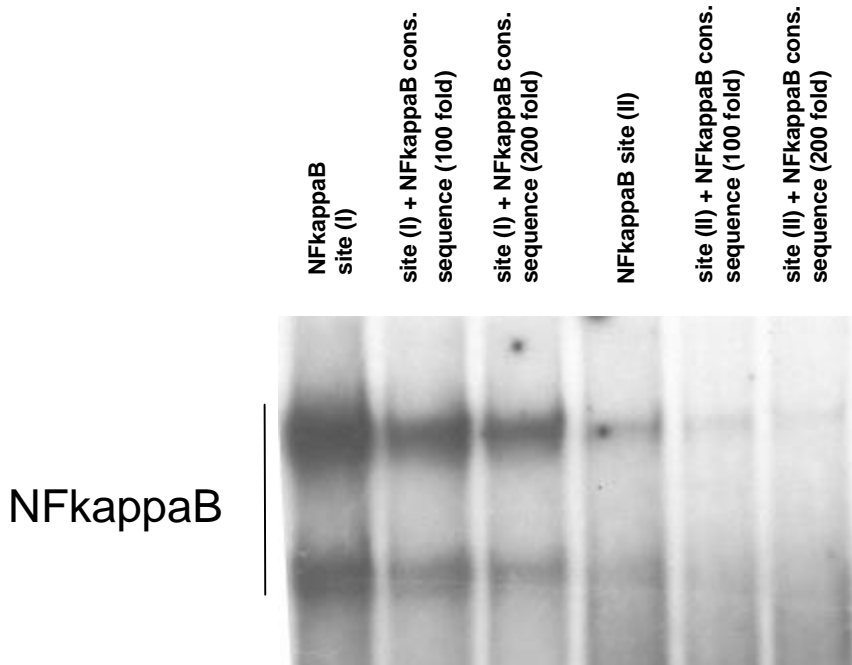


figure 5B

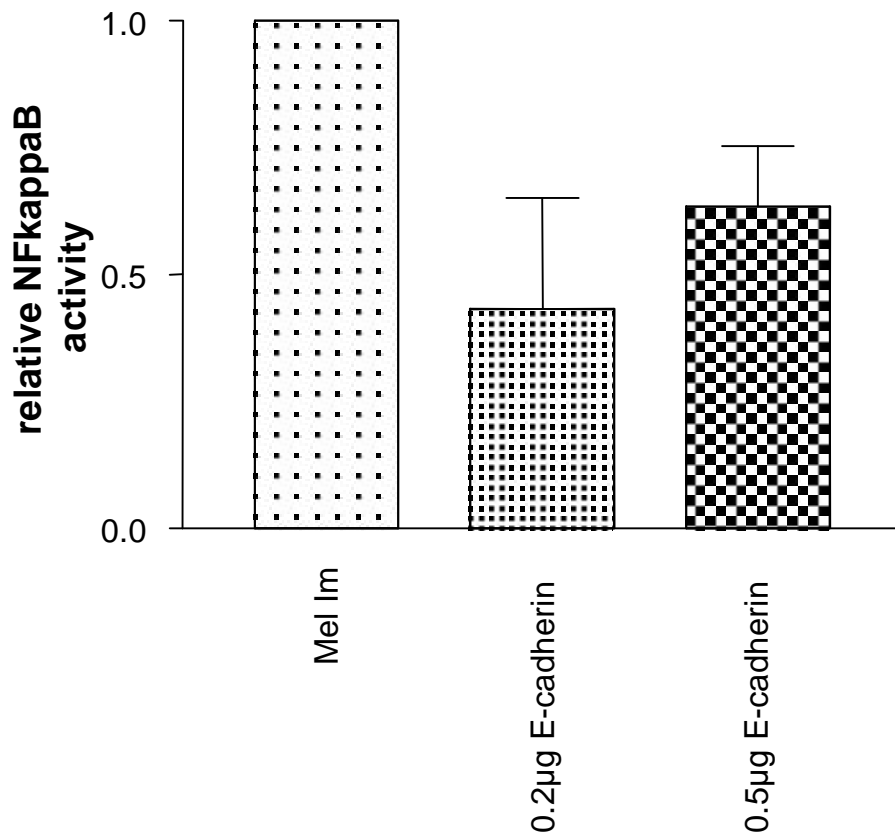


figure 6A

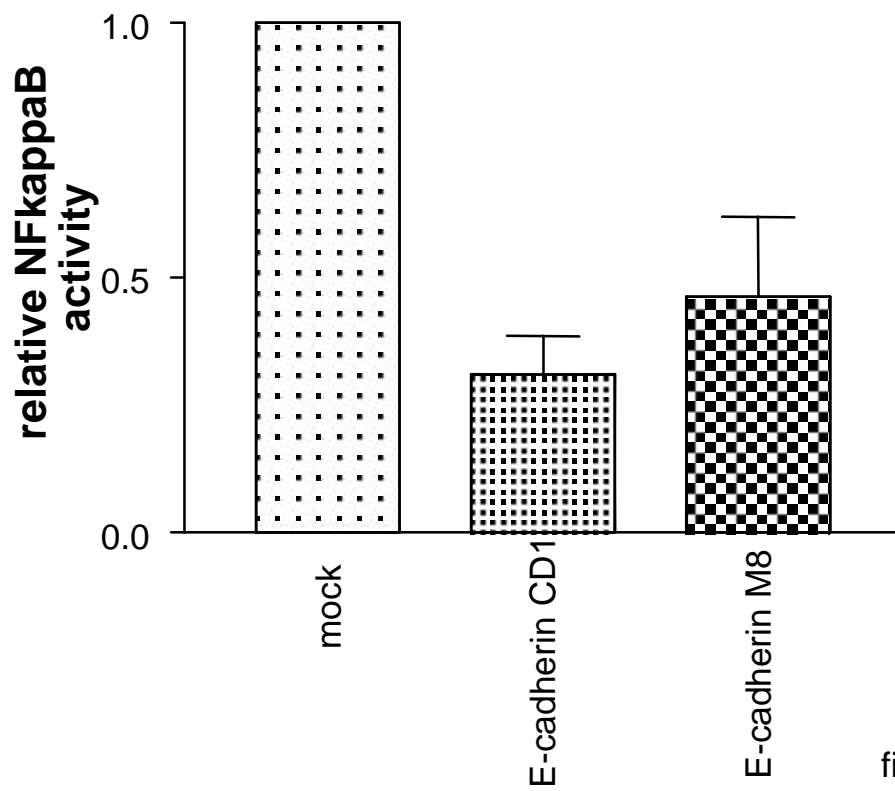


figure 6B

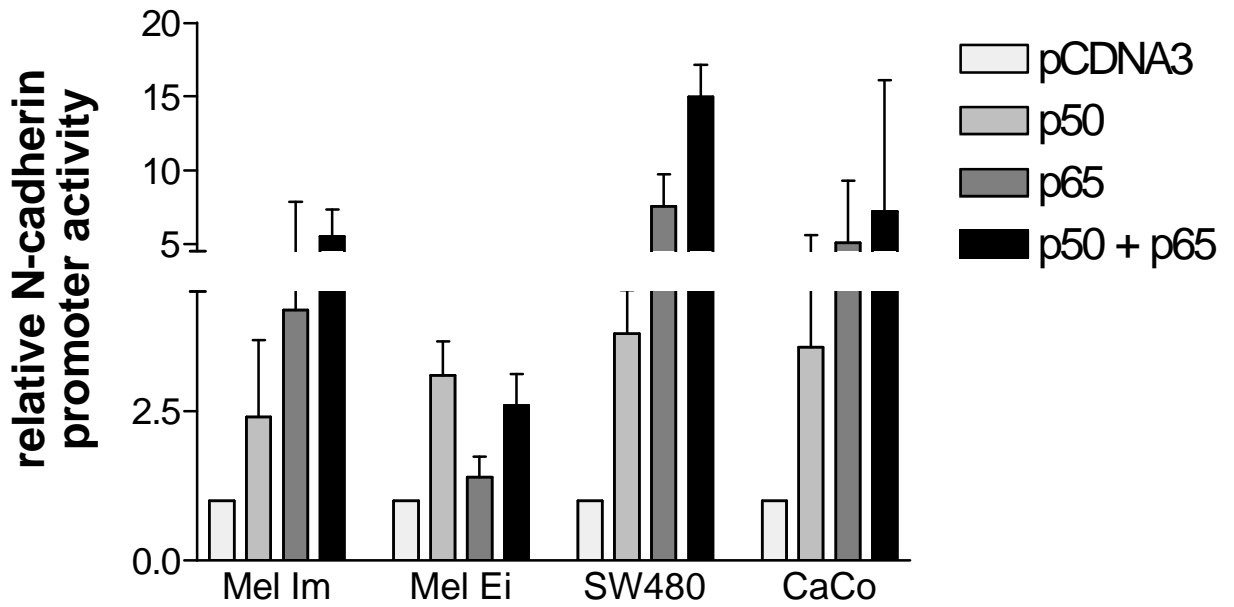


figure 6C

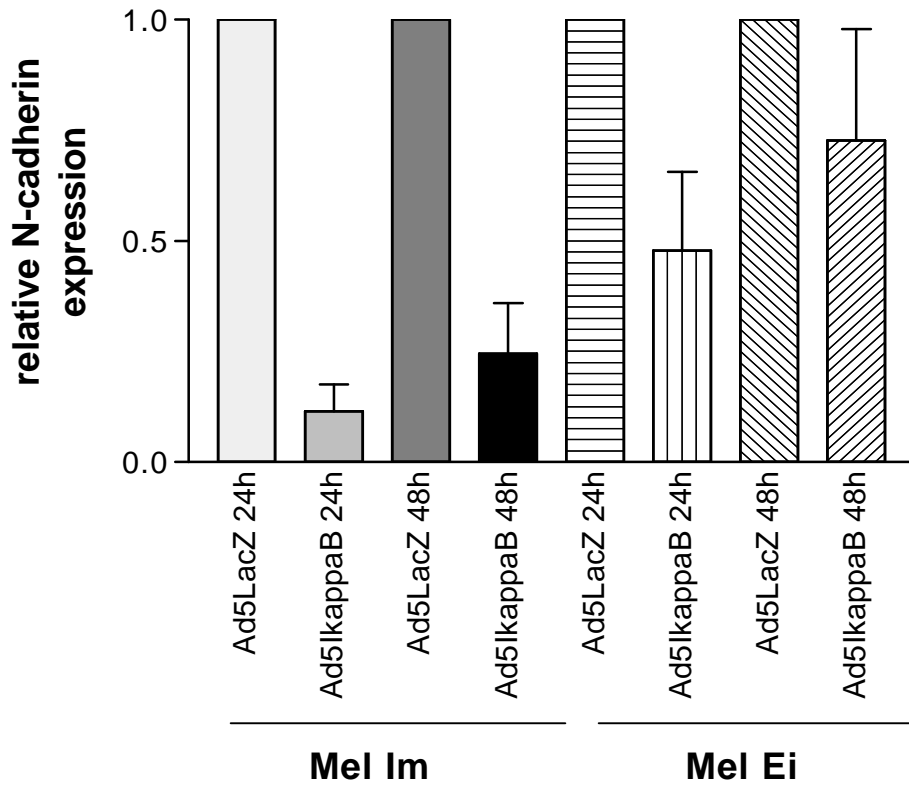


figure 7A

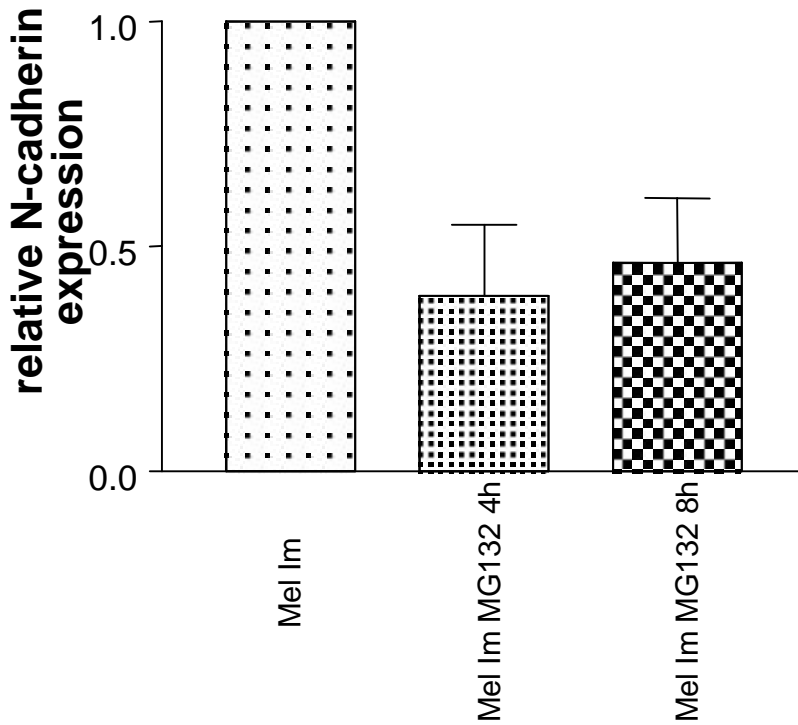


figure 7B

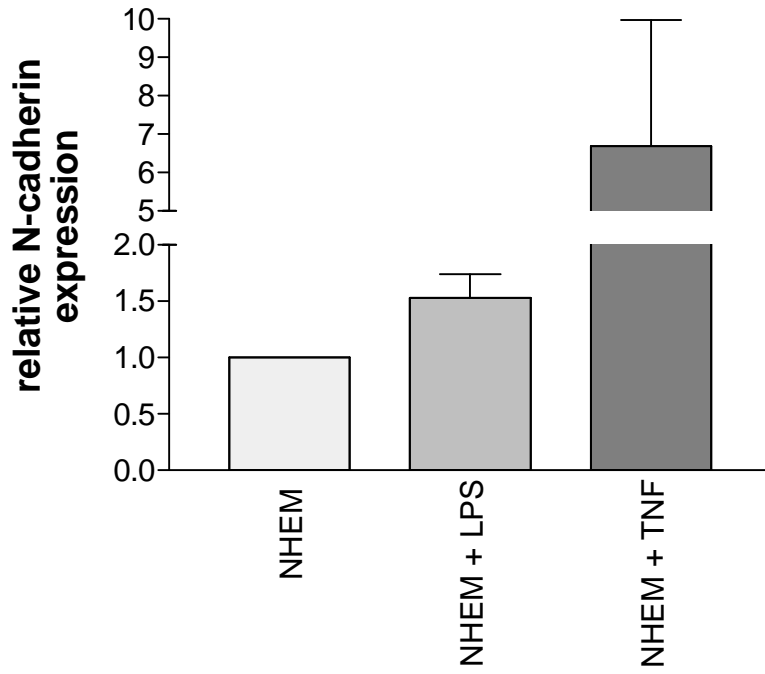


figure 7C

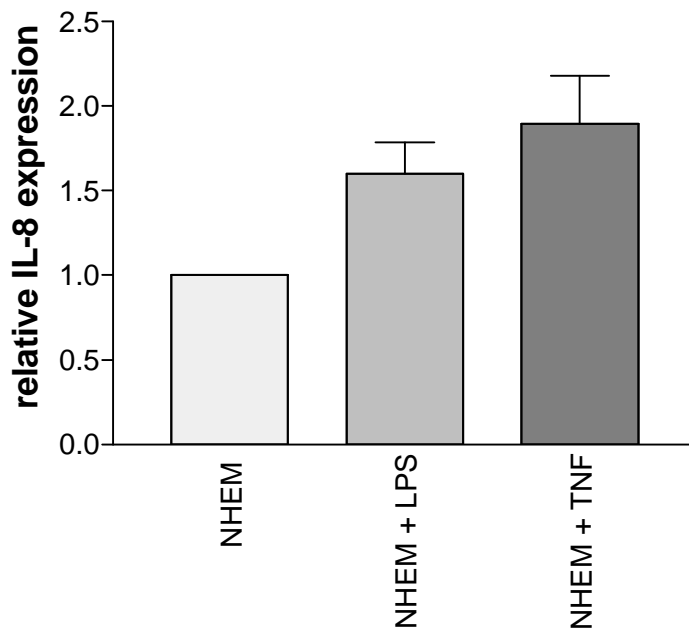


figure 7D

Anhang IV

2005 zur Veröffentlichung bei Melanoma Research eingereicht.

Snail-regulated genes in malignant melanoma

Silke Kuphal, Hans G Palm, Ina Poser and Anja K Bosserhoff*

Institute of Pathology, University of Regensburg, D-93053 Regensburg; GERMANY

Snail-regulated genes in malignant melanoma

Silke Kuphal, Hans G Palm, Ina Poser and Anja K Bosserhoff*

Institute of Pathology, University of Regensburg, D-93053 Regensburg; GERMANY

* corresponding author:

Anja Bosserhoff, Ph.D.
University of Regensburg
Institute of Pathology
Franz-Josef-Strauss-Allee 11
93053 Regensburg

tel: +49-941-944-6705

fax: +49-941-944-6602

email: anja.bosserhoff@klinik.uni-regensburg.de

Short title: Snail-regulated genes in malignant melanoma

Word count: abstract (240); introduction, results and discussion (3140)

This work was supported by a grant from the DFG to A.B..

Abstract

The demonstration that zinc-finger transcriptional repressors can control E-cadherin expression in epithelial cells has provided a new avenue of research in the field of epithelial-mesenchymal transition (EMT). One of these zinc-finger molecules is the transcription factor Snail, which controls gastrulation and neural crest EMT in different species. Additionally, Snail is involved in the development of malignant melanoma where a dramatic change in E-cadherin expression is an important early step for melanoma progression.

