

**Die Regulation und Funktion des  
Transkriptionsfaktors c-Jun im malignen Melanom**



**DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
**Melanie Kappelmann**  
aus Deggendorf

im Jahr  
2014

Promotionsgesuch eingereicht am 18.02.2014

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

Unterschrift:

---

Melanie Kappelmann

***Prüfungsausschuss:***

Vorsitzender: Prof. Dr. Gernot Längst

1. Gutachter: Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff

2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Deutzmann

3. Prüfer: Prof. Dr. Charlotte Wagner

*gewidmet meinen Großeltern*

*Josef Feuchtmeier († 2011)*

*Helga Feuchtmeier († 2013)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Haut - Struktur und Aufbau</b>	<b>4</b>
<b>2.2</b>	<b>Das maligne Melanom</b>	<b>6</b>
2.2.1	Inzidenz und Risikofaktoren	6
2.2.2	Melanom-Typen und Stadieneinteilung	6
2.2.3	Melanom-Therapie	9
<b>2.3</b>	<b>Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung und Progression</b>	<b>10</b>
2.3.1	Adhäsionsmoleküle	11
2.3.1.1	Klassifizierung der Cadherine	11
2.3.1.2	Bedeutung der E-Cadherin Expression in der Melanomentstehung	12
2.3.2	Das Zytoskelett	13
2.3.3	Funktion der RhoGTPasen	14
2.3.3.1	Rolle des Zytoskeletts in der Tumorentstehung	14
2.3.3.2	Wirkungsweise von Zytostatika	15
2.3.4	Transkriptionsfaktoren	16
2.3.4.1	Molekulare Funktion der AP-1 Transkriptionsfaktoren während der Tumorgenese	18
2.3.4.2	Das Onkoprotein c-Jun	20
2.3.4.3	c-Jun Regulation durch den JNK Signalweg	20
2.3.4.4	c-Jun Regulation durch den Ras/Raf/Mek/ERK Signalweg	21
2.3.4.5	c-Jun Regulation durch einen Zelladhäsions-abhängigen Signalweg	23
2.3.5	miRNAs in der Tumorgenese	23
2.3.5.1	miRNA Biogenese	25
2.3.5.2	Rolle von miRNAs im malignen Melanom	26
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Ein E-Cadherin abhängiger Signalweg reguliert den Transkriptionsfaktor c-Jun im malignen Melanom</b>	<b>29</b>
4.1.1	E-Cadherin reguliert die GTPase RhoC	29
4.1.2	ETS-1 reguliert die GTPase RhoC	30
4.1.3	Der E-Cadherin abhängiger ETS-1/RhoC Signalweg reguliert die c-Jun Expression und AP-1 Aktivität	31

<b>4.2</b>	<b>Die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch das Zytoskelett</b>	<b>34</b>
4.2.1	Die Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts beeinflusst die AP-1 Aktivität im malignen Melanom	34
4.2.2	Der Transkriptionsfaktor c-Jun interagiert mit monomerem $\alpha$ -Tubulin	37
4.2.3	$\alpha$ -Tubulin moduliert die c-Jun Expression und AP-1 Aktivität	39
4.2.4	$\alpha$ -Tubulin fungiert als Stabilisator des Transkriptionsfaktors c-Jun	40
4.2.5	Importin 13 vermittelt den c-Jun Kernimport im malignen Melanom	41
4.2.6	Die Importin 13/c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin Interaktion	43
4.2.7	Molekulare Funktion der c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin Interaktion <i>in vivo</i>	45
<b>4.3</b>	<b>Die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch microRNAs</b>	<b>47</b>
4.3.1	Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch miRNAs	47
4.3.2	Fehlregulation der miR-125b im malignen Melanom	47
4.3.3	Die miR-125b beeinflusst das proliferative und migratorische Potential von Melanomzellen <i>in vitro</i>	49
4.3.4	Inverse Korrelation der miR-125b und c-Jun Expression	50
4.3.5	Translational Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch die microRNA miR-125b	52
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Regulation der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie im malignen Melanom</b>	<b>56</b>
<b>5.2</b>	<b>E-Cadherin abhängige Regulationsmechanismen im malignen Melanom</b>	<b>56</b>
5.2.1	Die Bedeutung des Verlust von E-Cadherin und dessen Einfluss auf den Transkriptionsfaktor ETS-1 und die GTPase RhoC	57
5.2.2	Die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch den E-Cadherin abhängigen ETS-1/RhoC Signalweg	59
<b>5.3</b>	<b>Die regulatorische Funktion des Zytoskeletts im malignen Melanom</b>	<b>60</b>
5.3.1	Regulation von c-Jun durch Mikrotubuli	61
5.3.2	<i>Microtubule targeting drugs</i> (MTDs)	62
5.3.3	Tubulinmodifikationen und deren Bedeutung in der Tumorgenese	63
5.3.4	Die molekulare Funktion der c-Jun/Importin 13 Interaktion	64
<b>5.4</b>	<b>Die regulatorische Bedeutung von microRNAs im malignen Melanom</b>	<b>66</b>
5.4.1	Die Rolle der miR-125b im malignen Melanom	66
5.4.2	Die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch die microRNA miR-125b	67
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>69</b>
<b>6.1</b>	<b>Material</b>	<b>69</b>
6.1.1	Allgemeine Materialien	69

6.1.2	Geräte	71
6.1.3	Bakterien	72
6.1.4	Viren	73
6.1.5	Säugerzelllinien	73
6.1.6	Gewebeproben	73
6.1.6.1	Humane Gewebeproben	73
6.1.6.2	Murine Gewebeproben	73
6.1.7	Vektoren	74
6.1.8	Antikörper	76
6.1.9	Oligonukleotide	77
6.1.9.1	Oligonukleotide für EMSA	77
6.1.9.2	Oligonukleotide für Expressionsanalysen und Mutagenese	77
6.1.9.3	Oligonukleotide für miRNA Expressionsanalysen	79
6.1.9.4	siRNAs und miR Moleküle	79
6.1.10	Medien, Puffer/ Lösungen und Antibiotika	80
6.1.10.1	Medien	80
6.1.10.2	Puffer und Lösungen	80
6.1.10.3	Antibiotika	83
<b>6.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>84</b>
6.2.1	Arbeiten mit Escherichia coli	84
6.2.1.1	Kultivierung von E. coli	84
6.2.1.2	Transformation von E.coli	84
6.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA	84
6.2.2	Nukleinsäureanalytik	85
6.2.2.1	Polymerase -Ketten- Reaktion (PCR)	85
6.2.2.2	Quantitative Echtzeit PCR	86
6.2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese zur DNA- Auftrennung	87
6.2.2.4	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	88
6.2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	88
6.2.2.6	Isolierung von RNA aus Säugetierzellen	88
6.2.2.7	Reverse Transkription	88
6.2.2.8	miRNA in situ Hybridisierung	89
6.2.3	Arbeiten mit Radioaktivität	89
6.2.3.1	Herstellung von radioaktiv markierten EMSA Proben	89
6.2.3.2	Reinigung radioaktiv markierter Oligonukleotide	89
6.2.3.3	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	89
6.2.4	Proteinanalytik	90
6.2.4.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten	90

6.2.4.2	Präparation von Kernproteinen _____	90
6.2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Gesamt- und Kernproteinen _____	91
6.2.4.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) _____	91
6.2.4.5	Western Blot _____	92
6.2.4.6	Ko-Immunpräzipitation _____	92
6.2.4.7	Microtubuli Spin down Assay _____	93
6.2.4.8	Immunfluoreszenz _____	93
6.2.4.9	Immunhistologie _____	93
6.2.5	Zellkulturmethoden _____	94
6.2.5.1	Kultivierung von humanen Melanomzellen und normalen humanen Melanozyten _____	94
6.2.5.2	Transiente und stabile Transfektion von humanen Zellen _____	94
6.2.5.3	Luziferase Reporter Gene Assay _____	95
6.2.5.4	Proliferations Assay (XTT) _____	96
6.2.5.5	Migrations-Assay (Boyden Kammer) _____	96
6.2.6	Arbeiten mit Mäusen _____	97
6.2.7	Statistik _____	97
<b>7</b>	<b><i>Eigene Publikationen</i></b> _____	<b>98</b>
<b>8</b>	<b><i>Anhang</i></b> _____	<b>98</b>
<b>8.1</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> _____	<b>98</b>
<b>8.2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> _____	<b>113</b>
<b>8.3</b>	<b>Danksagung</b> _____	<b>116</b>

## 1 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein vom melanozytären Zellsystem ausgehender bösartiger Tumor, der sich überwiegend in der Haut manifestiert. Im Verhältnis zur Tumormasse liegt eine frühe Tendenz zur Metastasierung und folglich eine ungünstige Prognose vor. Demnach besteht eine große Notwendigkeit, die molekularen Mechanismen der Entstehung und Progression des Melanoms aufzuklären, um zukünftig bessere Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Die Melanomentstehung und -progression ist charakterisiert durch die Entartung von Melanozyten durch verschiedene Gendefekte, de-regulierte Signalwege und Transkriptionsfaktoren. Dabei erwerben die Zellen bestimmte Eigenschaften, die sie folglich als Tumorzellen auszeichnen: erhöhte Proliferationsrate, Verlust von Tumor- Suppressoren, Erwerb invasiver und metastasierender Eigenschaften, replikative Immortalität und vermehrte Angiogenese und Apoptose- Resistenz. An diesem Prozess der Tumorentwicklung spielen verschiedene Moleküle eine entscheidende Rolle. In diesem Zusammenhang stehen Signalwege und Transkriptionsfaktoren im Fokus meiner Analysen.

Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression auf transkriptioneller Ebene. Durch die Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren erfolgt eine De-Regulation mehrerer spezifischer Zielgene, was gravierende funktionelle Veränderungen nach sich ziehen kann. Anormale Transkriptionsaktivität und die damit verbundene veränderte Genexpression kann somit unter Umständen zu einem malignen Zelltyp führen.

Die AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie konnten als eine der wichtigsten bezüglich des malignen Melanoms identifiziert werden und setzt sich aus verschiedenen Subfamilien zusammen. (z.B. Jun und Fos). Die Jun Subfamilie besteht aus den Mitgliedern c-Jun, JunB und JunD, zur Fos Subfamilie zählen c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2. Die AP-1 Aktivität spielt im Rahmen der Tumorgenese eine essentielle Rolle. AP-1 Mitglieder besitzen eine *basic leucin zipper* Domäne (bZIP), eine DNA-Bindedomäne und eine Transaktivierungsdomäne. AP-1 Transkriptionsfaktoren können nur als Homo- oder Heterodimere aktiv werden.

Im Rahmen dieser Arbeit stand das AP-1 Mitglied c-Jun und dessen Regulation und Funktion im malignen Melanom im Fokus der Analysen Die Regulation von c-Jun erfolgt zum einen posttranskriptionell durch zahlreiche physiologische und pathologische Stimuli. Dabei kann es sich um Zytokine, Wachstumsfaktoren, Stress- Signale oder onkogene Stimuli handeln. Des Weiteren ist c-Jun das wichtigste Substrat des JNK (Jun-N-terminal Kinase) Signalweges und auch konstitutiv aktives ERK führt zu einer Stabilisierung von c-Jun im Melanom. Das Zell-Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin ist ein weiterer wichtiger Regulator von c-Jun und spielt bei der Interaktion von



Keratinocyten- Keratinocyten oder Keratinocyten- Melanozyten eine Rolle. Durch den Verlust von E-Cadherin kommt es zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), wodurch die Zellen migratorisches Potential erlangen und die Basalmembran passieren können. Folglich kommt es zum unkontrollierten Melanozytenwachstum, welches wiederum zur Tumorentstehung führt. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun durch den Verlust von E-Cadherin auf Proteinebene stabilisiert wird.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass im malignen Melanom neben den bekannten Signalwegen JNK und ERK auch ein alternativer, E-Cadherin abhängiger Signalweg existiert. Dieser Signalweg führt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ETS-1 zur Expression der GTPase RhoC, welche wiederum die Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun steuert. Zudem konnte die regulatorische Funktion der Mikrotubuli auf den Transkriptionsfaktor c-Jun aufgeklärt werden. Diesbezüglich zeigte sich eine Interaktion zwischen c-Jun und monomerem  $\alpha$ -Tubulin, welche den Transkriptionsfaktor c-Jun stabilisiert. Diese Stabilisierung von c-Jun hat eine Steigerung der AP-1 Aktivität, AP-1-DNA Bindungsaktivität und c-Jun Akkumulation im Kern zur Folge. Darüberhinaus konnte Importin 13 als Mediator des c-Jun Kernimports im malignen Melanom identifiziert werden, welches ebenfalls eine Interaktion mit c-Jun und  $\alpha$ -Tubulin aufweist. Weitere Analysen bestätigten, dass diese detektierte Interaktion zwischen c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin/Importin 13 von allen drei Faktoren und der *Nuclear Localization Sequence* (NLS) von c-Jun abhängig ist.

Durch weitere Analysen konnte eine miRNA identifiziert werden, die miR-125b, welche den Transkriptionsfaktor c-Jun und damit die AP-1 Aktivität im Melanom durch direkte Bindung in der kodierenden Region der c-Jun mRNA posttranskriptionell reguliert. Die miR-125b und c-Jun Expression korrelieren im malignen Melanom invers. Nach miR-125b Re-Expression in Melanomzellen konnte eine Verringerung des proliferativen und migratorischen Potentials detektiert werden.

Demnach konnten im Rahmen dieser Promotionsarbeit verschiedene molekulare Mechanismen der c-Jun Regulation im malignen Melanom detektiert und aufgeklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in nachfolgender Graphik gemeinsam mit bereits bekannten Regulationsmechanismen von c-Jun nochmals dargestellt (Abbildung 1.1)(Kappelmann, et al. 2013a).

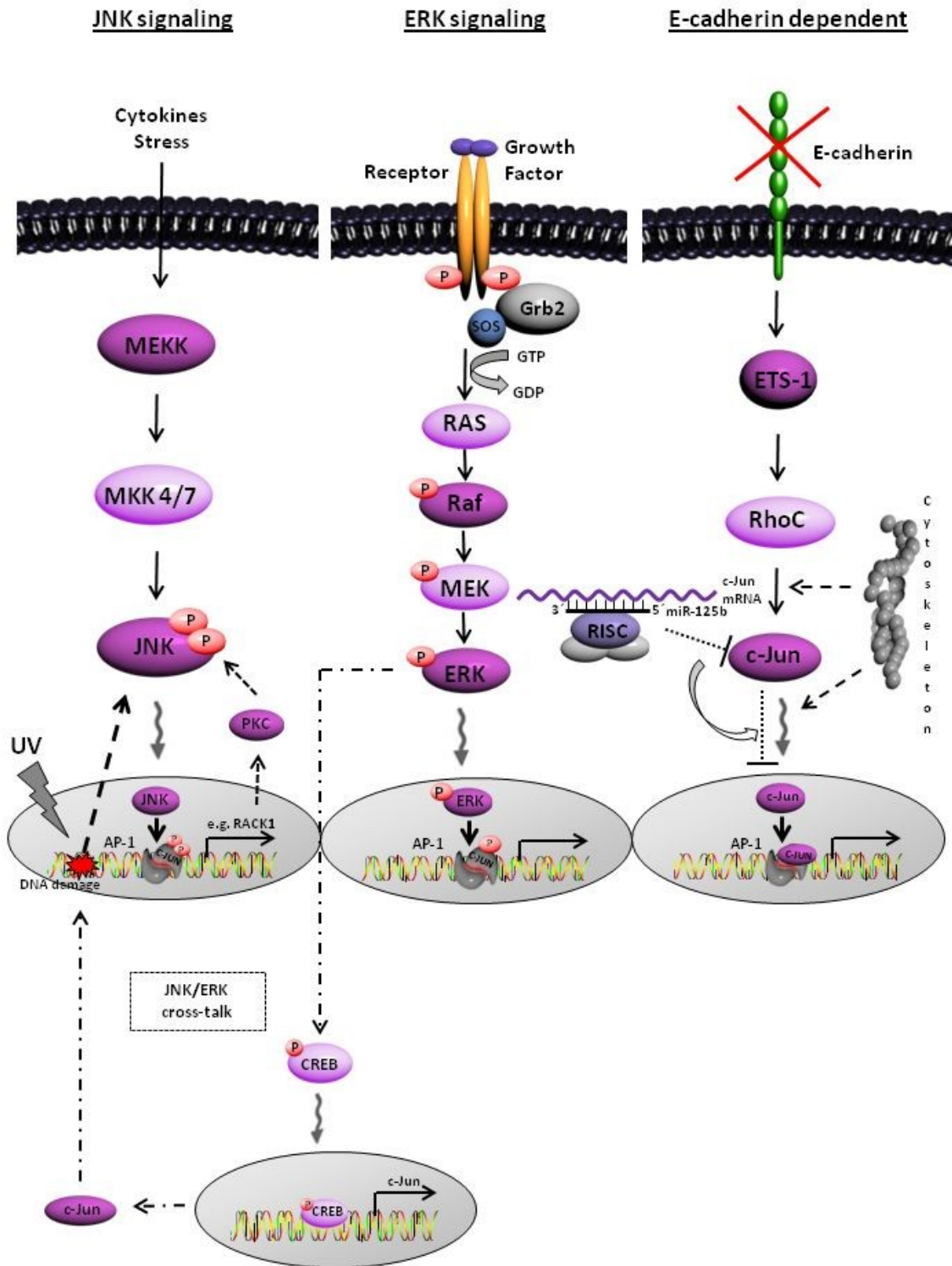


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Regulationsmechanismen von AP-1/c-Jun Transkriptionsfaktoren im malignen Melanom (Kappelmann, et al. 2013a).