For this study, a human cancer cDNA array was used which includes genes involved in cancer development and progression. By the array we compared the gene expression pattern of the melanoma cell line Mel Im with a Mel Im cell clone stable transfected with antisense (as) SNAIL cDNA. We validated the significant differences of the expression of genes on mRNA level. Primarily, we observed changes in the expression of genes involved in EMT. Quantitative real-time PCR showed a downregulation of MMP-2, EMMPRIN, SPARC, TIMP-1, t-PA, RhoA and Notch4 expression and a re-induction of E-cadherin expression in the as Snail cell clones. Furthermore, we measured the expression of integrin β 3, NM23b and RhoB. Additionally, we investigated whether the selected genes are influenced only through Snail or if E-cadherin can influence the expression of these genes.

In summary, all examined genes which are influenced through Snail have a regulatory function in EMT processes as Snail itself. The Snail target gene E-cadherin has no regulatory function respective to the selected genes.

Keywords: malignant melanoma, cDNA expression array, EMT, Snail, E-cadherin

Introduction

Snail is one member of the Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. This family of transcriptional repressors occupies a central role in morphogenesis, as its members are essential for mesoderm formation in several organisms from flies to mammals [1,2,3,4,5]. Additionally, Snail is necessary for large-scale cell movements, such as the formation of the neural crest [6,7,8]. More generalized Snail is involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) where epithelial cells that are generated in a particular region can dissociate from the epithelium and migrate to reach different mesenchymal regions [9,1]. As such, EMT is fundamental to both: normal development and the progression of malignant epithelial tumors. Important insight into the invasive potential and metastasis of tumor cells came from the discovery that the increased motility and invasiveness of cancer cells is reminiscent of the EMT that occurs during embryonic development [10].

The Snail super-family is subdivided into two families: Snail and Scratch. The first gene of this superfamily studied was the *Drosophila snail* gene, which is one of two genes required zygotically for mesoderm formation during *Drosophila* embryogenesis. Two mammalian homologs of *Snail* exist, which are termed *Sna* and *Slug*. The members all share a similar organization, being composed of a highly conserved carboxy-terminal region, which contains four to six zinc-fingers, and a much more divergent amino-terminal region. The zinc-fingers correspond to the C₂H₂ type and function as sequence-specific DNA-binding motifs [11,12]. They are structurally composed of two beta-strands followed by an alpha-helix, the amino-terminal part of which binds to the major groove of the DNA. The consensus binding site for Snail contains a core of six bases, CAGGTG [13,14,15]. This motif is identical to the so called E box, the consensus of the core binding site of basic helix-loop-helix transcription factors, which indicates that Snail proteins might compete with these for the same binding sequences [16].

E-cadherin is the only direct target gene of Snail described so far, which has the E box motif for the direct binding of Snail to the promoter sequence [16,14,17]. Snail was shown to convert otherwise normal epithelial cells into mesenchymal cells through the direct repression of E-cadherin expression. This phenomenon was also described for malignant melanoma development by our group [18]. In a panel of different melanoma cell lines E-cadherin expression was negatively regulated by up-regulation of the transcription factor Snail. In comparison with normal human

epidermal melanocytes (NHEM), where Snail expression was not detectable, significant expression was found in different melanoma cell lines. Consistently, transient transfection of a Snail expression plasmid into NHEMs led to significant down-regulation of E-cadherin, whereas transient and stable transfection of an antisense Snail construct induced re-expression of E-cadherin. One of this generated antisense Snail cell clones (asSNAIL) was analyzed in the Atlas™ human cancer array, which includes genes from different areas of cancer research arranged into functional groups, in comparison to pcDNA3 transfected Mel Im cells.

In this study, we aimed to analyze the effect of the transcriptional repressor Snail on expression of specific genes involved in EMT or in the aggressive migratory behavior of melanoma cells using an established model system of Snail expressing melanoma cells and cell clones consistently lacking Snail expression. To verify significant gene expression profiles of Snail influenced genes, detected in a mRNA array, we performed quantitative real time PCRs.

Material and Methods

Cell lines and cell culture conditions

The melanoma cell line Mel Im has been described in detail previously [19]. It was derived from a metastasis of malignant melanoma. For tissue culture the cells were maintained in DMEM supplemented with penicillin (400 U/ml), streptomycin (50µg/ml), L-glutamine (300µg/ml) and 10% fetal calf serum (FCS; PAN) and splitted 1:5 every three days.

Transfection experiments

For transient transfections 2×10^5 cells were seeded into each well of a 6-well plate and transfected with 0.5µg plasmid DNA using the lipofectamine plus method (Invitrogen, Netherland) according to the manufacturer's instructions. For transient transfection the plasmids pBAT-E-cadherin (generous gift from Gabriele Handschuh, Institute of Pathology, LMU Munich, Germany) and the sense Snail expression plasmid (generous gift from Antonio de Herreros) were used.

Further, a panel of Mel Im cell clones was established by stable transfection with an antisense Snail expression plasmid [18] under the control of a CMV promoter and cotransfected with the neo-selectable pcDNA3 plasmid (Invitrogen). Transfection was performed using lipofectamine plus (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were cultured under selective conditions using G418 (Sigma) in a concentration of 50 µg/ml. Controls received pcDNA3 alone. After 25 days of selection, individual G418-resistant colonies were subcloned. E-cadherin expression levels of these clones were checked in western blot and quantitative real time PCR.

cDNA expression array

Commercially available cDNA expression arrays (Atlas human cancer cDNA expression array, Clontech, USA) were used to compare the gene expression of the two cell clones. Arrays were screened according to the manufacturer's protocol. 10µg total RNA from each cell clone was radio-labeled using MMLV reverse transcriptase and a specific primer set (10x CDS Primer Mix) supplied by the manufacturer. Probes were purified on Chroma Spin-200 columns and the specific radioactivity was then measured. Hybridization was performed overnight at 68°C in a solution of ExpressHyb, sheared salmon testes DNA and labeled cDNA (final concentration 0.5

– 1×10^6 cpm/ml). Blots were washed three times for 20 minutes in 2x SSC, 1% SDS at 68°C, followed by two additional washes for 20 minutes in 0.1x SSC, 0.5% SDS at 68°C. The damp membrane was wrapped immediately and exposed to an x-ray film.

RT-PCR analysis

For verification of the differentially expressed cDNAs RT-PCR analysis was performed. First strand cDNA was synthesized using 2µg of the isolated total RNA of the asSNAIL cell clone and the Mel 1m cells, respectively, 1µg random primer (Roche), 4µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen), 2µl 10mM DTT, 1µl 10mM dNTPs and 1µl Superscript Plus (Invitrogen) in a total of 20µl.

Quantitative real time PCR

To precisely quantify the expression of cDNAs the real-time PCR LightCycler system (Roche) was used. For PCR 2 to 3µl cDNA template, 0.5 to 2.4 µl 25mM MgCl₂, 0.5µM of forward and reverse primer and 2µl of SybrGreen LightCycler Mix in a total of 20µl were applied. The following PCR program was performed: 600sec 95°C (initial denaturation); 20°C/sec temperature transition rate up to 95°C for 15 sec, 10 sec 58 – 69°C, 22sec 72°C, 10 sec 82°C acquisition mode single, repeated for 40 times (amplification). MgCl₂ concentration and annealing temperature were optimized for each primer set. The PCR reaction was evaluated by melting curve analysis following the manufacturer's instructions and checking the PCR products on 1.8% agarose gels.

Results

The acquisition of an invasive and metastatic phenotype is a key event in tumor progression. Recent evidence exists that the transcription factor Snail is strongly expressed in malignant melanomas in comparison to NHEM where no expression is detectable [18]. The expression of Snail leads to repression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin and to tumor progression *in vivo*.

Here, we analyzed Snail-dependent changes of gene expression after long-term inhibition of Snail expression in the human melanoma cell line Mel Im. The significant changes of gene expression detected in a cDNA cancer array were verified with quantitative real time PCR.

Establishing Snail-deficient cell clones

Long-term Snail-deficient melanoma cell clones were generated by stable transfection of the melanoma cell line Mel Im with an antisense Snail cDNA expression construct. Two cell clones lacking Snail expression and re-expressing E-cadherin (asSNAIL4 and asSNAIL5) were chosen for further analysis [18]. The re-expression of E-cadherin was analyzed by quantitative real time PCR and western blot analysis [20,18].

Comparison of mRNA expression pattern of asSNAIL cell clones and Mel Im cells

To compare the mRNA expression pattern of the cell clones, a cDNA cancer array resembling 588 cDNAs was performed using cDNA from asSNAIL5 cells and the melanoma cell line Mel Im.

For further analysis, we were interested in genes either directly or indirectly associated with epithelial mesenchymal transition (EMT). Within the scope of proteolytic enzymes which are involved in EMT we detected a marked downregulation of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2, gelatinase A) by quantitative real time PCR (figure 1A). Among the factors involved in the co-operation between tumor and host cells in EMT processes, extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) was downregulated in asSNAIL cell clones 4 and 5 (figure 1B). Another protein which is involved in the matrix-metalloproteinase system by activating MMP-2 is SPARC (BM40, secreted protein acidic and rich in cysteins, Osteonectin) [21]. Downregulation in gene expression was seen for SPARC (figure

1C). The tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) was also downregulated in the asSNAIL cell clones (figure 1D).

Another matrix degrading system in malignant melanoma is the plasminogen activator system. This involves the tissue-type-plasminogen activator (t-PA), which was downregulated in the asSNAIL cell clones of approximately 50% compared to Mel Im cells (figure 1E).

Further, the involvement of small Rho GTPases in EMT processes was described in several publications. Members of the Rho family regulate the actin cytoskeletal organization, cell to cell or cell to extracellular matrix adhesion and cell movement [22]. The validation of the array concerning RhoA expression led to the result of downregulated RhoA expression in asSNAIL cell clones 4 and 5 (figure 1F).

Notch signaling controls cell fate decisions including during development and stem cell renewal and differentiation in many postnatal tissues. Increasing evidence suggests that the Notch signaling network is frequently deregulated in human malignancies. Additionally, notch has recently been shown to promote epithelial-to-mesenchymal transition. Our experiments showed a remarkable downregulation of approximately 90% for the expression of Notch4 (figure 1G).

All seven genes analyzed in quantitative real time PCR were downregulated in asSNAIL cell clones 4 and 5 in comparison to the melanoma cell line Mel Im.

Further, interestingly, the cancer cDNA array presented a downregulation of genes associated with cell fate decisions and development. These were, for example, Wnt2, Wnt8b and Wnt10b (data not shown).

Genes not influenced through Snail

We detected some genes in the cDNA cancer array, which were not influenced through the repression of the transcription factor Snail. These genes were additionally checked in quantitative real time PCR to verify the array data. Not-affected were integrin beta3, RhoB and NM23b (data not shown).

Influence of E-cadherin on gene expression.

It is known that the expression of Snail leads to repression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin and to tumor progression *in vivo*. E-cadherin is the first described target gene of Snail.

It was important to control if the re-expression of E-cadherin in the asSNAIL cell clones has an influence on the expression of the analyzed genes as we could recently show that E-cadherin has signaling function during the development of malignant melanoma [20]

We transfected the melanoma cell line Mel Im transiently with two different concentrations of full length E-cadherin and made quantitative real time PCR to examine whether the regulation of the gene expression was influenced directly by Snail or through the re-expression of E-cadherin in this asSNAIL cell clones.

MMP-2, EMMPRIN, TIMP-1, t-PA and RhoA showed no differences in gene expression in dependence on E-cadherin (figure 2A-D and F). The expression of SPARC was slightly influenced by E-cadherin (figure 2E). To be sure whether Snail or E-cadherin regulated the expression of SPARC, we, additionally, transfected the asSNAIL cell clones 4 and 5 with sense Snail cDNA. Quantitative real time PCR showed that the re-expression of Snail influenced SPARC expression positively (figure 3). This experiment confirmed the transcriptional influence of Snail on the expression of SPARC.

Notch4 expression was not only influenced through Snail expression but also through re-expression of E-cadherin after transient transfection of the Mel Im cells with full length E-cadherin. E-cadherin transfection stimulated the expression of Notch4 (figure 2G).

Discussion

In this study, we investigated the influence of the transcriptional repressor Snail on expression of several genes. The expression pattern of 588 genes in stably asSNAIL transfected melanoma cell line Mel Im was compared to the mock transfected Mel Im cells using a human cDNA cancer array. We validated significantly regulated genes by quantitative real time PCR and found several regulated genes which were all involved in EMT processes of malignant melanoma development. The first machinery which facilitate EMT and tumor invasion involves proteolytic enzymes which lead to degradation and remodeling of the extracellular matrix (ECM). Among these enzymes, matrix metalloproteinases (MMPs) represent a large family playing key roles in cell proliferation, angiogenesis, tumor invasion and metastasis [23,24]. Melanoma cells produce matrix metalloproteinases, specially the MMP-2 [25]. After prevention of Snail expression in the melanoma cells, the expression of MMP-2 was downregulated.

Eventually, these mesenchymal melanoma cells may regain a differentiated epithelial phenotype via prevention of Snail expression and pass through the so called "mesenchyme-to epithelium transition" (MET) [17]. The first step on this way was to prevent the expression of MMP-2. Published data demonstrated that the MMP-2 promoter activity was induced by Snail transfection in A431 cells. These results of former publications indicate that Snail is an inducer of MMP-2 expression and suggest that EMT contributes to increased invasion not only through inhibition of cell-cell adhesion but also the up-regulation of MMP-2 expression in SCC cells [26].

MMP-2 downregulation in the cell clones corresponds to the expression pattern of EMMPRIN. EMMPRIN is an inducer of matrix metalloproteinases. It facilitate the tumor cell dissemination by stimulating MMP production by both tumor cells and endothelial cells [24]. Downregulation of EMMPRIN in the asSNAIL cell clones leads to the prevention of stimulation of MMPs.

SPARC is also involved in the metalloproteinase system. SPARC induces MMP-2 activation in human breast cancer cell lines [21]. Another publication shows that SPARC and MMP-2 expression are not co-regulated in human melanoma cell lines [25]. Our data show for the first time that SPARC is regulated through Snail. Repression of snail expression leads to downregulation of SPARC expression. Furthermore, transfection of sense Snail in the cell clones leads to upregulation of SPARC expression.

The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are endogenous inhibitors of the MMPs [27,24]. Downregulation of TIMP-1 expression in asSNAIL cell clones is difficult to explain. Normally, the downregulation of TIMP molecules can stimulate the growth rate of subcutaneous tumors and expression of TIMPs leads to a maintenance of tissues. In the case of the prevention of Snail expression we expected an upregulation of TIMP-1 expression in the melanoma cells which could lead to a stop of tumor growth. Probably, other regulating factors than Snail are involved in TIMP-1 expression or the balance between MMPs and TIMPs on protein level is more important for the inhibitory function of TIMPs than the transcriptional regulation of TIMPs on gene regulation level.

The second matrix degrading machinery is composed of plasminogen activators. The plasminogen activation system comprises various proteases that contribute to the invasive potential and metastatic spread of the tumour cell. Two such proteases are tissue-type (t-PA) and urokinase-type (u-PA) plasminogen activators. Both of these enzymes convert plasminogen into the active zymogen plasmin, which has a broad substrate specificity and is capable of degrading a wide range of extracellular matrix molecules [28]. T-PA is involved in matrix degradation in the transition of melanomas being in radial growth phase to a vertical growth phase [29]. In the asSNAIL cell clones expression of t-PA is downregulated. This leads to the prevention of the degradation of several matrix molecules.

It is published that the small GTPase RhoA can control the disruption of adherens junctions in normal and malignant epithelial cells [30]. Normal levels of RhoA favor the diaphanous pathway, which enhances the formation of cadherin-catenin complexes and their connection to actin filaments [31,32,33,34]. Additionally, RhoA activation can also induce EMT [17]. The EMT process which is controlled through Snail expression in normal embryonic development and in cancer progression includes also processes which are regulated through RhoA. Our experiments lead to the assumption that the transcription factor Snail regulates the RhoA expression. Although RhoA and RhoB share over 85% sequence identity, they appear to play distinct roles in cell transformation and metastasis [22]. For example, it was shown that RhoA has oncogenic potential [35,36] and on the other hand RhoB has a suppressor or negative modifier function in cancer progression [37]. In our model, Snail just regulates RhoA and did not influence RhoB. Additionally, a role of RhoA and not RhoB is speculated in malignant melanoma [38].

Notch is an ancient cell signaling system that regulates cell fate specification, stem cell maintenance and initiation of differentiation in embryonic and postnatal tissues [39]. Our experiments show that Notch4 expression is downregulated after prevention of Snail expression in the melanoma cell line Mel Im. This suits to published data that Notch promotes EMT during cardiac valvae formation [39]. One implication of our work is that Notch4 is acting through a similar mechanism and may also be involved in the EMT process that occurs during tumor progression and converts polarized epithelial cells into motile, invasive cells. Additionally, it is published that Snail has dual activities in respect to Notch regulation in *Drosophila* embryo. Evidence is presented that Snail, functions as both a repressor and an indirect activator of Notch signaling in embryonic development of the *Drosophila* embryo [40,41]. In our study Snail is an activator of Notch signaling in melanoma development. After loss of Snail expression Notch4 expression is downregulated. Additionally, Notch4 expression is positively influenced through E-cadherin re-expression in the melanoma cell line Mel Im. So far, it is not possible to explain this effect of E-cadherin on the expression of Notch4 because the asSNAIL cell clones also express E-cadherin but show the Notch4 expression downregulated.