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Haut - Struktur und Aufbau

Die Haut (Cutis) stellt mit einer Fläche von 1,6-2,0 m<sup>2</sup> das größte Organ des menschlichen Körpers dar. Sie grenzt nicht nur den Körper von seiner Umgebung ab, sondern dient insbesondere als Schutz vor mechanischen Einwirkungen, Strahlen, Infektionen, erfüllt die Aufgaben der Thermoregulation, Sekretion und Exkretion und ist zudem ein wichtiges Sinnesorgan (Tastsinn, Schwersinn, Temperatursinn). Die Cutis besteht im Wesentlichen aus drei Schichten: der Epidermis, welche während der Embryonalentwicklung aus dem Ektoderm hervorgeht und der Dermis und Subcutis, welche vom Mesoderm abstammen (siehe zum Hautaufbau auch Abbildung 2.1). Die Basalmembran trennt dabei die epitheliale Epidermis von der bindegewebigen Dermis ab, welche wiederum an das subkutane Fettgewebe angrenzt.

Die Subcutis (Unterhaut, Tela subcutanea) besteht aus einzelnen Fettläppchen, die von Bindegewebssepten umhüllt sind, welche zum einen in die Dermis einstrahlen und zum anderen als Haltebänder mit den straffen Bindegeweben der Unterlage (z.B. Muskelfaszien etc.) verbunden sind. Die Fettläppchen dienen zugleich als Reservedepot für Fett- und Flüssigkeitsspeicherung. Zudem sind in dieser Schicht Talg- und Schweißdrüsen lokalisiert, die den Schutzfilm der Epidermis produzieren.

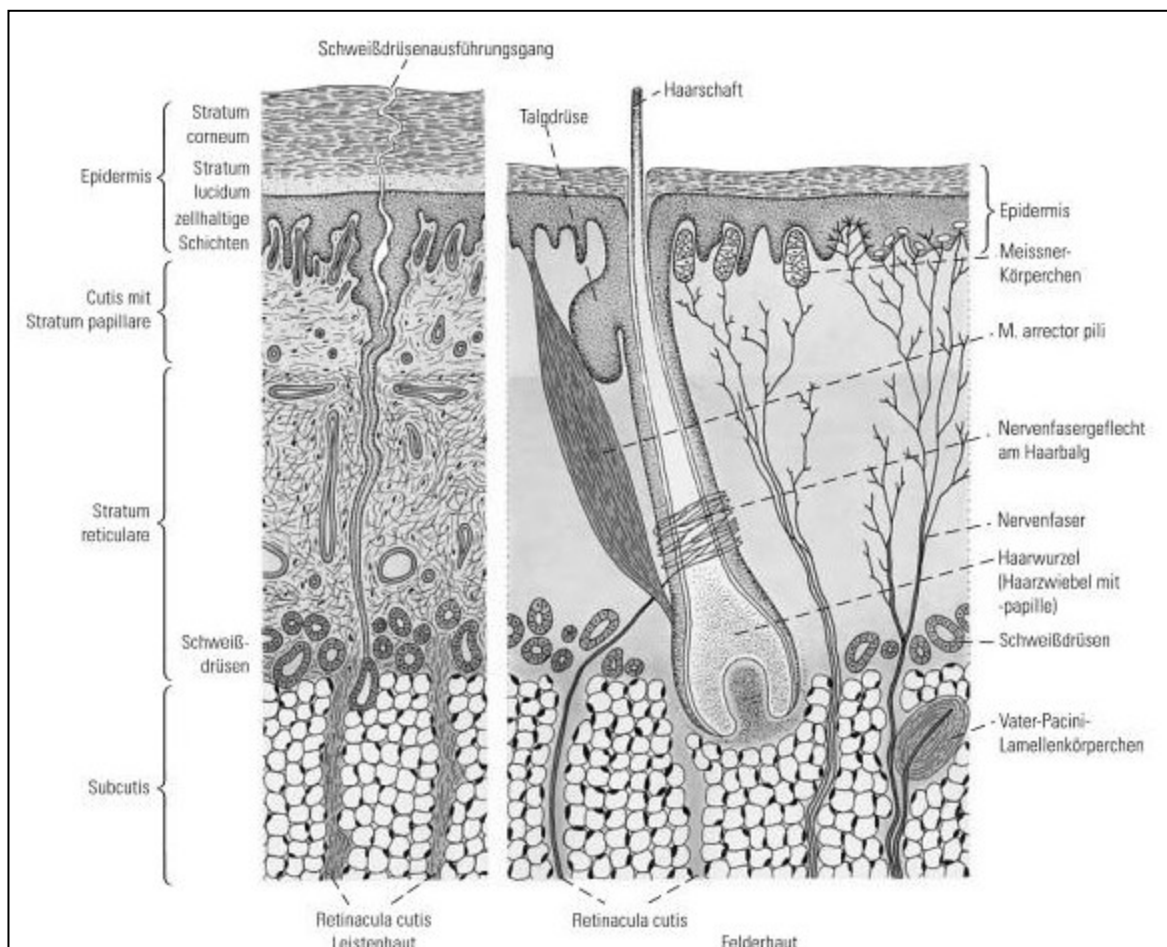
Die Dermis (Lederhaut, Corium) besteht aus dem epidermisnahen Stratum papillare und dem Stratum reticulare. Das Stratum papillare setzt sich aus einem relativ zellreichen, lockeren Bindegewebe zusammen. In diesem lockeren Geflecht aus kollagenen und elastischen Fasern verlaufen Blut- und Lymphgefäße und Nervenfasern, die zudem auch die Epidermis versorgen. Das Stratum reticulare hingegen ist zellärmer und besteht aus groben Bündeln kollagener und elastischer Fasern, die entsprechend der Zugbelastung der Dermis ausgerichtet sind.

Die Basalmembran setzt sich aus der Basallamina und der Lamina reticularis zusammen. Sie beeinflusst die Zelldifferenzierung und -polarität und hat zudem eine wichtige Stützfunktion. Die Basallamina enthält Proteoglycane, Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin, wohingegen die Lamina reticularis aus einem dichten Netzwerk retikulärer Kollagenfasern aufgebaut ist.

Die Epidermis (Oberhaut) setzt sich aus dem Stratum basale (Basalzellschicht), dem Stratum spinosum (Stachelzellschicht), dem Stratum granulosum (Körnerschicht) und dem Stratum corneum (Hornschicht) zusammen. Sie enthält eine Vielzahl von spezialisierten Zellen, darunter vorwiegend Keratinozyten, die im Stratum basale als Basalzellen vorliegen. Binnen weniger Wochen schieben sich diese Keratinozyten Richtung Oberfläche über das Stratum spinosum und das Stratum granulosum, welches aus Zellen besteht, die in ihrem Zytoplasma Granula aus Keratohyalin enthält. Die abschließende Hautschicht stellt das Stratum corneum dar. Während

der Keratinisierung gehen die Zellen in Apoptose. In den oberen Lagen lösen sich die Kontakte der Desmosomen und tote Hornschüppchen schilfern ab. An Hand- und Fußfläche ist dem Stratum corneum ein Stratum lucidum untergeordnet. Das Stratum corneum ist hier besonders stark ausgebildet und an der Oberfläche sind Leisten zu erkennen (Leistenhaut; siehe Abbildung 2.1 links). Die restliche Epidermis bildet kein Stratum lucidum aus und wird auch Felderhaut genannt (siehe Abbildung 2.1 rechts).

Im Laufe der Embryogenese dringen aus der Neuralleiste stammende Melanoblasten in die Epidermis ein. Diese Melanoblasten sind unpigmentiert und differenzieren im Menschen erst nach ihrer Wanderung in die Epidermis zu pigmentbildenden Melanozyten. Mit dem Zeitpunkt der Geburt beginnen die ausdifferenzierten Melanozyten mit der Produktion von Melanin (Pigmentsynthese), welches sie an die umgebenden Keratinozyten über Melanosomen abgeben und diese somit vor schädlichen UV-Strahlen schützen. Die menschlichen Melanozyten sind in der Basalzellschicht lokalisiert und treten über dendritische Fortsätze mit den Keratinozyten der Epidermis in einem Zellverhältnis von 1:5 bis 1:10 in Kontakt. Die umgebenden Keratinozyten regulieren die Proliferation und Migration der Melanozyten (Hsu, et al. 2002).



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung des Aufbaus der Haut (Fanghänel J. 2003).

## 2.2 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein vom melanozytären Zellsystem ausgehender bösartiger Tumor, welcher sich überwiegend in der Haut (selten auch im Auge, an den Schleimhäuten und Hirnhäuten) manifestiert. In den meisten Fällen ist das Melanom stark pigmentiert. Im Verhältnis zur Tumormasse liegt eine frühe Tendenz zur Metastasierung und folglich eine ungünstige Prognose vor. Zudem zählt das maligne Melanom zu den hochinvasiven Tumorarten und ist weitgehend resistent gegen die aktuell angewandten Therapieverfahren (Johannessen, et al. 2010; Villanueva, et al. 2011).

### 2.2.1 Inzidenz und Risikofaktoren

Laut *WHO (World Health Organisation)* nimmt die Melanominzidenz in weißen Bevölkerungen weltweit zu (Mitteleuropa: 10–12 Fälle/ 100 000 Einwohner und Jahr; USA: 10–25 Fälle/ 100 000 Einwohner und Jahr; Australien: 50–60 Fälle/ 100 000 Einwohner und Jahr). Personen mit einer großen Anzahl von Pigmentmalen (Nävi; erworbene, angeborene und dysplastische Formen), hellem Hauttyp und genetischer Disposition (bei familiär gehäuften Auftreten) sind besonders gefährdet. Für das Jahr 2010 wurden 16.230 Neuerkrankungen prognostiziert. Das mittlere Erkrankungsalter von Frauen lag bei 58 und bei Männern bei 64 Jahren. Seit 1980 sind die Erkrankungsraten bei den Frauen altersstandardisiert um 270 %, bei den Männern um 210 % angestiegen. Schätzungsweise verdoppelt sich die Inzidenzrate des malignen Melanoms alle 10-20 Jahre (Garbe 2000), was neben den konstitutionellen Faktoren durch die steigende UV-Belastung zu erklären ist (MacKie, et al. 2009).

### 2.2.2 Melanom-Typen und Stadieneinteilung

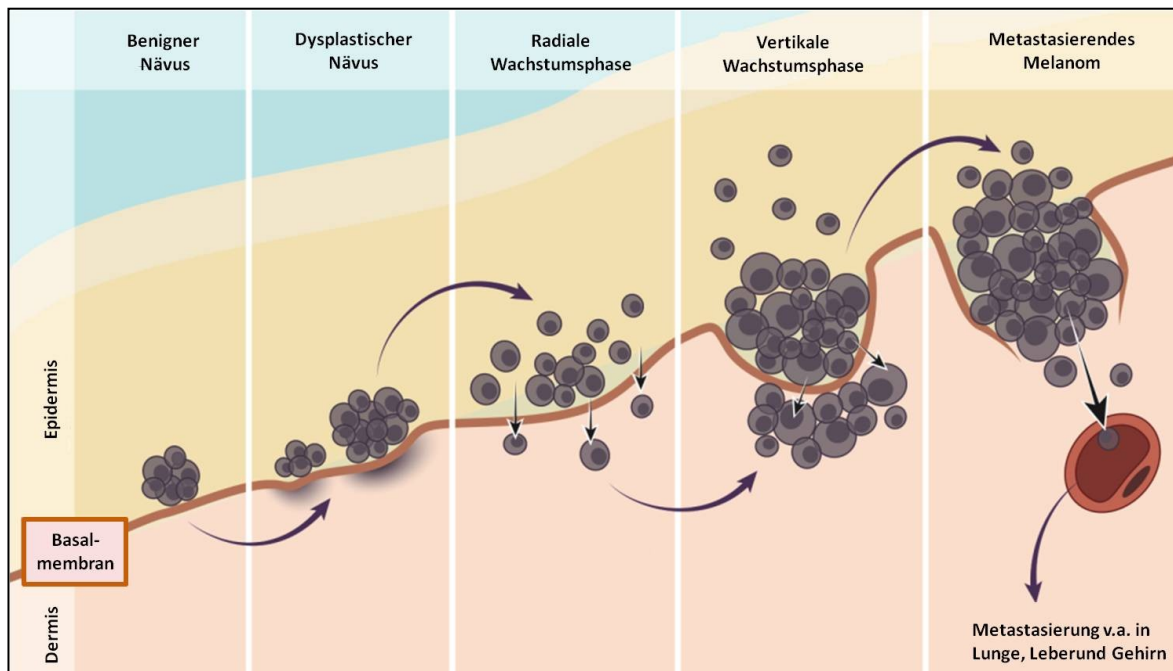
Klinisch und histopathologisch können vier verschiedene Melanom Typen unterschieden werden: Das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) und das akral-lentiginöse Melanom (ALM).

Das superfiziell spreitende Melanom ist mit einem relativen Anteil von ca. 60% aller Melanome am häufigsten und beginnt mit einer intraepidermalen horizontalen Ausbreitungsphase zunächst als Fleck, entwickelt sich dann horizontal invasiv mit farblicher Vielfalt. Es ist teils knotig und von der umgebenden gesunden Haut meist scharf abgegrenzt. Dieser Subtyp ist meist an Rücken, Brust und Extremitäten lokalisiert und ist bei frühzeitiger Diagnose mit einer guten Prognose assoziiert. Das primär noduläre Melanom macht in etwa 20% aller Melanome aus und ist ein primär knotiger, exophytischer, überwiegend schwarzbrauner, häufig erosiv-blutiger Tumor. Dieser Subtyp tritt vor allem am Rumpf und an den Extremitäten auf. Durch den hoch invasiven

Charakter des nodulären Melanoms, ist dieser Melanom Typ meist mit einer schlechten Prognose verbunden. Das Lentigo-maligna-Melanom entsteht oft erst nach vielen Jahren aus einer Lentigo maligna (*In-situ*-Melanom) und macht etwa 10% aller Melanome aus. LLM ist charakterisiert durch mehrere Zentimeter große und flache Herde und wächst demnach sehr lange horizontal. Es kommt nahezu ausschließlich im Gesichtsbereich älterer Patienten vor und ist meist mit einer guten Prognose verbunden. Das akral-lentiginöse Melanom stellt den häufigsten Subtyp der Melanome bei dunkelhäutigen Menschen dar und macht etwa 5% aller Melanome aus. Es entwickelt sich im Bereich der Handflächen, Fußsohlen und unter den Nägeln. In seiner intraepidermalen Frühphase zeichnet es sich oft durch unscharf begrenzte und inkohärente Pigmentierung aus. Erst später auftretende knotige Anteile signalisieren das invasive Wachstum dieses Melanomtyps. In seiner Erscheinung ähnelt das ALM dem LMM sehr stark, ist jedoch wesentlich aggressiver und je nach Lokalisation des Melanoms mit einer schlechten Prognose verbunden. Einige Melanom Typen sind nicht klassifizierbar oder sind Mischformen. Solche klinischen Sonderformen sind z. B. amelanotische Melanome sowie Schleimhaut- oder andere extrakutane Melanome, die etwa 5% aller Melanome ausmachen.

Die verschiedenen Melanom Typen können je nach ihrer fortgeschrittenen Entwicklung des Weiteren in offiziell anerkannte Stadien eingeteilt werden. Im Wesentlichen handelte es sich dabei um ein klinisches *Staging* mit dessen Hilfe Tumorpatienten definierten Risikogruppen im Hinblick auf den Krankheitsverlauf zugeordnet werden können. Nachdem die klassischen Untersuchungen zum *Microstaging* publiziert worden waren (Breslow 1970; Clark, et al. 1984; Clark, et al. 1991; Clark and Mihm 1969), wurden histopathologische Kriterien von dem *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) autorisiert. Für das maligne Melanom wurde vom AJCC 2009 eine TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung vorgeschlagen, die auch von der Union Internationale *Contre le Cancer* (UICC) akzeptiert worden ist. Diese Klassifikation der Entstehung und Progression des malignen Melanoms basiert auf einer Gliederung histopathologischer Merkmale in 5 Phasen (Clark, et al. 1984; Clark, et al. 1991). Demnach entwickeln sich Melanozyten in mehreren Stufen in Richtung eines malignen Phänotyps, wobei die erste Stufe normale, angeborene (kongenitale) oder erworbene Nävi umfasst. Diese Gruppe zählt zu den gutartigen (benignen) Neoplasien und entsteht durch Proliferation normaler Melanozyten (siehe auch Abbildung 2.2). Individuen mit verhältnismäßig wenigen gewöhnlichen Nävi (0-15) haben ein wesentlich geringeres Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken, als Individuen mit einer großen Anzahl an Nävi (100-120). Jedoch ist es nicht zwangsläufig, dass solch benigne Hautveränderungen zu der Entwicklung eines malignen Melanoms führen. Die zweite Stufe umfasst die Vorläufer des malignen Melanoms, die dysplastischen Nävi, welche zum einen aus normaler, unauffälliger Haut oder aus normalen, bereits vorhandenen Nävi entstehen können. In

den meisten Fällen sind dysplastische Nävi im Durchmesser grösser als 5mm, asymmetrisch und weisen in geringem Ausmaß erhabene Anteile auf. Zudem zeichnen sie sich durch eine unkontrollierte intraepidermale Proliferation auf. Die darauffolgende Stufe der Melanomentwicklung stellt das erste maligne Stadium dar, in welchem sich die Tumorzellen in der radialen Wachstumsphase (*radial growth phase*, RGP) befinden. In dieser Phase zeichnen sich die Zellen des Primärtumors durch die horizontale Ausbreitung in der Epidermis aus. Jedoch weisen diese Zellen in diesem Stadium noch eine geringe Invasivität auf. In der darauffolgenden vertikalen Wachstumsphase (*vertical growth phase*, VGP) durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran, sind hoch invasiv und erlangen bereits die Fähigkeit zur Metastasierung. Das anschließende Stadium des metastasierenden Melanoms, umfasst Melanomzellen, welche sich sowohl über die Blutbahn als auch das Lymphgefäßsystem im gesamten Körper ausbreiten. Derzeit kommen etwa 90% aller malignen Melanome als Primärtumor ohne erkennbare



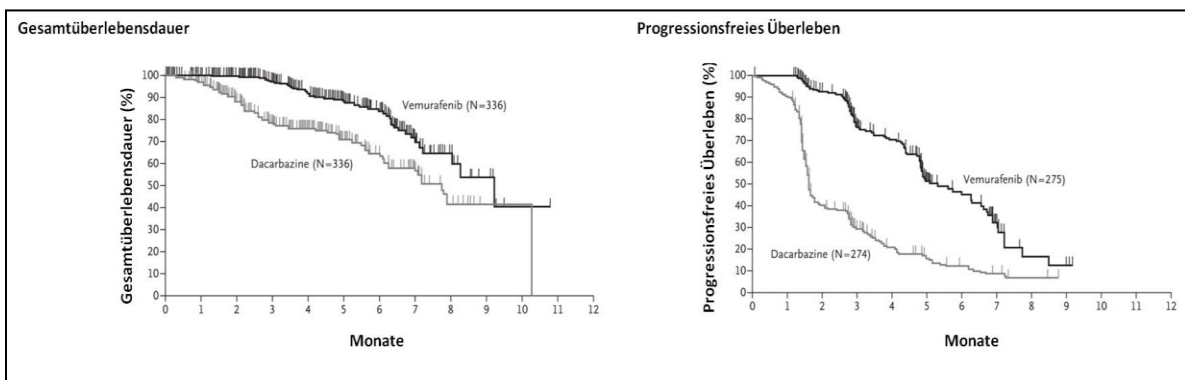
**Abbildung 2.2: Die Progression des malignen Melanoms** (modifiziert nach Miller and Mihm 2006).