It was recently published that E-cadherin not only acts as cell adhesion molecule but also has signaling function in malignant melanoma development [20]. However, the quantitative real time PCR data of nine genes showed no influence of E-cadherin on the expression of the elucidated genes. Obviously, the transcription factor Snail has dominant regulator function in comparison to E-cadherin.

In summary, we could show that Snail regulates several genes of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the development of malignant melanoma. All seven genes which expression was measured by quantitative real time PCR show a downregulation of expression after prevention of Snail expression. Interestingly, Snail has activating function regarding the selected genes although Snail is up to now known to be a transcriptional repressor.

E-cadherin has no signaling influence on the expression of the elucidated genes. We need further experiments to check the direct transcriptional regulation efficiency of Snail on the different genes.

Acknowledgements

We are indebted to Susanne Wallner and Sibylla Lodermeier for technical assistance. This work was supported by a grant from the DFG to A.B..

References

1. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 155-166.
2. Alberga A, Boulay JL, Kempe E, Dennefeld C, Haenlin M. The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 1991; **111**: 983-992.
3. Nieto MA, Bennett MF, Sargent MG, Wilkinson DG. Cloning and developmental expression of *Sna*, a murine homologue of the *Drosophila* snail gene. *Development* 1992; **116**: 227-237.
4. Hammerschmidt M, Nusslein-Volhard C. The expression of a zebrafish gene homologous to *Drosophila* snail suggests a conserved function in invertebrate and vertebrate gastrulation. *Development* 1993; **119**: 1107-1118.
5. Langeland JA, Tomsa JM, Jackman WR, Jr., Kimmel CB. An amphioxus snail gene: expression in paraxial mesoderm and neural plate suggests a conserved role in patterning the chordate embryo. *Dev Genes Evol* 1998; **208**: 569-577.
6. Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Control of cell behavior during vertebrate development by *Slug*, a zinc finger gene. *Science* 1994; **264**: 835-839.
7. Thisse C, Thisse B, Postlethwait JH. Expression of *snail2*, a second member of the zebrafish snail family, in cephalic mesendoderm and presumptive neural crest of wild-type and spadetail mutant embryos. *Dev Biol* 1995; **172**: 86-99.

8. LaBonne C, Bronner-Fraser M. Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* 2000; **221**: 195-205.
9. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001; **23**: 912-923.
10. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 931-940.
11. Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C, Alberga A. Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 3951-3957.
12. Fuse N, Hirose S, Hayashi S. Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes Dev* 1994; **8**: 2270-2281.
13. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 76-83.
14. Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 84-89.
15. Inukai T, Inoue A, Kurosawa H, Goi K, Shinjyo T, Ozawa K et al. SLUG, a ccs-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell* 1999; **4**: 343-352.
16. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001; **7**: 1267-1278.
17. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 740-746.

18. Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 2001; **276**: 24661-24666.
19. Jacob K, Wach F, Holzapfel U, Hein R, Lengyel E, Buettner R et al. In vitro modulation of human melanoma cell invasion and proliferation by all-trans-retinoic acid. *Melanoma Res* 1998; **8**: 211-219.
20. Kuphal S, Poser I, Jobin C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* 2004; **23**: 8509-8519.
21. Gilles C, Bassuk JA, Pulyaeva H, Sage EH, Foidart JM, Thompson EW. SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; **58**: 5529-5536.
22. Wang L, Yang L, Luo Y, Zheng Y. A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 44617-44625.
23. Liaw L, Crawford HC. Functions of the extracellular matrix and matrix degrading proteases during tumor progression. *Braz J Med Biol Res* 1999; **32**: 805-812.
24. Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; **49**: 179-186.
25. Nischt R, Wallich M, Reibetanz M, Baumann P, Krieg T, Mauch C. BM-40 and MMP-2 expression are not coregulated in human melanoma cell lines. *Cancer Lett* 2001; **162**: 223-230.
26. Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M et al. Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2003; **22**: 891-898.
27. Nagase H, Brew K. Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors. *Biochem Soc Symp* 2003; 201-212.

28. Mueller BM. Different roles for plasminogen activators and metalloproteinases in melanoma metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; **213**: 65-80.
29. Alexander CL, Edward M, MacKie RM. Effect of retinoic acid on plasminogen activator expression in human melanoma cells. *Melanoma Res* 1999; **9**: 360-367.
30. Liu N, Bi F, Pan Y, Sun L, Xue Y, Shi Y et al. Reversal of the malignant phenotype of gastric cancer cells by inhibition of RhoA expression and activity. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 6239-6247.
31. Kaibuchi K, Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M. Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 591-596.
32. Sahai E, Marshall CJ. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 408-415.
33. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997; **11**: 2295-2322.
34. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; **279**: 509-514.
35. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; **420**: 629-635.
36. Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 1998; **17**: 1415-1438.
37. Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2001; **1**: 162-168.
38. Bartolome RA, Galvez BG, Longo N, Baleux F, Van Muijen GN, Sanchez-Mateos P et al. Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res* 2004; **64**: 2534-2543.

39. Grego-Bessa J, Diez J, Timmerman L, de la Pompa JL. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle* 2004; **3**: 718-721.
40. Morel V, Le Borgne R, Schweisguth F. Snail is required for Delta endocytosis and Notch-dependent activation of single-minded expression. *Dev Genes Evol* 2003; **213**: 65-72.
41. Cowden J, Levine M. The Snail repressor positions Notch signaling in the Drosophila embryo. *Development* 2002; **129**: 1785-1793.

Figure legends

Figure 1: Quantitative real time PCR to measure expression levels of several genes influenced through the prevention of Snail expression in the melanoma cell lines asSNAIL 4 and 5.

Quantitative real time PCR was performed to measure the relative expression level of MMP-2 (A), EMMPRIN (B), SPARC (C), TIMP-1 (D), t-PA (E), RhoA (F), Notch4 (G). The melanoma cell line Mel Im was transfected with the control vector pcDNA3 (mock), set as one and is presented in comparison to the cell clones asSNAIL 4 and 5.

Figure 2: Quantitative real time PCR to measure expression levels of several genes influenced through the re-expression of E-cadherin in the melanoma cell line Mel Im. The Mel Im cells are transiently transfected with two different (0.2µg and 0.5µg) concentrations of the vector pBAT E-cadherin. The mock sample is the melanoma cell line Mel Im transfected with pcDNA3 and is set as one.

By quantitative real time PCR the expression level of MMP-2 (A), EMMPRIN (B), SPARC (C), TIMP-1 (D), t-PA (E), RhoA (F), Notch4 (G)

after transient transfection of Mel Im cells with an E-cadherin expression plasmid were measured. The cell clones asSNAIL4 and 5 are shown in comparison to mock transfected Mel Im cells.

Figure 3: Quantitative real time PCR to measure the expression level of SPARC after re-expression of Snail in the asSNAIL cell clones 4 and 5. The expression levels in the asSNAIL cell clones 4 and 5 are set as 1.

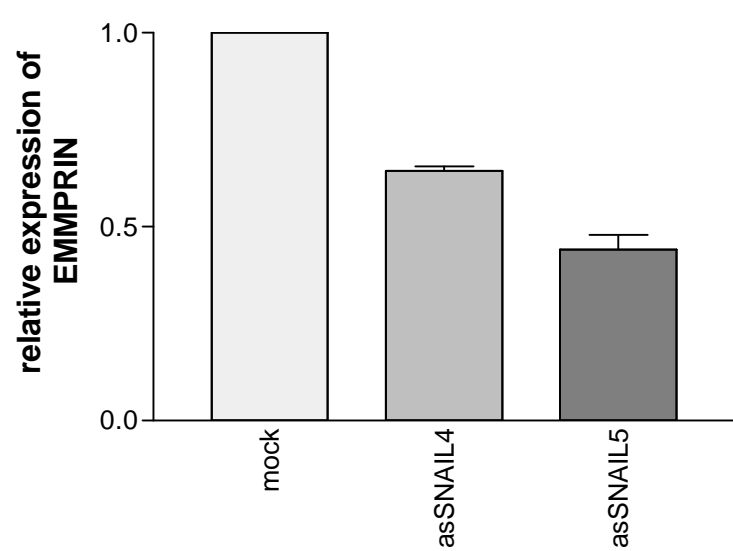
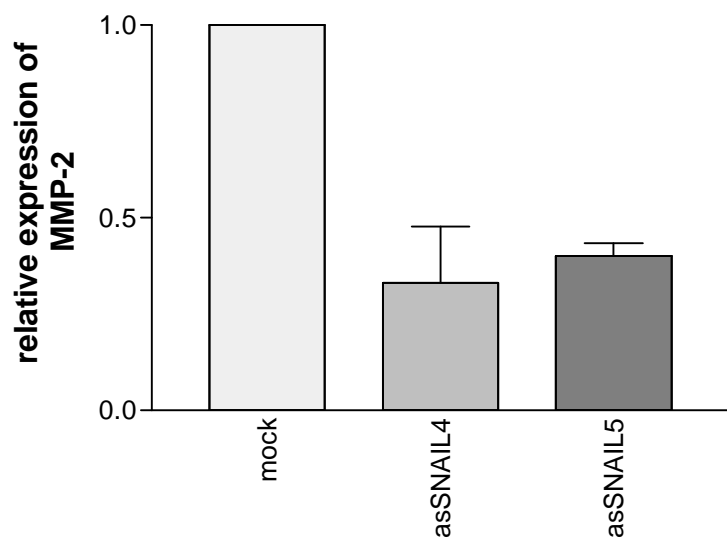