Metastasierung zur ersten Diagnose. Die wichtigsten prognostischen Faktoren beim primären malignen Melanom ohne Metastasen sind die vertikale Tumordicke nach *Breslow* am histologischen Präparat, das Vorhandensein einer histologisch erkennbaren Ulzeration und das Invasionslevel nach *Clark*. Bezüglich des malignen Melanoms stellt der Grad der Metastasierung einen wichtigen Prognose-Faktor dar. Das maligne Melanom kann sowohl primär lymphogen als auch primär hämatogen metastasieren. Demnach kann eine regionäre Metastasierung durch Satelliten-Metastasen (bis 2 cm um den Primärtumor), lokale Rezidive nach Entfernung des

Primärtumors, In-transit-Metastasen (in der Haut bis zur ersten Lymphknoten-Station) und regionäre Lymphknotenmetastasen diagnostiziert werden. Nach gesicherter Melanomdiagnose entscheidet sich der entsprechende Therapieansatz, wobei eine kurative Behandlung durch operatives Entfernen des Melanoms nur im klinischen Stadium I möglich ist. Fortgeschrittene Tumore in den Stadien II-V sind weitestgehend resistent gegenüber den konventionellen Chemo- und Radiotherapien. Dennoch konnten durch die medizinische Forschung in den letzten Jahren neue, vielversprechende Therapieansätze entwickelt werden.

### 2.2.3 Melanom-Therapie

Melanome im Stadium I werden primär operativ entfernt. Die operative Therapie in metastasierten Stadien wird oft mit einer adjuvanten Therapie (Interferon-alpha) gekoppelt, aber auch die Verbindung von Bestrahlung mit Hyperthermie (Thermoradiotherapie) kann eine sinnvolle therapeutische Option darstellen. Für die systemische Monotherapie (Chemotherapie) des fortgeschrittenen Melanoms stehen mehrere Substanzen zur Verfügung mit vergleichbarer klinischer Wirkung (z.B. Dacarbazin, Temozolomid, Fotemustin, Vindesin, Interferon-alpha, Interleukin-2). Des Weiteren werden auch Polychemotherapien und Chemoimmuntherapien zur



**Abbildung 2.3:** Gesamtüberlebenszeit (links) und progressionsfreie Überlebenszeit (rechts) von Melanompatienten mit BRAF V600E Mutation nach Vemurafenib Behandlung (Chapman, et al. 2011) im Vergleich zu Dacarbazine behandelten Patienten.

Behandlung des fortgeschrittenen malignen Melanoms eingesetzt. Jedoch sind alle zur Verfügung stehenden Therapieoptionen mit einem schlechten Ansprechen verbunden. Bis zum Jahre 2010 galt für Patienten beim Eintritt in Stadium IV eine mediane Überlebensrate von 9 Monaten, begleitet von einem hohen Chemoresistenz-Grad. Der Entdeckung der aktivierenden Mutation der Serin/Threonin Kinase BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*; BRAF V600E) in 50%-60% der Melanome (superfiziell spreitendes Melanom) im Jahre 2002 (Davies, et al. 2002) folgte die Entwicklung der zielgerichteten molekularen Therapie. Im August 2011 resultierten die medizinischen Forschungsergebnisse in der Bewilligung des BRAF Inhibitors Vemurafenib als



Medikament gegen und metastasierende maligne Melanome, welche die BRAF V600E Mutation tragen (Chapman, et al. 2011). Diese Vemurafenib Behandlung resultierte in einer verbesserten, progressionsfreien Gesamtüberlebenszeit bei zuvor unbehandelten Patienten mit dieser Mutation (Gesamtüberleben 5 Monate nach Vemurafenib Behandlung: 84%; Gesamtüberleben 5 Monate nach Dacarbazin Behandlung: 64%) (Abbildung 2.3). Jedoch entwickelten die Patienten nach/während der Behandlung Rezidive, wahrscheinlich durch Tumorzellen, die nach einer gewissen Zeit der Behandlung eine Resistenz gegen das Medikament entwickelten (Sosman, et al. 2012).

Seit der Entdeckung der BRAF V600E Mutation und der vielversprechenden Wirkung des BRAF Inhibitors Vemurafenib in der Melanom-Therapie, erhielt die Entwicklung zielgerichteter molekularer Therapieansätze eine zentrale Rolle in der Tumorthherapie. Es folgt die Entwicklung weiterer Inhibitoren gegen Onkogene, welche in Melanozyten aktiviert werden und somit wesentlich zur Transformation der Melanozyten und somit zur Tumorentstehung beitragen (MEK-Inhibitoren, Multikinase-Inhibitoren, KIT-Inhibitoren) (Flaherty, et al. 2012; Guo, et al. 2011; Hauschild, et al. 2012).

### **2.3 Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung und Progression**

Die genauen molekularen Mechanismen der Melanomentstehung sind weitestgehend ungeklärt, jedoch zeigte sich eine Korrelation zwischen der Entwicklung von Melanomen und erhöhter UV-Belastung der Haut (besonders UV-B). Durch UV-Strahlung werden sogenannte *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), welche vor allem den Schutzmechanismus der Haut beeinträchtigen und somit das Risiko am malignen Melanom zu erkranken erhöhen. UV-Strahlung verursacht genetische Veränderungen der DNA von Keratinozyten und Melanozyten in der Haut, schwächt das kutane Immunsystem, fördert eine verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren (Berking, et al. 2001; Halaban 1996) und induziert die Ausbildung DNA-schädigender reaktiver Sauerstoffspezies. Dadurch wird die Melanominitiation- und progression stark begünstigt. (Gilchrest, et al. 1999; Thompson, et al. 2005). Im Verlauf der frühen Melanomentwicklung erlangen die Melanozyten die Fähigkeit stärker zu proliferieren und der Zell-Zyklus Kontrolle weitestgehend zu entkommen, indem sie sich von den Keratinozyten ablösen. Dieser Prozess ist auf den Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin zurückzuführen (Haass and Herlyn 2005). Des Weiteren führen aktivierende Mutationen oder Translokationen zur Überexpression von Tumor fördernden Genen (Onkogene), aber auch die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen durch Deletionen oder Promotor-Hypermethylierungen hat eine pro-onkogene Wirkung. Diese Faktoren sind an die Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Zellzyklus-

Kontrolle, Zellpolarität, Apoptose und Motilität der Zellen beteiligt. Deren Fehlregulation geht meist mit der Aktivierung vieler Melanom-relevanter Signalwege (MAPK, PI3K) einher (Polsky and Cordon-Cardo 2003).

Im Folgenden werden einige, für diese Arbeit relevante Onkogene und Tumorsuppressor-Gene, sowie die jeweiligen Signalwege, genauer erörtert.

### **2.3.1 Adhäsionsmoleküle**

Epitheliale Zellverbände haben die Aufgabe Organe und Gewebe gegen deren äußere Umgebung abzugrenzen. Demnach nimmt die Haut in diesem Zusammenhang eine besondere Stellung ein, da sie eine Barriere zwischen dem gesamten Organismus und seiner Umwelt darstellt. Epitheliale Zellen bestimmen nicht nur die Gewebs- und Organarchitektur, sondern regulieren auch dynamische Prozesse der Morphogenese während der Embryonalentwicklung. Zudem vermitteln epitheliale Zellen über Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle den Kontakt der Zellen untereinander und die Adhärenz der Zellen an die extrazelluläre Matrix (ECM) (Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle) (Johnson 1999). Melanozyten bilden vielfältige Kontakte zu den umliegenden Keratinozyten aus, welche wiederum das Melanozytenwachstum und die Expression von Zelloberflächen-Rezeptoren kontrollieren. Die maligne Progression ist charakterisiert durch den Verlust (z.B. E-Cadherin, P-Cadherin, Desmoglein, Connexin) oder die Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen, was die Tumorzellen dazu befähigt sich aus dem bestehenden Zellverband abzulösen. Dabei exprimieren die Tumorzellen Adhäsionsmoleküle (Integrine, Cadherine, u.a.), die an Bestandteile der ECM binden können und somit die Infiltration bindegewebiger Strukturen gewährleisten (Hsu, et al. 2000). In Folgendem werden Struktur und Funktion von Adhäsionsmolekülen genauer erläutert, welche bei der Transformation von normalen Melanozyten zu Melanomzellen eine wesentliche Rolle spielen.

#### **2.3.1.1 Klassifizierung der Cadherine**

Die Tumorentwicklung wird insbesondere durch die Kommunikation zwischen Melanom-Vorläuferzellen, malignen Tumorzellen und umgebenden Zellen beeinflusst. Daher sind Adhäsionsmoleküle für die Reaktion von Zellen und Gewebe auf äußere Stimuli essentiell. So können sie direkt Stresssignale verarbeiten und weiterleiten. Über 80 Proteine zählen zur Cadherin-Familie und können wie folgt eingeteilt werden: die klassischen adhärennten Cadherine (z.B. E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin), die desmosomalen Cadherine (z.B. Desmocollin, Desmoglein) und die nichtklassischen Cadherine (Protocadherine, H-Cadherin, Cadherin-ähnliche

Moleküle) (Suzuki 1996). Auf der Aminosäureebene beträgt die Homologie zwischen E-, P- und N-Cadherin etwa 50%. Diese Cadherine gehen meist homophile Bindungen ein, d.h. E-Cadherin bindet nur an E-Cadherin, nicht aber an P- oder N-Cadherin (Wagener and Müller 2010). In endodermalen- und von diesen abstammenden Tumorzellen ist E-Cadherin jedoch darüberhinaus dazu befähigt Heterodimere mit N-Cadherin zu bilden (Straub, et al. 2011). Diese multifunktionalen Transmembran-Proteine erhalten Zell-Zell-Kontakte aufrecht, treten mit dem Aktin-Zytoskelett in Kontakt und beeinflussen die intrazelluläre Signalweiterleitung (Bex and van Roy 2009).

### **2.3.1.2 Bedeutung der E-Cadherin Expression in der Melanomentstehung**

Im Rahmen dieser Arbeit spielt das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin eine zentrale Rolle und wird in folgendem Kapitel genauer beschrieben.

E-Cadherin ist ein Glykoprotein von 120kDa und vermittelt die Zelladhäsion nur in Anwesenheit von Kalzium-Ionen. Zu diesem Zweck besitzt es charakteristische Kalzium-bindende Aminosäuremotive. Des Weiteren wird es bereits in der Embryonalentwicklung im Blastomer-Stadium exprimiert und dient es als epithelialer Marker normaler Melanozyten.

Der Verlust von E-Cadherin in verschiedenen malignen Tumoren (Mamma-, Kolon- und Prostatakarzinom) kann durch diverse Mechanismen ausgelöst werden, welche Mutationen, epigenetische Stilllegung, verstärkte Endozytose und Proteolyse umfassen (Bex and van Roy 2009).

Epitheliale Tumore verlieren das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin (Epitheliales-Cadherin, früher auch als Uvomorulin bezeichnet) im Verlauf Ihrer Entwicklung teilweise oder zur Gänze, wodurch sich die Melanozyten von den Keratinozyten ablösen und abwandern. Dieser Prozess wird epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) genannt. In der normalen Haut transportieren die Melanozyten über ihre zahlreichen Dendriten Melanosomen, die mit Melanin gefüllt sind, zu etwa 36 Keratinozyten. Das Melanin schützt dabei die Keratinozyten, welche in der Epidermis die erste Barriere gegen äußere Einflüsse darstellen, vor UV-Strahlung. Dabei stellt das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin den Kontakt zwischen Keratinozyten und Melanozyten.

Auch im malignen Melanom konnte in immunhistochemischen Studien ein Verlust des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin gezeigt werden (Silye, et al. 1998). Damit geht die in einigen Studien gezeigte anti-invasive und anti-metastatische Wirkung des E-Cadherin Moleküls verloren, was zu einem malignen Phänotyp der Tumorzellen führt (Perl, et al. 1998; Vleminckx, et al. 1991).

Die intrazelluläre Domäne der E-Cadherine ist mit einem  $\beta$ -Catenin beinhaltenden Komplex assoziiert, welcher das E-Cadherin mit Aktin Filamenten verbindet. Einige Signalwege (z.B. WNT

Signalweg) haben ein Ablösen von  $\beta$ -Catenin vom Adhäsionskomplex zur Folge und dieses freie  $\beta$ -Catenin ist wiederum zur Signaltransduktion in den Nukleus befähigt. Der Verlust von E-Cadherin fördert folglich die Interaktionen zwischen Melanomzellen und ihrer Umgebung und verändern die Signalwirkung von  $\beta$ -Catenin (Bienz 2005; Gottardi and Gumbiner 2001).

Durch den Verlust der E-Cadherin Expression durch seinen Repressor Snail geht auch der regulatorische Einfluss der Keratinozyten auf die Melanozyten verloren und es kommt zur N-Cadherin Expression (Poser, et al. 2001). Dies befähigt die Melanomzellen, an die Fibroblasten des Stromas sowie an Endothelzellen und weitere Zelltypen der Dermis zu binden, welche ebenfalls N-Cadherin an ihrer Zelloberfläche exponieren (Li, et al. 2001). Durch die N-Cadherin Expression erlangen die Melanomzellen die Fähigkeit zu migrieren, werden invasiver und gehen nicht in Apoptose (Sanders, et al. 1999).

Es konnte bereits eine regulatorische Funktionen des Verlusts von E-Cadherin im malignen Melanom detektiert werden. Zum einen besteht eine Korrelation zwischen der konstitutiven Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und der E-Cadherin Expression im malignen Melanom (Kuphal, et al. 2004). Des Weiteren konnte eine Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch E-Cadherin nachgewiesen werden (Spangler, et al. 2011).

### **2.3.2 Das Zytoskelett**

Neben der zentralen Funktion von E-Cadherin kommt auch dem Zytoskelett eine besondere Rolle im Rahmen meiner Analysen zu.

Das Zytoskelett ist ein zytoplasmatisches Netzwerk, welches aus drei wesentlichen Bestandteilen aufgebaut ist: aus Mikrotubuli, Aktin- und Intermediärfilamenten. Diese Bestandteile sind sowohl für die Zellform und -stabilität, als auch für die Mechanik der Zelle verantwortlich. Zudem fungiert das Zytoskelett auch als Transportsystem für intrazelluläre Prozesse (Fletcher and Mullins 2010). Die Mikrotubuli sind das stabilste der drei Polymere und zeichnen sich durch ihren komplexen, dynamischen Auf- und Abbau aus. Diese Dynamik der Mikrotubuli kommt durch das regulierte Gleichgewicht zwischen Polymerisation der  $\alpha$ -/ $\beta$ -Dimere des Tubulins zu Mikrotubuli und der Depolymerisation der Fasern zustande. Mikrotubuli übernehmen in vielfältigen zellulären Prozessen wichtige Funktionen. Sie sind für die gleichmäßige Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen in der Anaphase der Mitose, die Lokalisation der Zellorganellen und die Erhaltung der Zellstruktur verantwortlich (Verhey and Gaertig 2007).

Die Aktinfilamente (F-Aktin: filamentöses Aktin) sind zweisträngige helikale Polymere, die aus Aktinuntereinheiten (G-Aktin, globuläres Aktin) aufgebaut sind. In der Zelle kommen sie in verschiedenen Strukturen (linear, dreidimensional) vor und sind vorwiegend für die Motilität der

Zelle verantwortlich. Die Organisation des Aktin-Zytoskeletts wird über RhoGTPasen bestimmt, welche das Zytoskelett durch Übertragung extrazellulärer Signale umstrukturieren und damit die Zellmorphologie verändern. Des Weiteren steuern die RhoGTPasen die Zellmotilität, -polarität, -aggregation und -kontraktion (Hall 2009; Takai, et al. 2001) und regulieren die Genexpression (Marinissen, et al. 2001).

### **2.3.3 Funktion der RhoGTPasen**

In dieser Arbeit spielen die RhoGTPasen (Guanin Nukleotid bindende Proteine) eine wesentliche Rolle, da sie an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind und werden deshalb genauer erörtert.

GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, Cdc42) wechseln zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen, und einem inaktiven, GDP-gebundenen Status. Sogenannte Guanin Nukleotid Austausch Faktoren (*Guanin Nukleotide Exchange Factors*: GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) kontrollieren die Aktivität der Rho-Proteine. Dabei aktivieren die GEFs die GTPasen, wohingegen die GAPs die Hydrolyse von GTP zu GDP fördern und damit für den inaktiven Zustand der GTPasen verantwortlich sind. In Zellen liegen vorwiegend an GDI (*GDP dissociation inhibitors*) gebundene und damit inaktive GTPasen vor (Wagener and Müller 2010). Die Aktivierung der GTPasen zieht eine Bindung an die Effektormoleküle Dia und Rock nach sich. Die Aktivierung von Dia führt in der Zelle zur Aktinpolymerisation, zur Lokalisation von E-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin an der Zellperipherie und zur Bildung von stabilen *Adherens Junctions*. Des Weiteren werden die Mikrotubuli organisiert, was zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Zellverbindungen führt. Wird hingegen Rock durch RhoGTPasen aktiviert, so kommt es zur Kontraktion von Actomyosin und Zell-Zell-Verbindungen werden zerstört (Sahai and Marshall 2002b). Die Intermediärfilamente stellen das dritte Polymer des Zytoskeletts dar und setzen sich aus monomeren Intermediärfilament-Proteinen zusammen. Dabei bilden sie seilartige Fasern mit einer stabförmigen Domäne in der Mitte (konservierte Struktur). Sie geben der Zelle mechanischen Halt, indem sie z.B. Zugkräfte aufnehmen, die auf Epithelzellen wirken (Flitney, et al. 2009).

#### **2.3.3.1 Rolle des Zytoskeletts in der Tumorentstehung**

Die molekulare Funktion des Zytoskeletts in der Tumorentstehung umfasst ein breites Spektrum. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit auf drei tumorrelevante Aspekte genauer eingegangen werden, bei denen das Zytoskelett eine wesentliche Rolle spielt: der Zellzyklus, die Morphogenese und die Migration. Die Mitose beinhaltet einige *Checkpoint*-Signalwege, welche garantieren, dass die Chromosomenaufteilung auf die Tochterzellen nur nach korrekter Anordnung der

Chromosomen in der Metaphase erfolgt. Dies wird durch die Mikrotubuli bewerkstelligt. Eine fehlerhafte Aufteilung der Chromosomen führt zu Aneuploidie, eine numerische Chromosomenabberation, die in vielen verschiedenen Tumorarten beobachtet werden kann (Ganem, et al. 2007). Das Zytoskelett beeinflusst ebenfalls die Morphogenese der Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass epitheliale Zellen während der Tumorprogression morphologische Veränderungen aufweisen. Diese stehen oft mit dem Verlust von Adhäsionsmolekülen (z.B. E-Cadherin), einem mesenchymalem Phänotyp, einer dysplastischen Morphologie und einer erhöhten Invasivität der Zellen in Zusammenhang (Yang and Weinberg 2008). Auch die Migration von Zellen wird durch Veränderungen des Zytoskeletts beeinflusst. Die Polymerisierung von Aktin führt dabei zur Ausbildung von Protrusionen am vorderen Zellende und kontraktile Aktin-Myosin Filamenten am hinteren Zellende. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben dem Aktin-Zytoskelett auch die Mikrotubuli in migratorischen Prozessen während der Tumorprogression eine wesentliche Rolle spielen (Wittmann and Waterman-Storer 2001). Die aufgeführten Zytoskelett-assoziierten, zellulären Prozesse werden vor allem durch die RhoGTPasen, Rho, Rac und Cdc42 reguliert. In Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass vor allem RhoC an Metastasierungsprozessen beteiligt ist. Die GTPase Rac1 hingegen spielt in der Arp2/3 vermittelnden Aktinpolymerisierung eine entscheidende Rolle. PIP3 (PI3K-phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphat) aktiviert verschiedene GEFs (P-Rex-1, SWAP-70, Vav1, Sos1, Tiam1) und fördert somit die Aktivierung von Rac1. Dieses aktivierte Rac führt dann zur Expression von WASP-Proteinen, die die Arp2/3 vermittelnde Aktinfilamentbildung stimulieren und reguliert folglich die Ausbildung und Motilität von Lamellipodien (Boone, et al. 2009; Collisson, et al. 2003; Ruth, et al. 2006).

Die Funktionen des Zytoskeletts beschränken sich aber nicht nur auf die Erhaltung der Zellform, die Zellmobilität, den intrazellulären Transport und die Chromosomenaufteilung, vielmehr spielt das Zytoskelett eine bedeutende Rolle in verschiedensten regulatorischen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Zellkontakt-Inhibierung und Apoptose (Pawlak and Helfman 2001) und ist demnach ein wichtiger Regulator in der Tumorentstehung und Metastasierung.

### **2.3.3.2 Wirkungsweise von Zytostatika**

In dieser Arbeit sollen unter Anderem die molekularen Mechanismen der *Microtubule targeting drugs* (MTDs) Taxol und Nocodazol und insbesondere die regulatorische Rolle des Zytoskeletts im malignen Melanom genauer dargestellt werden. Aus diesem Grund wird in folgendem genauer auf die Wirkung von Zytostatika eingegangen.

Die Mikrotubuli sind ein vielversprechendes Target für die Entwicklung von Chemotherapeutika (Jordan and Wilson 2004; Zhou and Giannakakou 2005). Durch Zytostatika wird in schnell proliferierenden Tumorzellen eine Absterbekinetik induziert, welche einem exponentiellen Verlauf folgt. Die molekulare Grundlage der zielgerichteten Chemotherapie mit *Vinca*-Alkaloiden oder Taxanen (z.B. *Paclitaxel*) basiert auf der Inhibition der Mikrotubulodynamik. Dabei blockieren *Vinca*-Alkaloide die Polymerisation der Tubulindimere, wohingegen Taxane die Depolymersierung der Mikrotubuli-Fasern verhindern (Checchi, et al. 2003; Jordan and Wilson 1999). Durch diesen induzierten molekularen Mechanismus wird die Zellteilung inhibiert und die Tumorzellen gehen in Apoptose. Chemotherapeutika wie *Vinca*-Alkaloide und Taxane finden in der Behandlung von verschiedensten Tumorarten Anwendung und werden in Mono-oder Kombinationstherapien verwendet. Kombinationstherapien mit zwei oder mehr Zytostatika, die verschiedene Regulationsmechanismen der Zelle angreifen, sind eine wirkungsvolle Strategie zur Vermeidung einer Resistenz und erhöhen die Chancen des Therapieerfolgs. Für Patienten, die an einem malignen Melanom erkranken stellt das Chemotherapeutikum *Paclitaxel* eine Alternative zu Dacarbazin dar. In Phase II Studien zeigten sich nach *Paclitaxel* Monotherapie von Melanompatienten eine Ansprechrate von 0%-16,4%. Weitere Studien mit kombinierter *Paclitaxel* und Carboplatin Behandlung zeigten eine Ansprechrate von 11%-36%. Taxane sind allerdings nicht befähigt das zentrale Nervensystem zu penetrieren und eignen sich daher nur limitierend für Melanom-Patienten mit Hirnmetastasen (Algazi, et al. 2010).

#### 2.3.4 Transkriptionsfaktoren

Eine fehlregulierte Expression bzw. Aktivität von Transkriptionsfaktoren spielt eine entscheidende Rolle während der Tumorprogression. Transkriptionsfaktoren aktivieren oder reprimieren eine Vielzahl von Genen, welche wiederum zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beeinflussen. Durch eine veränderte Genaktivität kann es zur malignen Transformation der Zellen kommen und somit zur Tumorprogression und Metastasierung. Es konnten bereits einige Melanom-relevante Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, welche im Folgenden näher aufgeführt werden.

**MITF** (Microphthalmie assoziierter Transkriptionsfaktor) ist ein *basic-helix-loop-helix* Leucin Zipper Transkriptionsfaktor, welcher als Homo- oder Heterodimer an E-Box Sequenzen (5'-CA(C/T)GTG-3') bindet. Beim Menschen sind verschiedene Isoformen von MITF bekannt, die in unterschiedlichen Gewebetypen lokalisiert sind: MITF-A bis D, MITF-H und MITF-M. In Melanozyten und Melanomzellen wird spezifisch die MITF-M Isoform exprimiert (Fuse, et al. 1996), welche eine entscheidende Rolle für das Überleben und die Differenzierung dieser Zellen

spielt (Steingrímsson, et al. 2004). Mutationen des MITF-Gens verursachen unter anderem das Tietz- und das Waardenburg-Syndrom 2A. Des Weiteren ist das MITF-Gen im metastasierten Melanom in 10% -16% aktiviert, jedoch ist die genaue Rolle von MITF in der Melanomentstehung und Progression noch weitestgehend ungeklärt (Dynek, et al. 2008). Es ist jedoch bekannt, dass MITF in vielen Melanomen verstärkt exprimiert wird und als Onkogen wirkt, im Verlauf der Malignität des Melanoms hingegen die MITF Expression wieder abnimmt (Lekmine, et al. 2007).

**ETS-1** zählt zu der Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren, die an die Promotorsequenz (5'-GGA(A/T)-3') binden. ETS-Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in Zellwachstum, Differenzierung und Überleben und in Prozessen, welche Hämatopoese, Angiogenese, Wundheilung und Entzündungsreaktionen umfassen (Sharrocks 2001). Die Aktivierung von ETS-1 erfolgt über Ras-MAP Kinase abhängige Phosphorylierung und Protein-Protein Interaktionen. Im malignen Melanom konnte im Vergleich zu normalen Melanozyten eine verstärkte ETS-1 Expression und Aktivität detektiert werden. Dadurch wird die Transkription von ETS-1 Zielgenen (MMPs, Integrin beta3, BMP4, uPa, c-Myc) im Melanom verstärkt und folglich die Invasivität und Migrationsfähigkeit der Melanomzellen gefördert (Rothhammer, et al. 2004). In Endothelzellen kommt es zu einer Induktion der ETS-1 Expression durch die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF2, welche von Melanomzellen sezerniert werden. Dies führt zu einem vermehrten Abbau der extrazellulären Matrix und erleichtert die Migration von Endothelzellen Richtung Tumor (Oikawa, et al. 2001).

**Snail** gehört zu der Familie der Snail Transkriptionsfaktoren des Zink-Finger Typs. Snail bindet an die Promotorsequenz (5'-CAGGTG-3'), welche zu einem Teil dem E-Box Motif entspricht. Bindet Snail an die E-Box Sequenz, so fungiert der Transkriptionsfaktor als Repressor der Transkription spezifischer Zielgene (Cano, et al. 2000). Dies spielt auch in der Tumorgenese des malignen Melanoms eine entscheidende Rolle, indem aktiviertes Snail die Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin reprimiert und somit die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) fördert (Poser, et al. 2001).

**NFκB** (*nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells*) ist ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor im malignen Melanom, welcher sowohl als Homo- oder Heterodimer an die Promotorsequenz (5'-GGG(A/G)NN(C/T)CC-3') bindet und folglich spezifische Zielgene reguliert. Die Homo- oder Heterodimere setzen sich aus Mitgliedern der Rel Familie zusammen, die sich in verschiedene Proteine unterteilt: p65, RelB, c-Rel, p50 und p52. In Vertebraten ist das Heterodimer p50/p65 am häufigsten vertreten. Die Rel-Homologie-Domäne ist charakteristisch für die NFκB Untereinheiten und setzt sich aus einer DNA-Bindestelle, dem Kernlokalisierungssignal (NLS), einer Dimerisierungsregion und einer die Transkription modulierenden Region zusammen. Die Aktivierung von NFκB erfolgt durch verschiedenste Stimuli, wie bakterielle und virale



Stoffwechselprodukte, inflammatorische Zytokine (TNFalpha und Interleukine), Wachstumsfaktoren, sowie oxidativen und physikalischen Stress (Tergaonkar 2006). Im malignen Melanom liegt eine konstitutive Aktivierung von NFkB vor, welche für die Transkription von zahlreichen Zielgenen von zentraler Bedeutung sind.

Die **AP-2** (*activating enhancer binding protein 2*) Transkriptionsfaktor-Familie setzt sich aus fünf Mitgliedern zusammen: AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , AP-2 $\delta$  und AP-2 $\epsilon$ . Diese binden als Dimere an die DNA-Konsensus Sequenz (5'-GCCNNNGGC-3') und können sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Transkription ihrer Zielgene wirken. Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass AP-2 im Melanom als Tumorsuppressor wirkt und die Expression von Genen reguliert, welche sowohl die Proliferation, den Zellzyklus (HER-2, p21/WAF1), die Apoptose (c-KIT, Bcl-2, FAS/APO-1), die Zelladhäsion (MCAM/MUC18, E-Cadherin), als auch die Invasion und Angiogenese (MMP-2, VEGF, PAR-1) beeinflussen (Bar-Eli 2001; Gershenwald, et al. 2001; Huang, et al. 1998; Jean, et al. 1998; Suyama, et al. 2002). Demnach wird vermutet, dass die Melanomprogression mit dem Verlust von AP-2 assoziiert werden kann.

Weitere Transkriptionsfaktoren, die im Melanom eine wichtige Rolle spielen, auf welche jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird, sind unter anderem CREB/ATF-1 (*cAMP-Responsive Element (CRE)-Binding Protein/Activating Transcription Factor-1*), SOX9/10 (*Sry-Box*), PAX3 (*Paired Box3*), BRN-2, LEF/TCF (*Lymphoid Enhancer Factor/T-cell Specific Factor*), STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), HIF1A (*Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$* ), c-MYC and p53.

Die **AP-1** Transkriptionsfaktoren übernehmen in der Tumorgenese wichtige Funktionen bezüglich Proliferation, Migration, Apoptose, Angiogenese und Invasivität. Auch im malignen Melanom konnte dieser Familie eine wichtige Rolle zugesprochen werden, welche im nächsten Kapitel genauer dargestellt werden soll, da sie Gegenstand dieser Forschungsarbeit ist.

#### **2.3.4.1 Molekulare Funktion der AP-1 Transkriptionsfaktoren während der Tumorgenese**

Die AP-1 (*activating protein-1*) Transkriptionsfaktoren setzt sich aus den JUN (v-Jun; c-Jun, JUND, JUNB), JDP (JDP1/2), FOS/FRA (v-Fos, c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB), ATF/CREB (CREB, ATF1, ATF2, ATF4, ATF5, ATF6a, ATF6b, ATF7, ATF3/LRF1, B-ATF; ATFa0) and MAF (v-Maf, c-Maf, Nrl, MafB, MafF, MafG, MafK) Untereinheiten zusammen (Shaulian 2010). Alle Mitglieder der AP-1 Transkriptionsfaktor-Familie gehören zur Klasse der basischen Leuzinzipper (bZIP), die über eine leuzin-reiche Region dimerisieren, über ein gleichfalls C-terminal gelegenes basisches Motif an die DNA binden und mittels einer N-terminalen Domäne die Transkription aktivieren (Transaktivierungsdomäne, Delta-Domäne). Die DNA-Bindedomäne bestimmt das Spektrum der

durch AP-1 regulierten Gene (Vogt 2001). Die JUN, FOS/FRA, ATF (*activating transcription factor*) und MAF (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*) Untereinheiten bilden durch Dimerisierung DNA-Bindungskomplexe und stimulieren folglich die Transkription von Genen, welche die AP-1-DNA-Konsensussequenz (5'-TGA(C/G)TCA-3') enthalten (Kappelmann, et al. 2013a; Nakabeppu, et al. 1988). Diese AP-1-DNA-Konsensussequenzen sind auch unter den Bezeichnungen TREs (*phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate (TPA) response elements*) und CREs (*cyclic AMP-responsive elements*) bekannt und induzieren die Transkription bedingt durch den Tumor Promotor TPA (*phorbol ester tumor promoter*) (Angel, et al. 1987). Unterschiedliche AP-1 Dimer Zusammensetzungen verändern die Spezifität der Promotorbindung. Einige Studien zeigten, dass die JUN und ATF2 Untereinheiten sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können, wohingegen FOS Proteine ausschließlich Heterodimere formen. JUN-JUN, JUN-FOS und JUN-FRA Dimere zeigen eine hohe Bindungsaffinität an die TRE-Konsensus-Sequenzen, JUN-ATF2 Dimere binden vorwiegend an die CREs. Die Dimer-Zusammensetzung bestimmt unter anderem auch welche Gene spezifisch reguliert werden. So konnte gezeigt werden, dass JUN-ATF2 und JUN-FOS Dimere die Proliferation und die neoplastische Transformation im malignen Melanom fördern und somit eine wichtige Rolle während der Tumorgenese übernehmen (van Dam and Castellazzi 2001). Andererseits bewirken ATF2-ATF2 Dimere eine Suppression des Tumorwachstums (Bhoumik and Ronai 2008) und JUN-ATF2 Dimere induzieren sowohl Veränderungen des Zellwachstums, der Zellmotilität, als auch Resistenzen gegenüber von außen einwirkenden Stresstimuli (Shah, et al. 2010). Die Aktivierung der AP-1 Transkriptionsfaktoren ist demnach sowohl von der Dimer-Zusammensetzung abhängig, als auch von der Transkription, von posttranslationalen Modifikationen und von Interaktionen mit anderen Proteinen. Während der Tumorgenese beeinflussen AP-1 Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl von Regulatoren, welche die Zellproliferation, -migration und das Zell-Überleben betreffen und auch in der Melanomentwicklung und -metastasierung eine entscheidende Bedeutung haben (Kovary and Bravo 1991; Shaulian and Karin 2001; Shaulian and Karin 2002). Dennoch werden einigen JUN, FOS und ATF Untereinheiten (z.B. JUNB und JUND) Tumor-supprimierende Funktionen zugesprochen (Agarwal, et al. 1999). Ob AP-1 Transkriptionsfaktoren als Onkogene oder Tumorsuppressoren wirken, hängt im Wesentlichen von der antagonistischen Aktivität der AP-Dimere ab. Die Konsequenzen sind je nach Tumorart, dem Tumorstadium und dem genetischen Hintergrund des Tumors verschieden (Eferl and Wagner 2003).