Figure 1A

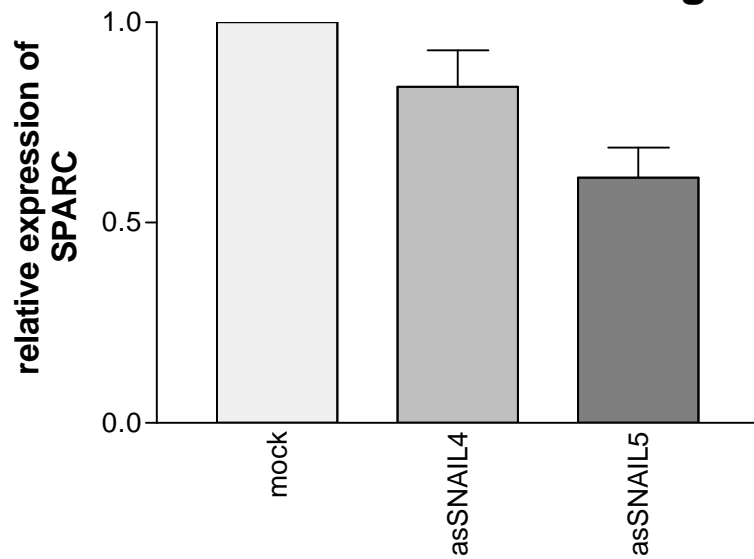


Figure 1C

Figure 1B

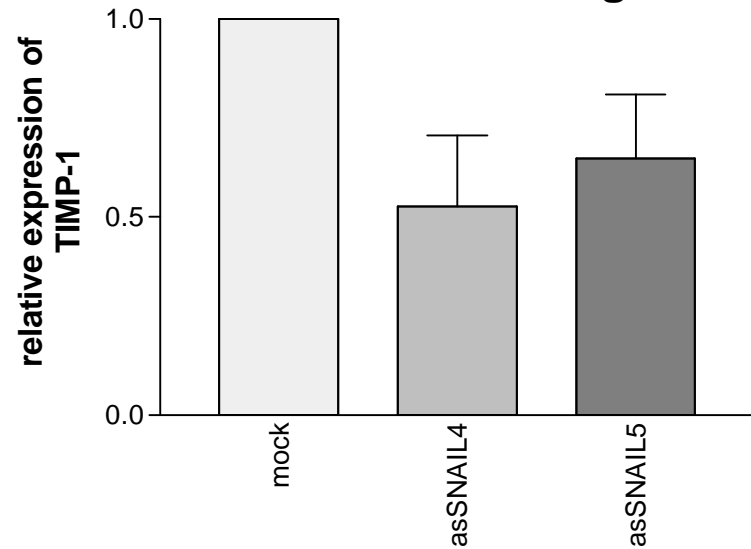


Figure 1D

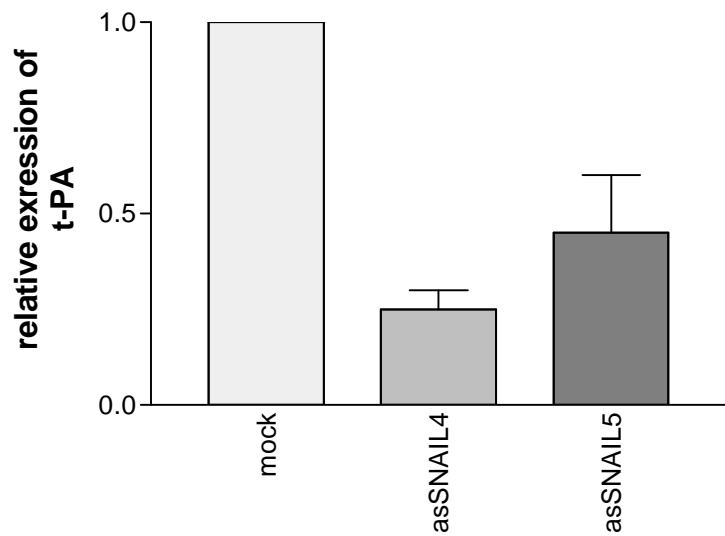


Figure 1E

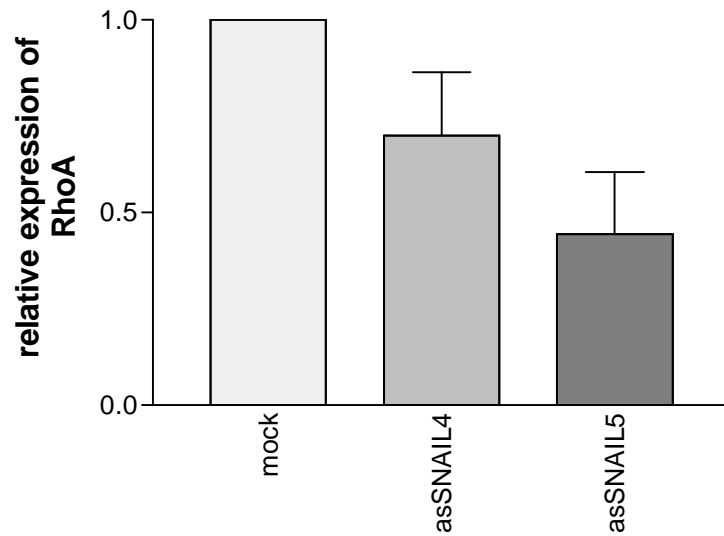


Figure 1F

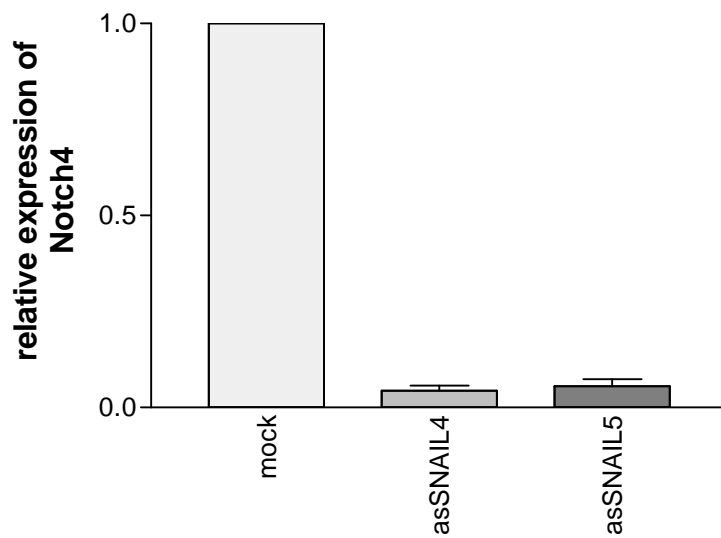


Figure 1G

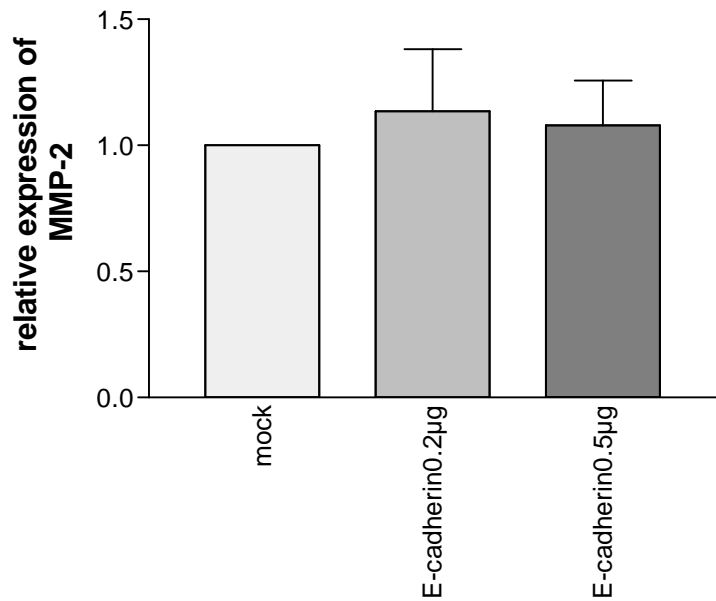


Figure 2A

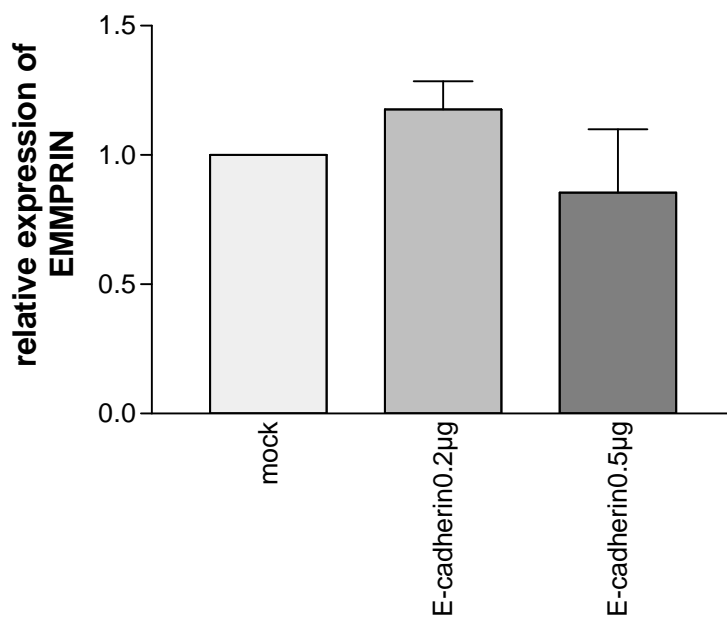


Figure 2B

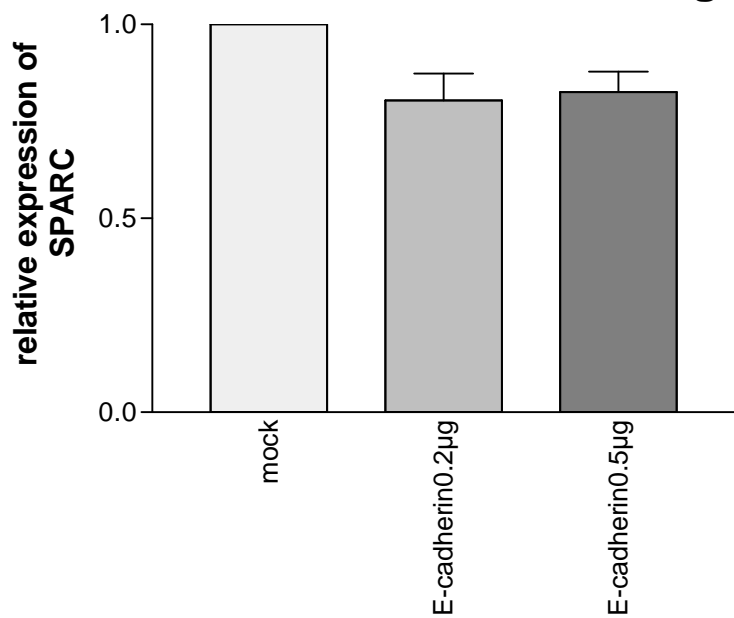


Figure 2C

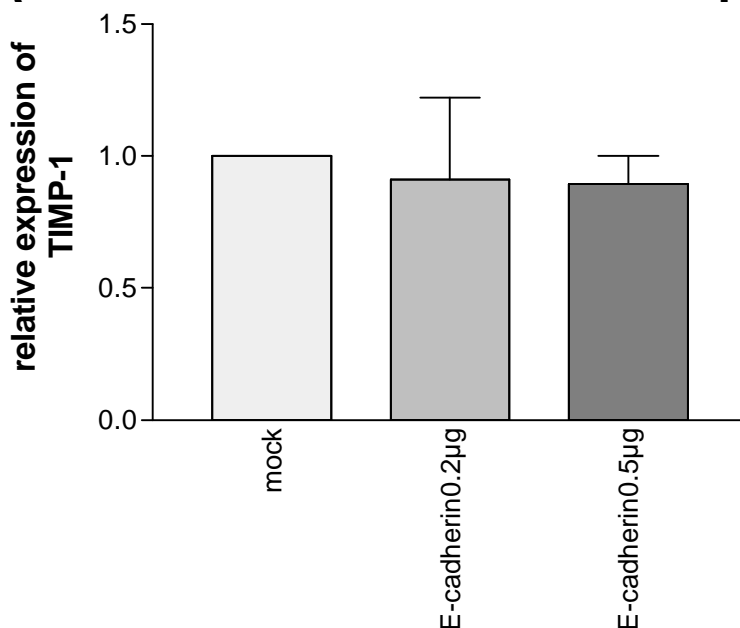


Figure 2D

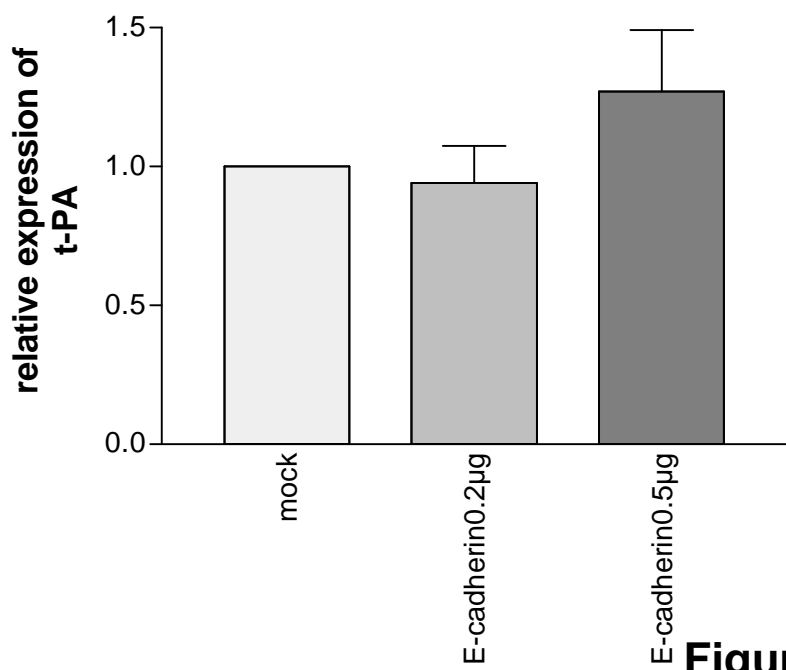


Figure 2E

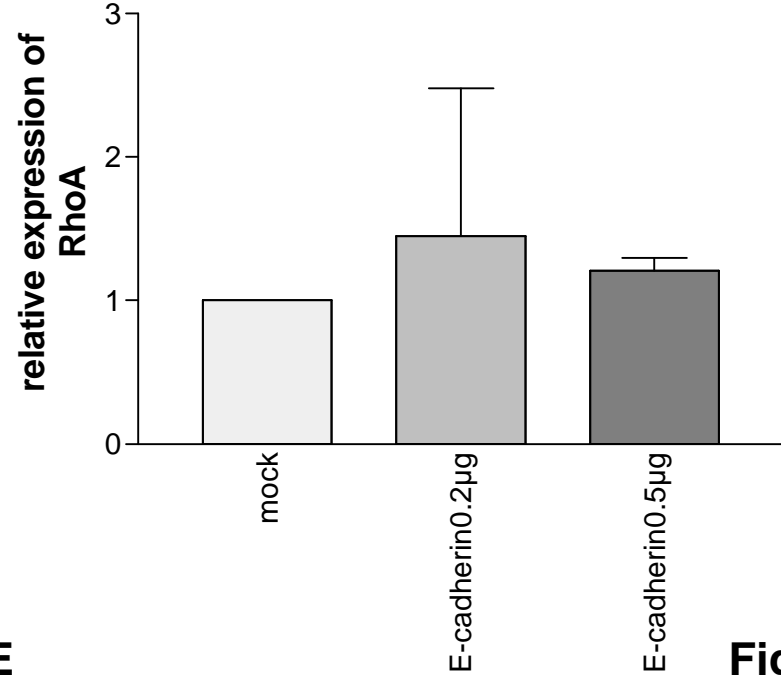


Figure 2F

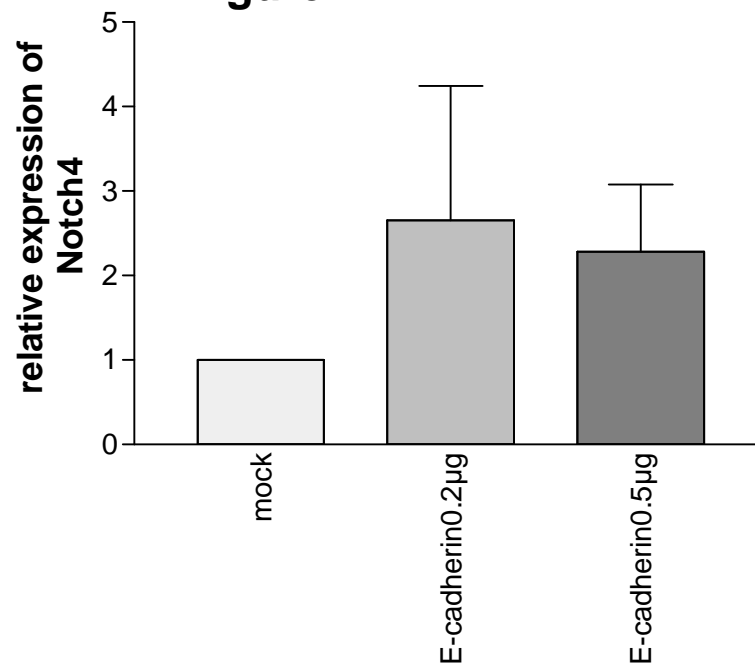


Figure 2G

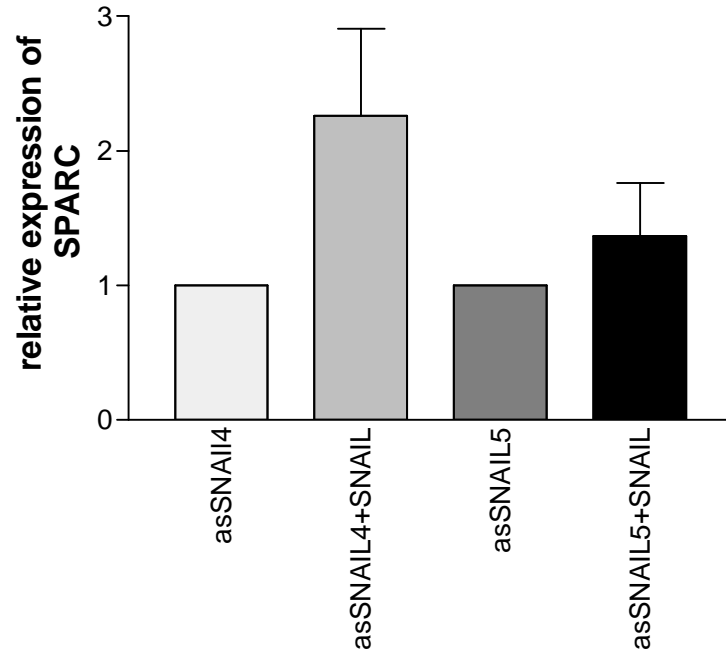


Figure 3

Abkürzungen

Nicht gesondert aufgeführt sind die im deutschen Sprachgebrauch üblichen Standardabkürzungen.

A	Adenin	
Abb.	Abbildung(en)	
ABS	Absorption	
As	antisense	W Watt
ATP	Adenosintriphosphat	(^w /v) Masse pro Volumen
bp	Basenpaare	(^w /w) Massenverhältnis
C	Cytosin	
°C	Grad Celsius	
cpm	counts per minute (radioaktive Zerfälle pro Minute)	
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
ds	doppelsträngig	
<i>et al.</i>	lat.: „und andere“	
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	
G	Guanin	
g	Gramm; Gravitationskraft	
k	Kilo (10 ³)	
kb	Kilobasen(paare)	
kDa	Kilo-Dalton	
l	Liter	
m	Milli (10 ⁻³)	
M	Mol; molar	
mA	Milliampere	
Mb	Megabasenpaare	
μ	Mikro (10 ⁻⁶)	
min	Minute(n)	
n	Nano (10 ⁻⁹)	
nm	Nanometer	
nt	Nukleotide	
OD	Optische Dichte	
p	Pico (10 ⁻¹²)	
P	Phosphorylierung	
RNA	Ribonukleinsäure	
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)	
RT	reverse Transkription	
sek.	Sekunde(n)	
ssDNA	einzelsträngige DNA	
Std.	Stunde	
T	Thymin	
U	Unit; Uracil	
Ub	Ubiquitinierung	
UV	Ultraviolett	
(^v /v)	Volumenverhältnis	
Vol.	Volumen	
V	Volt	

Weitere Abkürzungen, die sich auf im Text häufig verwendete Moleküle beziehen.

alpha-MSH	alpha-melanocyte-stimulating hormone
APC	adenomatous polyposis coli
AP-1	activation protein 1
AP-2	activating enhancer-binding protein 2
ALM	akrolentigiöses Melanom
BFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
BHLH	basic Helix-Loop-Helix
CREB1	cAMP-responsive element binding protein1
Cx	Connexin
Dsg	Desmoglein
EGF	epidermal growth factor
E-Cadherin	epithelial Cadherin
ECM	extracellular matrix molecule
EMT	epithelial mesenchymal transition
ERK	extracellular signal regulated protein kinase
FAMM	familiar atypical multiple mole melanoma syndrom
FAK	focal adhesion kinase
GM-CSF	granulocyte /makrophage colony stimulating factor
GSK3beta	glycogen synthase kinase 3 beta
HGF	hepatocyte growth factor
HMG	high mobility group proteins
IL	Interleukin
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
IGF	insulin-like growth factor
IFN	Interferon
IKK beta	I-kappaB-Kinase
IKK gamma	NEMO=NFkappaB essential modulator
KGF	keratinocyte growth factor
LEF/TCF	lymphoid enhancer factor/T-cell specific factor
LMM	Lentigo maligna Melanom
MGSA/GRO	melanoma growth stimulatory activity
MEKK1/2	MAP Kinase Kinase 1/2
MITF	microphthalmia associated transcription factor
Mel-CAM	melanocytic cell adhesion molecule
MEK Kinasen	MAP Kinasen Kinasen
MMP	matrix metalloproteinase
NFkappaB	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells
NM	noduläres Melanom
NLS	nuclear localization signal

NIK	NFkappaB inducing kinase
N-Cadherin	neuronal Cadherin
NHEM	normal human epidermal melanocyte
PD98059	2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one
PDGF	plateled-derived growth factor
P-Cadherin	placental Cadherin
PKB/AKT	protein kinase B
PMA	Phorbol-12myristat-13-acetat
RGP	radial growth phase
RHD	Rel homology domain
R-Cadherin	retinal Cadherin
STAT	signal transducers and activators of transcription
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
SB203580	4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1 <i>H</i> -imidazole
SB202190	4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1 <i>H</i> -imidazole
TGF-beta	transforming growth factor
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat (Synonym PMA)
TD	Tumordicke
TNF	Tumornekrosefaktor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
tPA	Plasminogenaktivierungssystem Typ Tissue
TrCP-Komplex	beta-transducin repeat- containing proteins
uPA	Plasminogenaktivierungssystem Typ Urokinase
VEGF	vascular endothelial growth factor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VGP	vertical growth phase
VE-Cadherin	vascular endothelial Cadherin

Danksagung