#### **2.3.4.2 Das Onkoprotein c-Jun**

C-Jun konnte als zelluläres Homolog des viralen Onkoproteins v-Jun, welches vom *avian sarcoma virus 17 (ASV 17)* kodiert wird, identifiziert werden (Cavalieri, et al. 1985; Maki, et al. 1987). Das Proto-Onkogen c-Jun (*cellular Jun*) ist auf dem Chromosom 1p32-p31 lokalisiert, eine Region, die in diversen Erkrankungen oft von Translokationen und Deletionen betroffen ist. C-Jun umfasst 334 Aminosäuren und ist damit ein 37kDa großes Protein, welches die am häufigsten monomer auftretende Komponente des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 darstellt (Vogt, et al. 1987). Neben der Aktivierung von c-Jun und damit AP-1 durch Phosphorylierung, konnten weitere Modifikationen von c-Jun identifiziert werden, welche ebenfalls zu einer Hyperaktivierung des Transkriptionsfaktors führen und folglich zur onkogenen Transformation der betroffenen Zellen. C-Jun stellt während der Tumorgenese einen sehr wichtigen Regulator verschiedenster biologischer Prozesse dar (Kovary and Bravo 1991; Shaulian and Karin 2001), wie z.B. der Zellproliferation durch die spezifische Regulation von EGFR, KGF, CyclinD1 und anderen, die Proliferation stimulierenden, Genen (Bakiri, et al. 2000; Shaulian, et al. 2000; Zenz, et al. 2003). Auch der Tumorsuppressor p53 wird durch den Transkriptionsfaktor c-Jun negativ reguliert, was zur Inhibition von apoptotischen Prozessen führt (Mils, et al. 1997; Schreiber, et al. 1999). Darüber hinaus steigert c-Jun durch spezifische Regulation von Proliferin die Angiogenese (Toft, et al. 2001) und durch vermehrte Expression von CD44 die Invasivität (Lamb, et al. 1997). Die erhöhte c-Jun Protein Expression und die damit verbundene gesteigerte AP-1 Aktivität wurde bereits in vielen Studien für verschiedenste Tumorarten beschrieben, z.B. in (Bos, et al. 1999; Fialka, et al. 1996; Jin, et al. 2007; Podar, et al. 2007; Zhang, et al. 2004). Auch im malignen Melanom kommt dem Transkriptionsfaktor c-Jun eine bedeutende Rolle zu (Spangler, et al. 2011), welche in dieser Arbeit noch genauer analysiert werden soll.

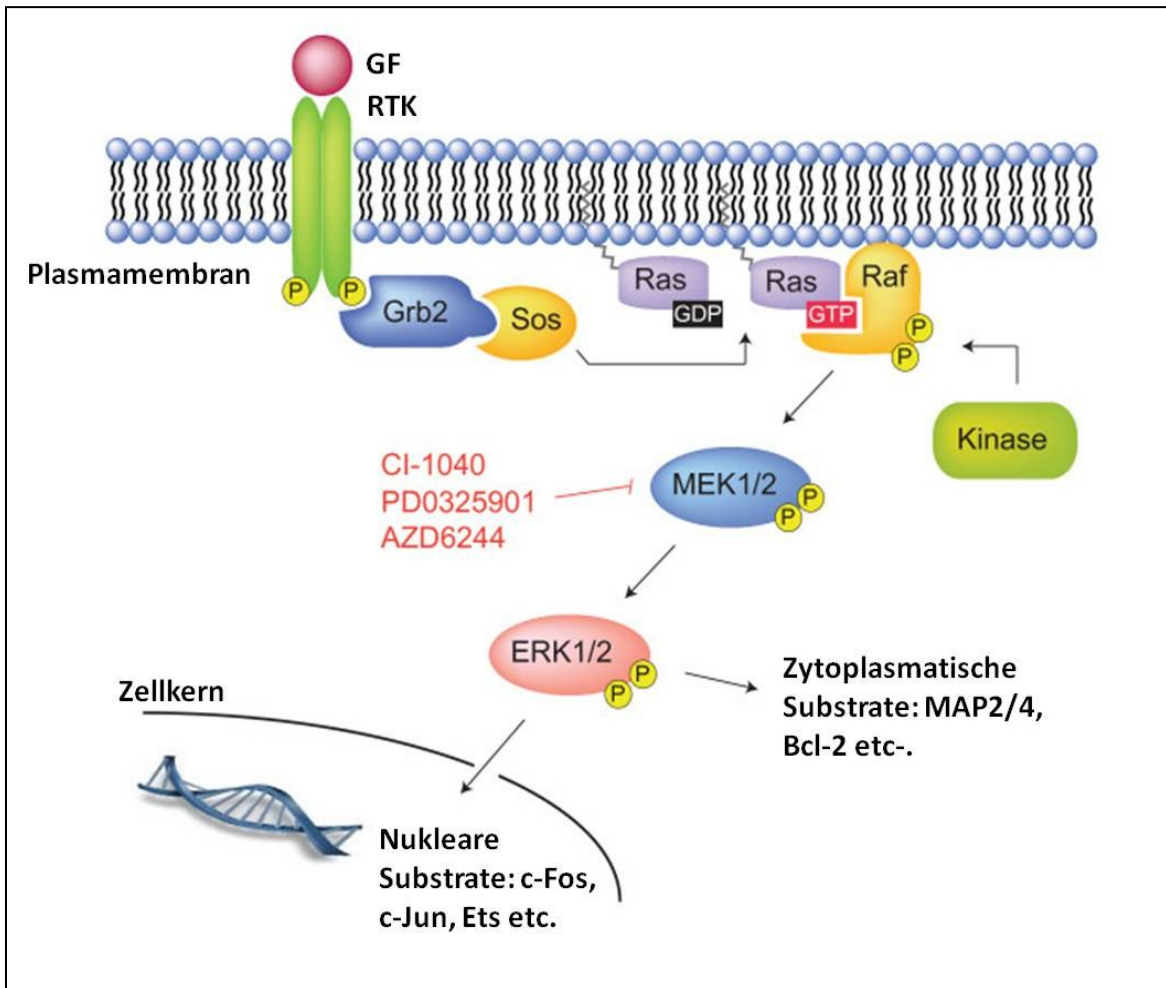
#### **2.3.4.3 c-Jun Regulation durch den JNK Signalweg**

JNK (*Jun-N-terminal Kinase*) zählt zu der Familie der MAPKinasen (Mitogen aktivierte Protein Kinasen) und wird meist durch inflammatorische Zytokine und Stress induziert (Karin 1995; Weston and Davis 2007). Diese Stimuli führen über die Aktivierung von MEK und MKK4/7 zur Phosphorylierung von Threonin 183 und Tyrosin 185 und damit zur Aktivierung von JNK. Das wichtigste Substrat von JNK ist der Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher vorwiegend durch Phosphorylierung reguliert und folglich stabilisiert und aktiviert wird. JNK wandert in den Zellkern (Wagener and Müller 2010) und phosphoryliert c-Jun an den N-terminalen Aminosäureresten Serin 63 und Serin 73 und induziert dadurch die transkriptionelle Aktivität von c-Jun (Minden, et al. 1994). Phosphoryliertes c-Jun ist vor Ubiquitinierung und damit vor Degradation geschützt,

wohingegen eine Phosphorylierung an den Aminosäureresten Threonin 239 und Serin 234 zu Ubiquitinierung und Abbau des Proteins führt (Fuchs, et al. 1996). Durch Phosphorylierung von JNK durch PKC (Protein Kinase C) und dessen Koaktivator RACK1 kann die Aktivität von JNK bis zum Maximum gesteigert werden (Lopez-Bergami, et al. 2005).

**2.3.4.4 c-Jun Regulation durch den Ras/Raf/Mek/ERK Signalweg**

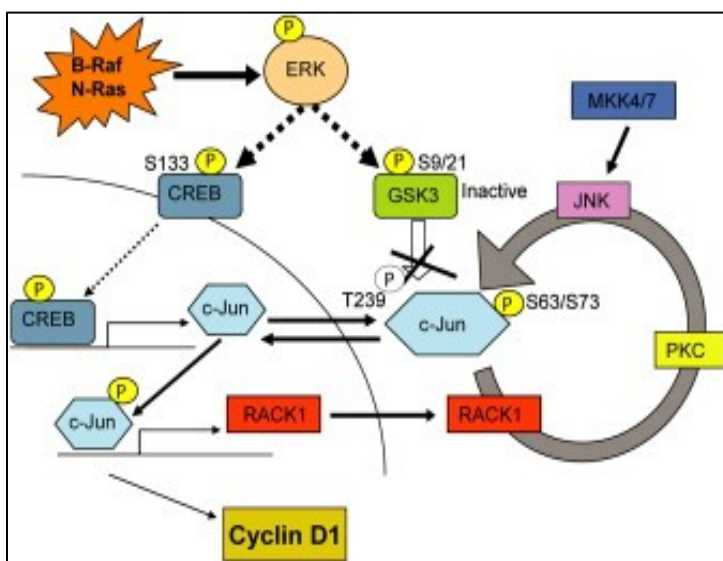
Der MAPKinase Signalweg (Abbildung 2.4) ist einer der bedeutendsten Signalwege der Zelle und reguliert wichtige Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Zellüberleben, Invasion, Zelladhäsion und Matrixdegradation. Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Neurotransmittern oder Hormonen erfolgt die Aktivierung der Signalkaskade durch Dimerisierung der Rezeptortyrosinkinase (RTK) und zur Autophosphorylierung der Tyrosine des Rezeptors. Die



**Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Ras/Raf/Mek/ERK-Signalwegs.** GF: Growth Factor, Grb2: Growth Binding Factor 2, SOS: Son of Sevenless (modifiziert nach Fremin and Meloche 2010).

intrazellulären Phosphotyrosinreste werden von der SH2-Domäne des Adaptorproteins Grb2 (*growth binding factor 2*) erkannt und gebunden, wodurch es zur Translokation des GDP/GTP Austauschfaktors SOS (*son of sevenless*) an die Zellmembran kommt (Saito, et al. 2010). SOS aktiviert in weiterer Folge die inaktiven Ras-Moleküle (H-Ras, K-Ras, N-Ras) durch einen Austausch von gebundenem GDP gegen GTP.

Des Weiteren werden die nachfolgenden Raf-Kinasen (A-Raf, B-Raf, C-Raf/Raf-1) aus dem Zytoplasma an die Membran rekrutiert und durch verschiedene Kinasen (PAK [*p21-activated kinase*] und Src-Kinase) an den Aminosäureresten Serin oder Threonin phosphoryliert und damit aktiviert. Aktiviertes Raf phosphoryliert MEK1 und MEK2, welche wiederum ERK1 und ERK2



**Abbildung 2.5: Modell des ERK-JNK Crosstalk.** Aktives ERK stabilisiert c-Jun durch phosphorylierungsabhängige Inaktivierung von GSK3 und fördert die c-Jun Transkription durch Aktivierung von CREB. C-Jun reguliert die Transkription von RACK1, was wiederum mit PKC und MEKK4/7 die JNK Aktivität steigert, um die c-Jun Stabilität und Aktivität zu gewährleisten (Lopez-Bergami, et al. 2007).

(*extracellular signal-related protein kinase*) phosphorylieren und aktivieren, was den Endpunkt des Ras/Raf/Mek/ERK Signalwegs darstellt. Dadurch werden folglich sowohl verschieden Proteine im Zytoplasma phosphoryliert, als auch verschiedene Transkriptionsfaktoren im Zellkern.

In normalen Melanozyten ist die MAPK Signalkaskade nachweislich inaktiv, wohingegen sie im malignen Melanom konstitutiv aktiv vorliegt. Dafür sind im Wesentlichen die Moleküle Ras und B-Raf verantwortlich, welche in

Zellen des malignen Melanoms teils

Mutationen aufweisen. Die Häufigkeit mit der N-Ras Mutationen beim Melanom nachgewiesen werden konnten, variieren hierbei zwischen 5 und 36%. Durch diese Mutation im N-Ras Gen kommt es zur Stabilisierung des Proteins durch eine ständige Bindung von GTP und folglich zu einer konstitutiven Aktivierung von Raf Proteinen (Wang and Qi 2013; Yajima, et al. 2012). Mutation im B-Raf Gen konnten hingegen in über 60% aller Melanome detektiert werden. Die am häufigsten auftretende Mutation ist durch einen Austausch der Base Thymin durch Adenin gekennzeichnet, was in der Kinasedomäne einen Aminosäureaustausch von Valin zu Glutamat (V600E) zur Folge hat. Da B-Raf Mutationen bereits in gutartigen Nävi auftreten, kommt es zu der Schlussfolgerung, dass diese Mutation allein nicht zu einer malignen Entartung der Zellen führt,

sondern zusätzliche molekulare Ereignisse für die Entwicklung eines malignen Melanoms nötig sind (Pollock, et al. 2003).

Diese zusätzlichen molekularen Mechanismen, welche zur konstitutiven Aktivierung der MAPK-Signalkaskade im Melanom beitragen, umfassen eine Überexpression von Wachstumsfaktoren, eine verstärkte Bindung von Ras an Rezeptor Tyrosin Kinasen, eine Überexpression und damit Akkumulierung von Ras an der Zellmembran und die verminderte Expression von Negativ-Regulatoren von ERK (Panka, et al. 2006).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der JNK Signalweg zusammen mit konstitutiv aktivem ERK die c-Jun Stabilität im malignen Melanom beeinflusst. Dabei führt aktives ERK zur Aktivierung von CREB, was die Transkription von c-Jun fördert. Zum Anderen hemmt aktives ERK durch Phosphorylierung die Aktivität von GSK3 und induziert dadurch wiederum die c-Jun Transkription. Damit erfolgt kein Abbau von c-Jun, welches in weiterer Folge die RACK1 Transkription fördert und so die JNK Aktivität zusammen mit PKC und MKK4/7 steigert. Durch dieses Zusammenspiel zwischen JNK und ERK (Abbildung 2.5) wird in der Zelle gewährleistet, dass c-Jun weiter phosphoryliert und damit aktiviert wird (Lopez-Bergami, et al. 2007).

#### **2.3.4.5 c-Jun Regulation durch einen Zelladhäsions-abhängigen Signalweg**

Die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun kann auch über Alterationen der E-Cadherin Expression erfolgen. Durch den Verlust von E-Cadherin während der Tumorgenese konnte eine Regulation von c-Jun detektiert werden.

In Melanozyten basierten die Unterschiede der detektierten c-Jun Expression auf der Ausbildung von aktiven Zell-Zell-Kontakten über E-Cadherin. Dies konnte anhand von Ko-Kultur Experimente zwischen Keratinozyten und Melanozyten nachgewiesen werden. Diese Zelladhäsionsabhängige Regulation von c-Jun konnte bislang für das maligne Melanom (Spangler, et al. 2011) und das Kolonkarzinom bestätigt werden (Knirsh, et al. 2009).

#### **2.3.5 miRNAs in der Tumorgenese**

Ein weiteres zentrales Thema dieser Arbeit stellt die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch microRNAs dar.

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle bestehend aus 21-23 Nukleotiden. Sie sind dazu befähigt durch direkte Bindung an spezifische mRNAs die Genexpression zu inhibieren. Dies kann auf transkriptioneller Ebene durch die Degradation der jeweiligen mRNA erfolgen oder durch Inhibierung der Translation des spezifisch gebundenen RNA-Moleküls. Anhand von DNA-Arrays konnten Fehlregulationen dieser miRNAs während der

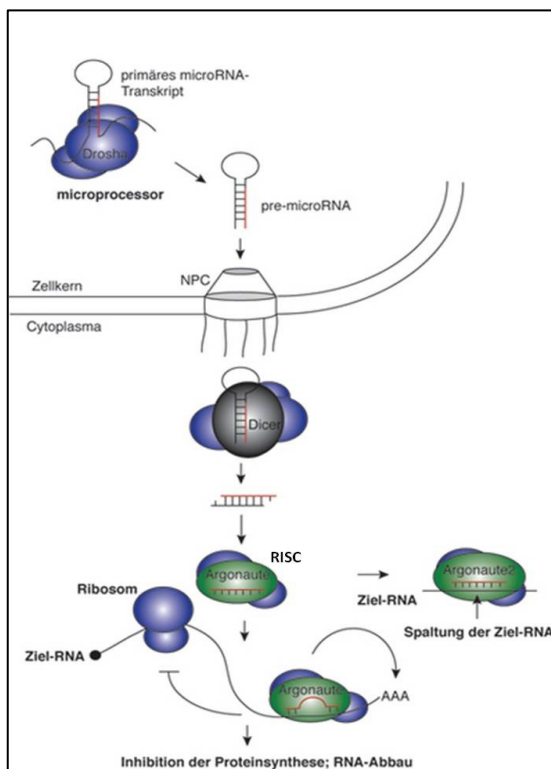
Tumorgenese identifiziert werden, die durch genomische Aberrationen oder andere Ursachen bedingt sind (Volinia, et al. 2006). Gene, die für miRNAs kodieren, können in Tumoren sowohl deletiert als auch amplifiziert sein. Darüberhinaus ist eine Regulation der miRNA Expression durch Bindung von Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich der jeweiligen miRNA möglich. Somit kann der Verlust von einer miRNA für die Überexpression von Onkoproteinen verantwortlich sein, wohingegen die Amplifikation bestimmter miRNAs unter Umständen die Expression von Tumorsuppressor-Proteinen inhibiert (Calin, et al. 2007) oder umgekehrt. In den letzten Jahren konnten einige miRNAs als sogenannte *Oncomirs* identifiziert werden (Esquela-Kerscher and Slack 2006). Es ist bereits bekannt, dass miRNAs durch ihre spezifische Genregulation viele wichtige zelluläre Prozesse, wie Zellproliferation, Differenzierung, Zell-Zyklus Regulation und Apoptose beeinflussen (Dalmy and Edwards 2006). Dabei ist eine miRNA für die Regulation von 100-200 verschiedener mRNAs zuständig (Chen, et al. 2010; Philippidou, et al. 2010; Xu, et al. 2012). Es ist nicht einfach, aus dem Verlust oder der Anreicherung bestimmter miRNAs auf den Mechanismus zu schließen, jedoch wurden bereits einige tumorrelevante Gene, die durch spezifische miRNAs reguliert werden, identifiziert (Chen, et al. 2010; Esquela-Kerscher and Slack 2006; Fang, et al. 2012; Orom, et al. 2008; Voller, et al. 2013). Einige davon sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst.

miRNA	Veränderung	Funktion	Wirkung	Literatur
let-7-Familie	verminderte Expression in Lungenkarzinomen	negative Regulation in Ras-Onkogenen	Tumorsuppressor	(Johnson, et al. 2005)
miR-21	verstärkte Expression in einigen soliden Tumoren	anti-apoptotisch	Onkogen	(Chan, et al. 2005)
miR-15a, miR-16-1	Deletion bei CCL (chronic lymphocytic leukemia)	negative Regulator von Bcl-2	Tumorsuppressor	(Calin, et al. 2002; Cimmino, et al. 2005)
miR-155	erhöhte Expression in B-Zell-Lymphomen	Kooperation mit MYC	Onkogen	(Eis, et al. 2005)

**Tabelle 2.1: Tumorassoziierte miRNAs.**

### 2.3.5.1 miRNA Biogenese

Gene, die für miRNAs kodieren, werden durch die RNA-Polymerase II in eine *primary*-miRNA (pri-miRNA) transkribiert. Die pri-miRNA bildet eine haarnadelförmige Schleife (*hairpin*) aus und wird durch einen Multiproteinkomplex (Mikroprozessor), bestehend aus einer RNase III (Drosha) und einem Protein, welches die doppelsträngige RNA bindet (Pasha/ DGCR8), prozessiert. Der Komplex spaltet die pri-miRNA und generiert eine *precursor*-miRNA (pre-miRNA). Diese besteht aus ungefähr 70 Nukleotiden mit einem 3'-Überhang, welcher wiederum von dem Ran-GTP abhängigen *Nuclear-Export-Faktor* Exportin 5 erkannt wird und von diesem aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert wird. Im Zytoplasma erfolgt die Abspaltung der reifen miRNA von der pre-miRNA durch eine Dicer genannte RNase III und dem Kofaktor TRBP (*transactivation responsive (TAR) RNA-binding Protein*). Dicer interagiert in weiterer Folge mit dem Protein PACT,



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Biogenese und der Funktion von miRNAs.** Das primäre miRNA-Transkript wird im Zellkern gebildet. Der *microprocessor* Komplex (Drosha, Pasha) spaltet die pri-miR und generiert die pre-miRNA. Die pre-miR wird durch Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert, wo Dicer die mature miRNA generiert. Ein Strang der maturen miRNA interagiert mit AGO2 und bindet partiell oder vollständig komplementären Bereichen auf Ziel-mRNAs. Dies führt zur Repression der Proteintranslation oder zu einer Deadenylierung der mRNA. (AAA, Poly-A-Ende der mRNA; NPC, Kernpore [*nuclear pore complex*]) (Meister 2010).

welches dann das Protein Argonaut 2 (AGO2) rekrutiert. Dabei entsteht der sogenannte RISC-Komplex (*miRNA-induced silencing complex*). Ein Strang des miRNA Duplexes (der *guide*-Strang) bleibt stabil und stellt im Anschluss die mature, funktionelle miRNA dar. Der andere Strang (*passenger*-Strang oder miRNA\*) wird meist abgebaut, kann jedoch auch erhalten bleiben und als funktionelle miRNA agieren (Abbildung 2.6).

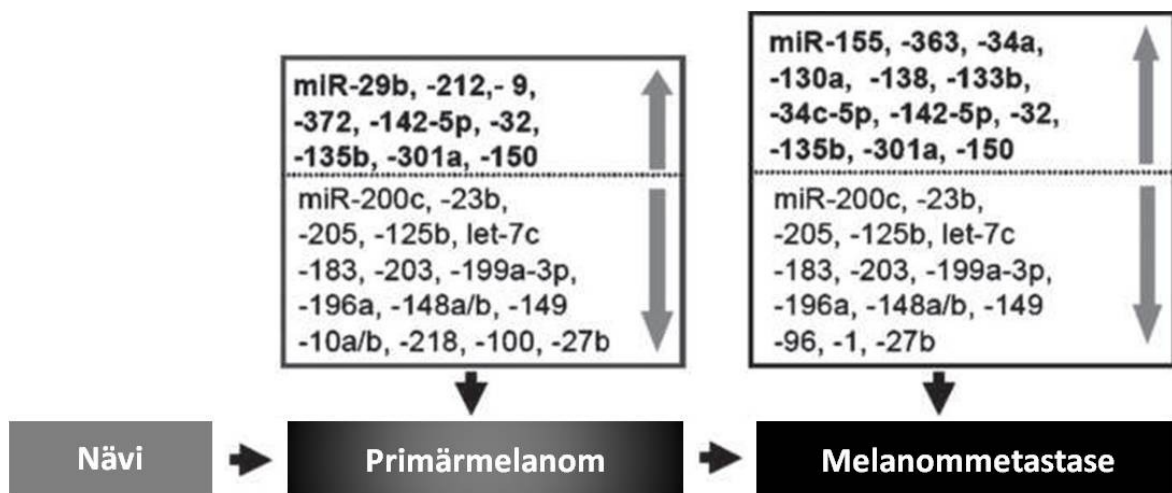
Bei annähernder Komplementarität einer miRNA mit einer Ziel-mRNA erfolgt die Hemmung der Proteinsynthese entweder durch Inhibition der Translation oder durch Deadenylierung und anschließendem Abbau der mRNA. Die Degradation der mRNA erfolgt durch AGO2. In den



meisten Fällen erfolgt die Bindung der miRNA in der 3'-UTR (*untranslated region*) der Ziel-mRNA. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass miRNA Bindungen auch in andern Regionen, wie der kodierenden Region oder der 5'-UTR, möglich sind (Orom, et al. 2008; Rigoutsos 2009). Die direkte Bindung erfolgt über eine *seed*-Region am 5'-Ende der miRNA, welche 2 bis 8 Nukleotide umfasst (Bartel 2009) und komplementär zur spezifischen Ziel-mRNA ist.

### 2.3.5.2 Rolle von miRNAs im malignen Melanom

Die essentielle Bedeutung der Regulation spezifischer Gene durch miRNAs wurde bereits für viele Tumorarten beschrieben (Esquela-Kerscher and Slack 2006). Es konnten bis dato eine Vielzahl von miRNAs detektiert werden, die entweder die Tumorprogression fördern oder als



**Abbildung 2.7: miRNA Expressionsprofile.** MiRNA Expression der verschiedenen Melanomstadien (Primärmelanom, Melanommetastase) bezogen auf Expression im Navi (modifiziert nach Philippidou, et al. 2010).

Tumorsuppressoren fungieren. Dabei beeinflussen miRNAs vielfältige zelluläre Prozesse, die in direktem Zusammenhang mit der Progression und Metastasierung von Tumoren stehen (Croce 2009). Demnach konnten auch verschiedene miRNAs identifiziert werden, deren Fehlregulation in direktem Zusammenhang mit der Progression und Entwicklung des malignen Melanoms stehen (Philippidou, et al. 2010) (Abbildung 2.7). So konnten z.B. miRNA Expressionsprofile von 5 verschiedenen miRNAs (miR-150, -15b, -199a-5p, -33a, -424) in Serumproben von Melanompatienten kürzlich als Biomarker für eine Melanomprädisposition identifiziert werden (Friedman, et al. 2012).

Des Weiteren wurden bereits verschiedene melanomrelevante Gene detektiert, die durch spezifische miRNAs reguliert sind. So zeigte sich eine Regulation der Integrin beta3 Expression durch die miRNA let-7a. Folglich führt der Verlust der miRNA let-7a zu einer erhöhten Invasivität

der Melanomzellen (Muller and Bosserhoff 2008). Ferner konnte gezeigt werden, dass die miRNAs miR-221/222 eine onkogene Funktion haben und die Invasivität und Migration von Melanomzellen durch die Regulation von c-Kit, p27 und p57 steigern (Felicetti, et al. 2008). Auch der Transkriptionsfaktor MITF wird durch die Bindung verschiedener miRNAs reguliert, darunter miR-137, miR-182, miR-148, miR-23a und miR-23b. Diese miRNAs hemmen die MITF Expression und fördern demnach ein erhöhtes migratorisches Potential und das Überleben der Melanomzellen (Bemis, et al. 2008; Haflidadottir, et al. 2010; Philippidou, et al. 2010; Segura, et al. 2009). Auch die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und Apoptose wird über miRNAs gesteuert. Es konnte gezeigt werden, dass die miR-137 im malignen Melanom als Tumorsuppressor fungiert, indem sie CtBP1 (*Carboxyl-terminal binding protein 1*), einen Repressor zahlreicher Tumorsuppressorgene, direkt reguliert, was eine Inhibition der EMT und eine Induktion der Apoptose zur Folge hat (Deng, et al. 2011). Zusammenfassend zeigt sich eine essentielle Funktion verschiedener miRNAs für die Progression und Entwicklung des malignen Melanoms und ein breites Spektrum spezifischer melanomrelevanter mRNA Moleküle, deren Expression durch miRNAs reguliert wird. Die molekularen Zusammenhänge zwischen miRNA Expression, Expression spezifischer Onkogene oder Tumorsuppressoren und deren funktionelle Funktionen im malignen Melanom gilt es weiter zu untersuchen.

### 3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten molekulare Mechanismen identifiziert und analysiert werden, welche zu einem besseren Verständnis der Entstehung und Progression des malignen Melanoms beitragen könnten. Der Fokus richtete sich dabei auf den Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher ein wichtiges Mitglied der AP-1 Familie darstellt. AP-1 Transkriptionsfaktoren spielen eine wesentliche Rolle in der Tumorgenese, insbesondere in zellulären Prozessen, wie Proliferation, Migration, Invasion, Apoptose und Angiogenese. Es konnte bereits gezeigt werden, dass c-Jun an der Regulation dieser Prozesse beteiligt ist. Demnach wurden die Regulation und Funktion dieses Transkriptionsfaktors im malignen Melanom im Detail untersucht. Die Arbeit lässt sich in drei Hauptteile gliedern:

1. Im ersten Teil der Arbeit wird die zelladhäsionsabhängige Regulation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun im malignen Melanom genauer analysiert. Dabei konnte ein E-Cadherin abhängiger Signalweg identifiziert werden, welcher zur Aktivierung von c-Jun im malignen Melanom führt.
2. Der zweite Teil beinhaltet, basierend auf den erworbenen Erkenntnissen aus Teil eins, die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch das Zytoskelett. Dabei konnten die Mikrotubuli als regulatorische Einheit des Zytoskeletts bezüglich des Transkriptionsfaktors c-Jun identifiziert werden. Des Weiteren wurden die Prozesse der c-Jun Stabilität und des Kernimports im malignen Melanom hinsichtlich des Einflusses des Zytoskeletts genauer analysiert.
3. Im dritten Teil der Arbeit konnte eine miRNA identifiziert werden, die miR-125b, welche durch direkte Bindung im kodierenden Bereich der c-Jun mRNA den Transkriptionsfaktor reguliert und damit das proliferative und migratorische Potential der Melanomzellen beeinflusst.

## 4 Ergebnisse

Die Regulation und Funktion des Transkriptionsfaktors c-Jun im malignen Melanom ist noch weitestgehend ungeklärt. Jedoch konnte in verschiedenen Studien bereits gezeigt werden, dass AP-1 Transkriptionsfaktoren in der Tumorgenese verschiedener Tumorarten eine essentielle Rolle spielen. Einige Vordaten wiesen auf eine zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors c-Jun (AP-1 Mitglied) in der Melanom-Progression und -Entwicklung hin. In dieser Arbeit wird die Funktion und Regulation von c-Jun demnach genauer analysiert. Neben der bereits bekannten Regulation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun durch die Signalwege JNK und ERK über Phosphorylierung, konnten im Rahmen der durchgeführten Analysen neue Regulationsmechanismen von c-Jun detektiert werden, welche unter Anderem auch funktionelle Effekte auf die Melanom-Progression zeigten.

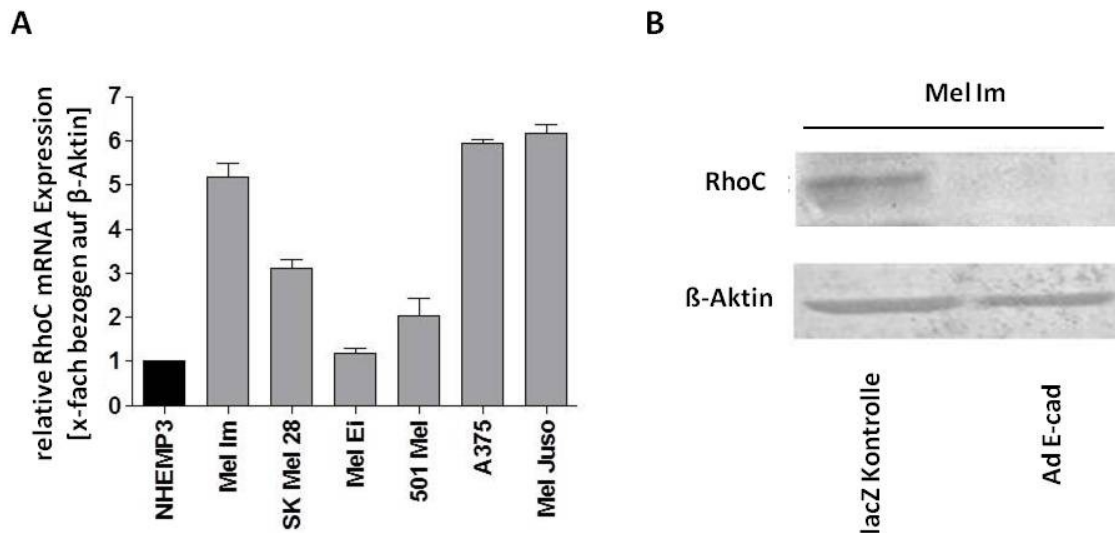
### 4.1 Ein E-Cadherin abhängiger Signalweg reguliert den Transkriptionsfaktor c-Jun im malignen Melanom

Während der Melanomentwicklung zeigt sich eine eindeutige Veränderung der Zell-Zell-Adhäsion, welche durch den Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin bedingt ist. Dieser Verlust von E-Cadherin hat eine Hochregulation des Adhäsionsmoleküls N-Cadherin zur Folge. In Abhängigkeit von diesem E-Cadherin-N-Cadherin „Switch“ konnte eine Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun im malignen Melanom detektiert werden, was auf einen Zelladhäsions-abhängigen Signalweg hindeutete. Dieser alternative Regulationsmechanismus, welcher in einer Aktivierung von c-Jun resultiert, sollte in weiterer Folge genauer analysiert werden. Die Ergebnisse konnten bereits erfolgreich publiziert werden (Spangler, et al. 2012). Alle praktischen Arbeiten zu diesem Thema unter 4.1 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Barbara Spangler durchgeführt.

#### 4.1.1 E-Cadherin reguliert die GTPase RhoC

Es konnte eine Abhängigkeit zwischen dem E-Cadherin Verlust während der Melanomentstehung und -entwicklung und der Expression der GTPase RhoC detektiert werden. RhoGTPasen sind Modulatoren der zytoskelettalen Struktur und ermöglichen dadurch eine Signalweiterleitung in der Zelle. Es ist bereits bekannt, dass die GTPase RhoC im Melanom überexprimiert vorliegt und für verstärktes Migrations- und Invasionsverhalten der Melanomzellen verantwortlich ist (Boone, et al. 2009; Ruth, et al. 2006). In den folgenden Analysen sollte geprüft werden, ob Rho-Proteine an der Regulation von c-Jun beteiligt sind und diese Regulation adhäsionsabhängig ist. In RhoC Expressionsanalysen via qRT-PCR zeigte sich eine erhöhte RhoC Expression in Melanomzelllinien

(Mel Im, SkMel28, Mel Ei, 501 Mel, A375, Mel Juso) im Vergleich zu normalen Melanozyten (NHEMs) (Abbildung 4.1 A). Des Weiteren konnte mittels Western Blot Analysen ein verminderter RhoC Proteingehalt nach E-Cadherin Re-Expression durch adenovirale Transduktion der Melanomzelllinie Mel Im detektiert werden (Abbildung 4.1 B). Demnach konnte eine Korrelation zwischen dem Verlust von E-Cadherin und der RhoC Expression im malignen Melanom nachgewiesen werden.