Als erstes möchte ich Frau Prof. Dr. Anja Katrin Bosserhoff für die Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe danken. Während meiner Promotion hatte sie immer Zeit, um mit mir über molekularbiologische Fragestellungen zu diskutieren und mir neue praktische und theoretische Impulse für meine Arbeit zu geben. Danke für die Geduld und die Tips während des Verfassens dieser Dissertation. Außerdem vielen Dank für die sehr nette Betreuung und das Vertrauen!!!

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rainer Deutzmann bedanken, der die Betreuung dieser Arbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Regensburg übernommen hat. Er hat sich, obwohl ich nicht in Regensburg studiert habe und er mich erst zu Beginn meiner Promotion kennenlernte, sehr um mein Wohlergehen am Uniklinikum bemüht und immer ein offenes Ohr für meine Probleme gehabt.

Bei Herrn Prof. Dr. Hofstädter bedanke ich mich für die Möglichkeit in seinem Institut arbeiten zu dürfen und die finanzielle Unterstützung, die es ermöglichte einen internationalen Kongress in Phoenix, Arizona zu besuchen.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Bosserhoff für geleistete Hilfsbereitschaft, technische Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit.

Vor allem den Mitarbeiterinnen in meinem Labor: Steffi Arndt, Sibylla Loder Meyer (Danke für den Kuchen, der es mir besonders angetan hat), Ina Poser, Tanja Rothhammer und Susanne Wallner (Danke für das viele Lob) möchte ich für die Geduld, den vielen Spaß bei der Arbeit, und auch für die nette und freundliche Atmosphäre im Labor danken. Außerdem bedanke ich mich bei Hans-Georg Palm, der als medizinischer Doktorand in unserem Labor mitwirkte.

Ohne die Kooperationsbereitschaft anderer Arbeitsgruppen, die mir vor allem Plasmide zur Verfügung stellten, wäre die Arbeit nicht so erfolgreich verlaufen. Danke!

Zum Abschluß möchte ich mich natürlich noch besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und meine Promotion überhaupt erst ermöglicht haben.

Bei meiner Schwester Judith, meinem Bruder Lars und meinem Freund Reinhold, möchte ich mich für die aufmunternden Worte und Ablenkungen während des Verfassens meiner Arbeit danken.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Silke Kuphal, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

.....
Ort, Datum

.....
Name