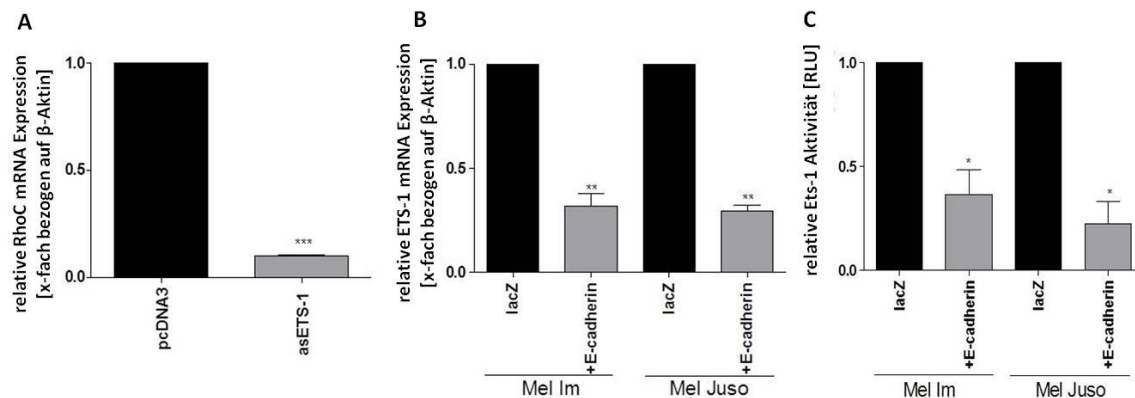


**Abbildung 4.1: Expressionsstatus der GTPase RhoC im malignen Melanom und dessen E-Cadherin Abhängigkeit.** (A) Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR zeigen eine Überexpression von RhoC in Melanomzelllinien (Mel Im, SkMel28, Mel Ei, 501 Mel, A375, Mel Juso) im Vergleich zu *Normal Human Epidermal Melanocytes* (NHEMs) in Passage 3. (B) Western Blot Analysen zeigen nach adenoviraler Transduktion von E-Cadherin in Melanomzellen (Mel Im) eine verminderte RhoC Expression. Die Transduktion mit einem LacZ- Virus diente als Kontrolle (lacZ Kontrolle).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle für Western Blot Analysen.

#### 4.1.2 ETS-1 reguliert die GTPase RhoC

Nachdem die Abhängigkeit der GTPase RhoC von der Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt nach Transkriptionsfaktoren gesucht, die sich in der Signalkaskade zwischen E-Cadherin und RhoC einordnen lassen. Bellovin et al. postulierte 2006 (Bellovin, et al. 2006), dass der Transkriptionsfaktor ETS-1 befähigt ist, an den RhoC Promotor zu binden und somit die Expression von RhoC reguliert. In Expressionsanalysen via qRT-PCR konnte bestätigt werden, dass ETS-1 die GTPase RhoC auf transkriptioneller Ebene reguliert, indem antisense (as) ETS-1 Zellklone auf ihren relativen RhoC Expressionsstatus hin untersucht wurden. Diese asETS-1 Klone wurden durch stabile Transfektion mit einem asETS-1-Plasmid von Mel Im Zellen generiert und zeigten eine stark verminderte RhoC Expression im Vergleich zu den stabil transfizierten pcDNA3-Zellklonen (Abbildung 4.2 A). Des Weiteren konnte eine Abhängigkeit der ETS-1 Expression von dem E-Cadherin Expressionsstatus im Melanom

detektiert werden (Abbildung 4.2 B). In ETS-1 Aktivitätsmessungen konnte durch Luziferase *Reporter Gene Assays* mittels Transfektion eines ETS-1 LUC Plasmides in zwei verschiedenen Melanomzelllinien (Mel Im, Mel Juso) eine signifikant verminderte ETS-1 Aktivität nach adenoviraler Transduktion von E-Cadherin im Vergleich zu kontrolltransduzierten Zellen (LacZ) beobachtet werden (Abbildung 4.2 C).



**Abbildung 4.2: Nach E-Cadherin Verlust im Melanom reguliert ETS-1 die RhoC Expression.** (A) Expressionsanalysen durch quantitative RT-PCR zeigen eine Reduktion der RhoC Expression in asETS-1 Klonen (mit asETS-1-Plasmid stabil transfizierte Mel Im Zellen). pcDNA3 Zellklone (mit pcDNA3-Plasmid stabil transfizierte Mel Im Zellen) dienten als Kontrolle. (B) Expressionsanalysen durch quantitative RT-PCR zeigen eine Reduktion der ETS-1 Expression nach adenoviraler Transduktion von E-Cadherin in den Melanomzellen Mel Im und Mel Juso. (C) LUC Aktivitätsmessungen zeigen eine reduzierte ETS-1 Aktivität nach E-Cadherin Re-Expression in den Melanomzellen Mel Im und Mel Juso. Die Transduktion mit einem LacZ- Virus diene als Negativkontrolle (LacZ).

Zusammenfassend konnte in den bisherigen Analysen die Abhängigkeit sowohl der ETS-1 Expression, als auch der ETS-1 Aktivität von der E-Cadherin Expression validiert werden. Diese Regulation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors ETS-1 durch den Verlust von E-Cadherin während der Melanom-Progression resultiert in weiterer Folge in der Hochregulation des GTPase RhoC.

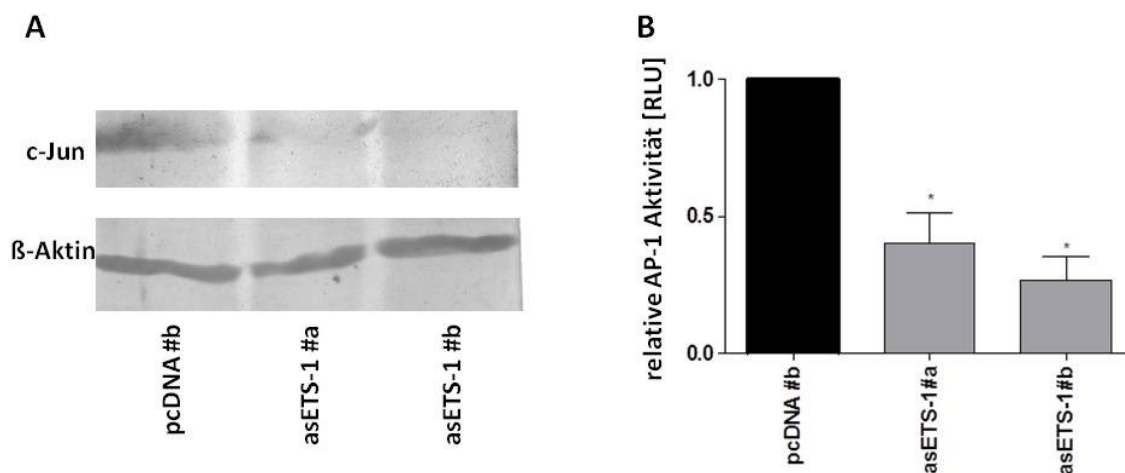
#### 4.1.3 Der E-Cadherin abhängiger ETS-1/RhoC Signalweg reguliert die c-Jun Expression und

##### AP-1 Aktivität

Die Signalkaskade, die durch den Verlust von E-Cadherin im malignen Melanom aktiviert wird, wurde in weiteren Experimenten auf ihren Einfluss auf die c-Jun Expression und AP-1 Aktivität hin untersucht. Durch Western Blot Analysen zeigte sich in asETS-1 Zellklonen eine verminderte c-Jun Protein Expression im Vergleich zu den pcDNA3 Zellklonen (Abbildung 4.3 A). Der Verlust von ETS-1 resultierte in einer stark verminderten AP-1 Aktivität, was in AP-1 Aktivitätsmessungen durch

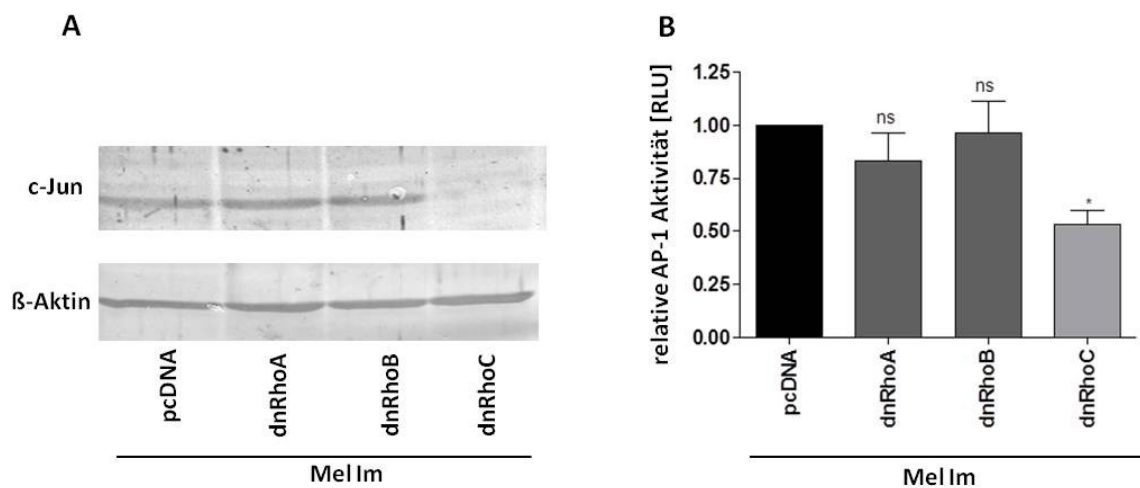
Luziferase *Reporter Gene Assays* mittels Transfektion eines AP-1 LUC Plasmides in zwei verschiedenen asETS-1 Zellklonen (asETS-1#a, asETS-1#b) gezeigt werden konnte (Abbildung 4.3 B). Da die regulatorische Abhängigkeit der GTPase RhoC von dem Transkriptionsfaktor ETS-1 bereits aufgeklärt wurde, sollte in weiteren Versuchen die Wirkung der GTPase RhoC auf den Transkriptionsfaktor c-Jun und dessen Aktivität genauer analysiert werden. Zunächst wurde überprüft, ob Rho-Proteine an der Regulation von c-Jun beteiligt sind.

Dafür wurden dominant negative (dn) Rho Konstrukte verwendet, welche mit hoher Affinität GDP



**Abbildung 4.3: Ets-1 Expression und Aktivität reguliert den Transkriptionsfaktor c-Jun und die AP-1 Aktivität.** (A) Western Blot Analysen zeigen eine verminderte c-Jun Protein Expression in asETS-1 Klonen (asEts-1#a, asEts-1#b).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle für Western Blot Analysen. (B) Luziferase Aktivitätsmessungen zeigen eine reduzierte AP-1 Aktivität in antisense (as) ETS-1 Klonen. pcDNA3 Zellklone dienten als Kontrolle.

binden und folglich nicht mehr aktiviert werden können. Es konnte mittels Western Blot Analysen nach Expression des dnRhoC Konstruktes in der Melanomzelllinie Mel 1m, verglichen mit der pcDNA-Kontrolle, eine deutliche Abnahme der c-Jun Expression detektiert werden (Abbildung 4.4 A). Hingegen führte die Expression von dnRhoA und dnRhoB Konstrukten zu keiner Veränderung der c-Jun Gesamtproteinmengen. Auch in AP-1 Aktivitätsmessungen nach Transfektion der dnRho Konstrukte konnte eine verringerte AP-1 Aktivität nur nach Expression des dnRhoC Konstruktes beobachtet werden (Abbildung 4.4 B).



**Abbildung 4.4: GTPase RhoC reguliert den Transkriptionsfaktor c-Jun und die AP-1 Aktivität.** (A) Western Blot Analysen zeigen eine verminderte c-Jun Protein Expression nach Transfektion eines dominant negativen (dn) RhoC Konstruktes in Mel Im Zellen, nicht aber nach Transfektion von dnRhoA oder dnRhoB Konstrukten.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle für Western Blot Analysen. (B) Luziferase Aktivitätsmessungen zeigen eine reduzierte AP-1 Aktivität nach Transfektion eines dnRhoC Konstruktes. pcDNA Transfektion diene als Kontrolle.

Zusammenfassend führt der Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin im malignen Melanom zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors ETS-1, welcher wiederum eine Induktion der GTPase RhoC nach sich zieht und in weiterer Folge sowohl die c-Jun Expression als auch die AP-1 Aktivität erhöht.

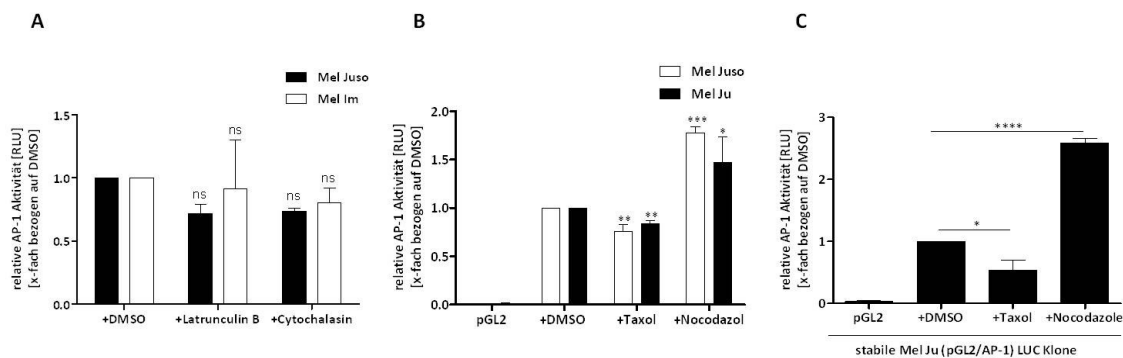


## 4.2 Die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch das Zytoskelett

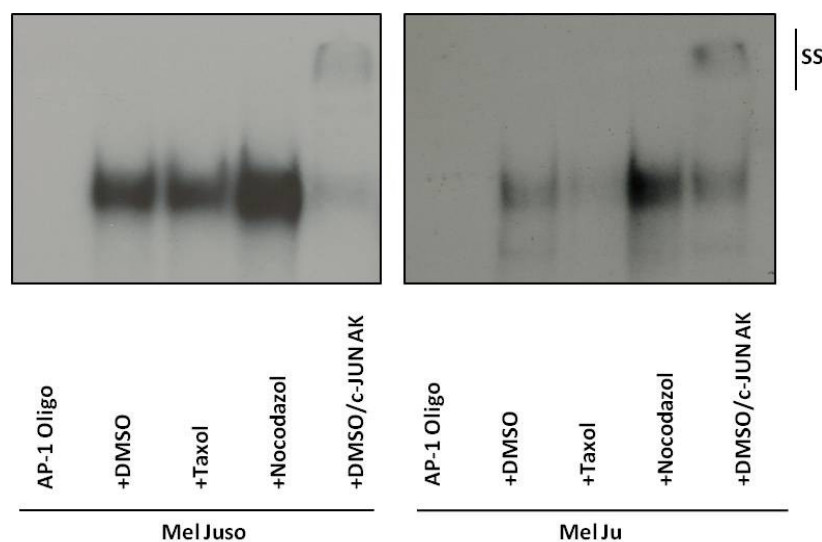
Nachdem die bisherigen Ergebnisse eine Beteiligung der GTPase RhoC an der Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun zeigten, stellte sich die Frage nach dem molekularen Mechanismus dieser detektierten Regulation. RhoGTPasen sind im Allgemeinen Modulatoren der zytoskelettalen Struktur und ermöglichen dadurch eine Signalweiterleitung in der Zelle. Es konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass in epithelialen Zelltypen eine Regulation von c-Jun durch das Zytoskelett stattfindet (Oren, et al. 1999; Polak, et al. 2006). Auch der Verlust von E-Cadherin im malignen Melanom und dessen Wirkung auf c-Jun könnte durch eine regulatorische Wirkung des Zytoskelettes bedingt sein, da der Auf- und Abbau von Zell-Kontakten meist mit Umstrukturierungen des Zytoskeletts verbunden ist. Diese Zusammenhänge ließen vermuten, dass das Zytoskelett an der posttranskriptionellen Regulation von c-Jun beteiligt sein könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Zytoskelett eine regulatorische Wirkung auf die AP-1 Aktivität hat (Spangler, et al. 2012). Der detaillierte molekulare Mechanismus dieser Regulation blieb jedoch ungeklärt und soll im Rahmen der weiteren Untersuchungen genauer analysiert werden. Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse konnten bereits in einer Publikation zusammengefasst werden und stehen kurz vor der Veröffentlichung (Kappelmann et al., 2014; zur Veröffentlichung eingereicht).

### 4.2.1 Die Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts beeinflusst die AP-1 Aktivität im malignen Melanom

Durch den Verlust von E-Cadherin wird eine Umstrukturierung des Zytoskeletts ausgelöst, was in weiteren Schritten zur Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun führen könnte. Dabei ist entscheidend, diejenigen Bestandteile des Zytoskeletts zu identifizieren, welche für die direkte Regulation von c-Jun verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden AP-1 Aktivitätsmessungen durch einen *Reporter Gene Assay* mittels Transfektion eines AP-1 LUC Plasmides in zwei verschiedenen Melanomzelllinien (Mel Juso, Mel Ju bzw. Mel Im) durchgeführt. Diese Zellen wurden mit Reagenzien behandelt, welche zum einen das Aktin-Zytoskelett (Latrunkulin B, Cytochalasin) und zum anderen das Mikrotubuli-Zytoskelett (Taxol, Nocodazol) modulieren. Latrunkulin B und Cytochalasin inhibieren die Aktin-Polymerisation. AP-1 Aktivitätsmessungen nach 4-stündiger Behandlung mit Latrunkulin B bzw. Cytochalasin zeigten keinerlei Effekte auf die AP-1 Aktivität in den verwendeten Melanomzellen (Abbildung 4.5 A). Die Behandlung der Melanomzellen (Mel Juso, Mel Ju) mit Taxol, welches die Mikrotubuli stabilisiert und deren Depolymerisation inhibiert, resultierte in einer verminderten AP-1 Aktivität (Abbildung 4.5 B). Die Behandlung mit Nocodazol, welches die Mikrotubuli destabilisiert und deren Depolymerisation



**Abbildung 4.6: Veränderung der AP-1 Aktivität nach Behandlung mit *Microtubule targeting drugs* (MTDs).** AP-1 Aktivitätsmessungen von (A) Melanomzellen (Mel Juso und Mel Im) nach Latrunculin B- (2µM) und Cytochalasinbehandlung (2µM) (B) Melanomzellen (Mel Juso und Mel Ju) und (C) stabilen Mel Ju pGL2/ AP-1 LUC Klonen nach Taxol- (5µM) bzw. Nocodazolbehandlung (30µM). DMSO diente als Kontrollbehandlung. Der Leervektor pGL3 *basic* wurde als Negativkontrolle für die AP-1 Aktivitätsmessung verwendet.

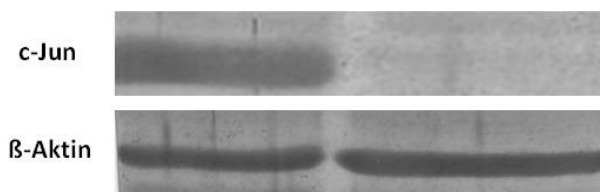


**Abbildung 4.5: Die Behandlung von Melanomzellen mit MTDs beeinflusst die AP-1-DNA Bindungsaktivität durch c-Jun Regulation durch Taxol- bzw. Nocodazolbehandlung.** EMSA mit Kernextrakten von Melanomzellen (Mel Juso, Mel Ju) nach Taxol (5µM)- und Nocodazolbehandlung (30µM). DMSO diente als Kontrollbehandlung. *Supershift*-Experimente (SS) wurden mit einem c-Jun (Upstate) Antikörper durchgeführt.

induziert, resultierte hingegen in einer signifikant gesteigerten AP-1 Aktivität in den Melanomzellen (Abbildung 4.5 B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Mikrotubuli-Zytoskelett, nicht aber das Aktin-Zytoskelett, eine regulatorische Wirkung auf die AP-1 Aktivität hat. Diese Ergebnisse ließen sich analog auch in stabil, mit einem pGL2 bzw. einem AP-1 LUC Plasmid, transfizierten Mel Ju Melanomzellen bestätigen (Abbildung 4.5 C). In *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) konnte in weiterer Folge unter Verwendung der Melanomzelllinien Mel Juso und Mel Ju eine verminderte AP-1 Bindung an die DNA nach Taxolbehandlung und eine

verstärkte DNA Bindung nach Nocodazolbehandlung detektiert werden. Dazu wurde ein Oligonukleotid mit einer AP-1 Konsensussequenz (Promega) verwendet. Der Nachweis, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun maßgeblich an diesem AP-1-DNA Bindungskomplex beteiligt ist, konnte durch ein *Supershift* Experiment (SS) mit einem c-Jun Antikörper (Upstate) erbracht werden (Abbildung 4.6).

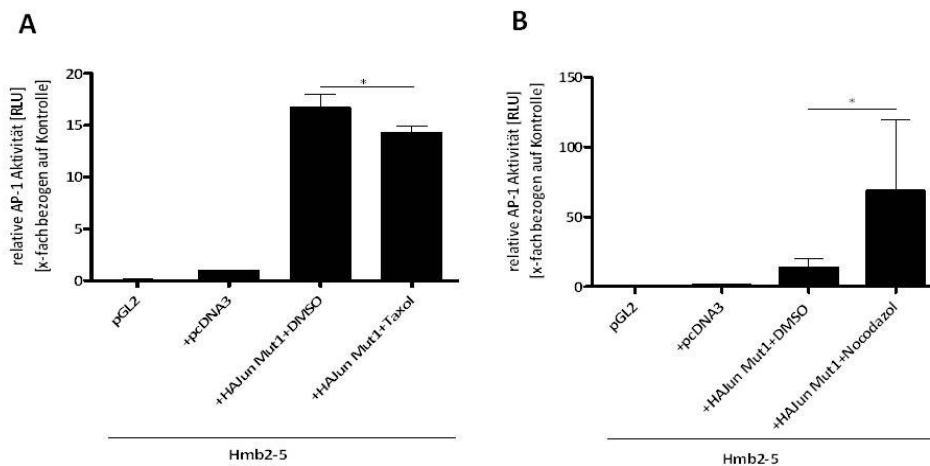
In weiteren Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Beeinflussung der AP-1 Aktivität durch MTDs c-Jun spezifisch ist. Dazu wurde ein Melanozyten-ähnliches Modellsystem verwendet, die sogenannten Hmb2-5 Zellklone. Diese wurden in unserer Arbeitsgruppe generiert



**Abbildung 4.7: Hmb2-5 Zellklone als Melanozyten-ähnliches Modellsystem.**

Western Blot Analysen zeigen einen Verlust der c-Jun Expression in Hmb2-5 Zellklonen im Vergleich zu normalen Hmb2 Melanomzellen.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

und weisen einen Verlust von *melanoma inhibitory activity* (MIA) auf (Poser, et al. 2004). Anhand von Western Blot Analysen konnte im Vergleich zu Hmb2 Melanomzellen ein nahezu gänzlicher Verlust der c-Jun Protein Expression in diesem Modellsystem identifiziert werden (Abbildung 4.7). Diese Hmb2-5 Zellklone wurden mit einem HA-tagged c-Jun Expressionskonstrukt (HAJun MUT 1)

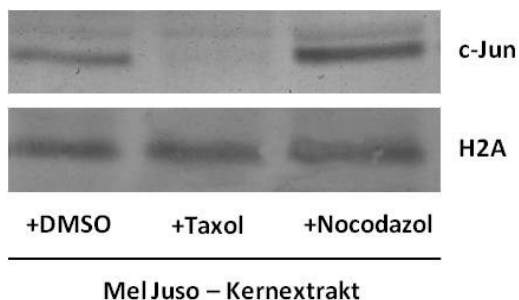


**Abbildung 4.8: Veränderung der AP-1 Aktivität nach Behandlung mit MTDs ist c-Jun spezifisch.**

AP-1 Aktivitätsmessung nach HA-Jun MUT1 Transfektion von Hmb2-5 Zellklonen und anschließender (A) Taxol (5 $\mu$ M)- bzw. (B) Nocodazolbehandlung (30 $\mu$ M). Die c-Jun induzierte AP-1 Aktivität zeigt eine signifikante Abnahme nach Taxolbehandlung und eine signifikante Zunahme nach Nocodazolbehandlung. DMSO diente als Kontrollbehandlung. Der Leervektor pGL2 *basic* wurde als Negativkontrolle für die AP-1 Aktivitätsmessung verwendet. pcDNA3 Transfektion diente ebenso als Negativkontrolle für die HAJun MUT1 Transfektion.

und einem AP-1 LUC Plasmid ko-transfiziert und anschließend mit Taxol bzw. Nocodazol behandelt. In AP-1 Aktivitätsmessungen konnte eine durch c-Jun induzierte AP-1 Aktivität detektiert werden, welche nach Taxolbehandlung abnahm (Abbildung 4.8 A) und nach Nocodazolbehandlung anstieg (Abbildung 4.8 B).

Nachdem festgestellt werden konnte, dass die Beeinflussung der AP-1 Aktivität mit Inkubation der MTDs durch die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun bedingt ist, wurden Kernextrakte aus mit Taxol- bzw. Nocodazol behandelten Melanomzellen (Mel Juso) gewonnen und Western Blot Analysen mit diesen Kernextrakten durchgeführt. Es konnte ein nahezu gänzlicher Verlust von c-Jun im Kern nach Taxolbehandlung detektiert werden, wohingegen c-Jun nach Nocodazolbehandlung anstieg (Abbildung 4.9).

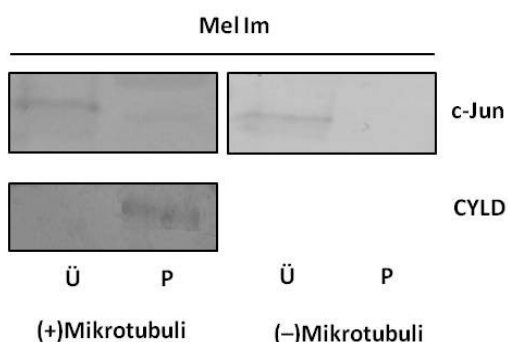


**Abbildung 4.9: Effekte der MTD Behandlung auf die c-Jun Kernlokalisierung.** Western Blot Analysen von Kernextrakten aus Taxol-bzw. Nocodazol behandelten Mel Juso Zellen. Die c-Jun Proteinlokalisierung im Kern nimmt nach Taxolbehandlung (5 $\mu$ M) ab und wird nach Nocodazolbehandlung (30 $\mu$ M) induziert. H2A diente als Ladekontrolle für Kernextrakte.

Zusammenfassend wiesen diese Ergebnisse eindeutig auf eine regulatorische Wirkung der Mikrotubuli auf die c-Jun Expression, c-Jun Aktivität und auf die Lokalisation von c-Jun im Kern hin. In nachfolgenden Analysen soll der molekulare Mechanismus dieser Regulation von c-Jun durch das Mikrotubuli-Zytoskelett genauer dargestellt werden.

#### 4.2.2 Der Transkriptionsfaktor c-Jun interagiert mit monomerem $\alpha$ -Tubulin

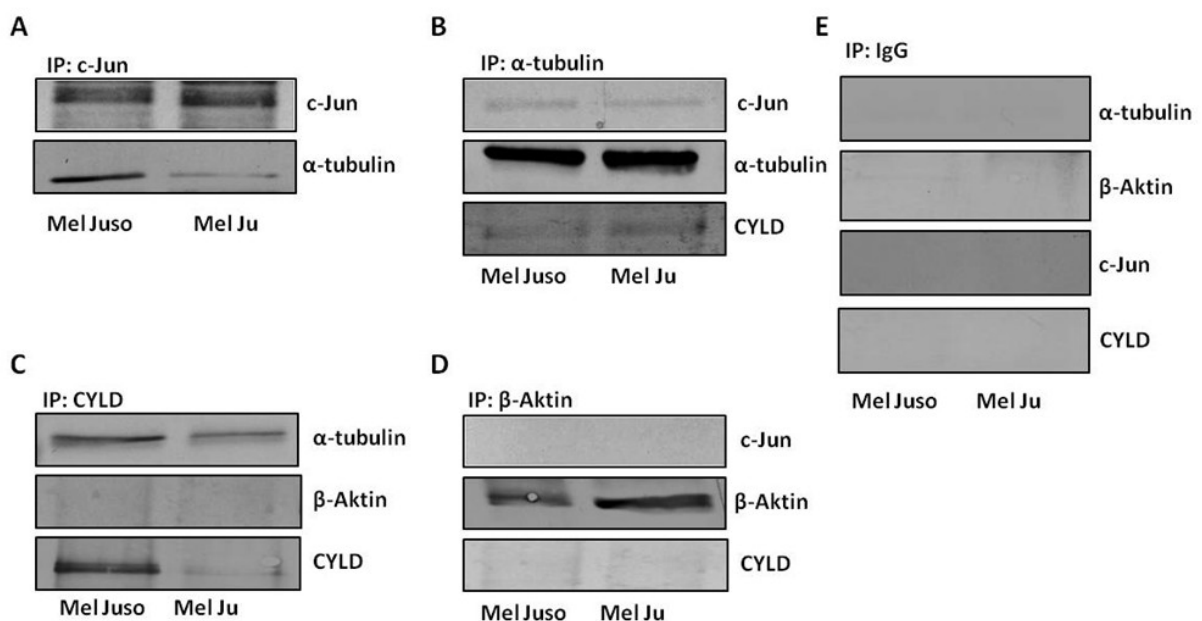
Um zu klären, wie das Mikrotubuli-Zytoskelett den Transkriptionsfaktor c-Jun reguliert, wurde nach einer direkten Interaktion zwischen Mikrotubuli und c-Jun gesucht. Dabei wurden zwei



**Abbildung 4.10: c-Jun interagiert nicht direkt mit polymerisierten Mikrotubuli.** *Microtubuli Spin Down Assay* mit Proteinlysate aus Melanomzellen (Mel Im). Western Blot Analysen nach *Spin Down* des Pellets (P) und des Überstandes (Ü) zeigten keine Anreicherung von c-Jun im Pellet und folglich keine Interaktion mit polymerisierten Mikrotubuli. Western Blot Analysen gegen CYLD dienen als Positivkontrolle für eine Mikrotubuli Interaktion.

Möglichkeiten der Interaktion in Betracht gezogen, zum einen die Bindung an polymerisiertes Tubulin oder aber an monomeres Tubulin. Der Interaktionsnachweis zwischen polymerisiertem Mikrotubuli und c-Jun wurde anhand eines *Microtubule Spin Down Assays* durchgeführt. Dieser zeigte keine Bindung von c-Jun an die polymerisierten Mikrotubuli. Das Tumorsuppressor Protein CYLD (*Cylindromatosis Gen*) fungierte in diesem Experiment als Positivkontrolle für ein an polymerisiertes Tubulin bindendes Protein (Gao, et al. 2008) (Abbildung 4.10).

Demnach wurde eine Interaktion zwischen c-Jun und monomerem Tubulin genauer untersucht. Diesbezüglich wurden Immunpräzipitationen mit Proteinlysaten aus Melanomzellen (Mel Juso, Mel Ju) durchgeführt, welche zeigten, dass c-Jun an monomeres  $\alpha$ -Tubulin bindet (Abbildung 4.11 A). Diese Interaktion konnte auch nach Ko-Immunpräzipitation mit einem anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper bestätigt werden (Abbildung 4.11 B). Auch hier diente CYLD als Positivkontrolle für eine  $\alpha$ -Tubulin Bindung (Abbildung 4.11 C). Sowohl  $\beta$ -Aktin (Abbildung 4.11 D) als auch IgG (Abbildung 4.11 E) sind Negativkontrollen für eine Tubulin bzw. c-Jun Bindung.

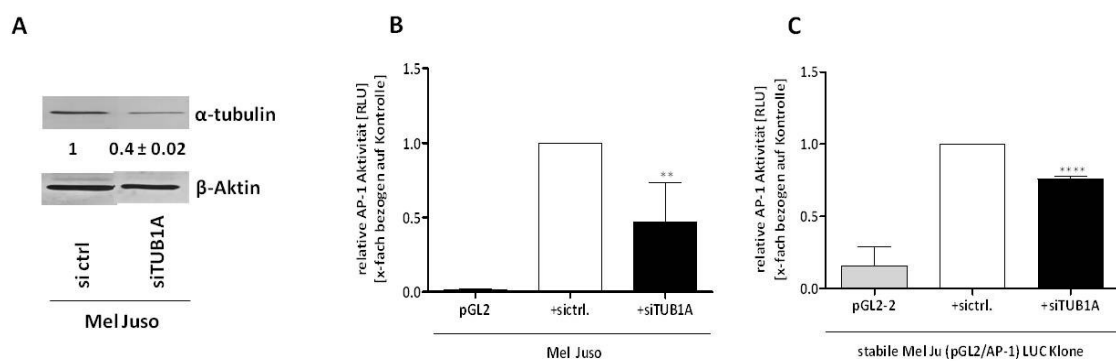


**Abbildung 4.11: c-Jun interagiert mit monomerem  $\alpha$ -Tubulin.** Immunpräzipitationen mit Proteinlysaten aus den Melanomzellen Mel Juso und Mel Ju mit einem (A) anti-c-Jun Antikörper, (B) anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper, (C) anti-CYLD Antikörper, (D) anti- $\beta$ -Aktin Antikörper und einem (E) anti-IgG Antikörper. Western Blot Analysen der Präzipitate zeigen Interaktionen zwischen c-Jun und  $\alpha$ -Tubulin (A, B). Die Immunpräzipitation mit einem anti-CYLD Antikörper diente als Positivkontrolle für eine  $\alpha$ -Tubulin Bindung. Die Immunpräzipitation mit einem anti- $\beta$ -Aktin Antikörper dienten als Negativkontrollen für eine CYLD bzw. c-Jun Bindung. Die Immunpräzipitation mit anti-IgG dient als Negativkontrolle.

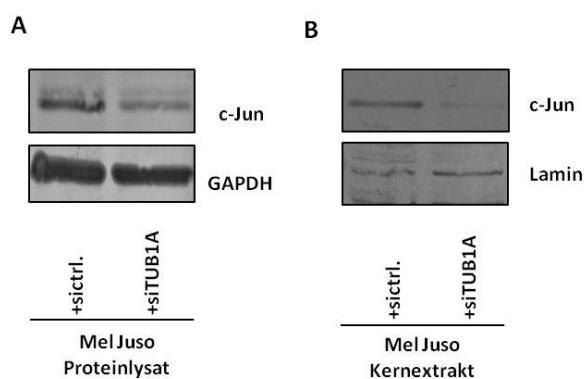
#### 4.2.3 $\alpha$ -Tubulin moduliert die c-Jun Expression und AP-1 Aktivität

In weiteren Experimenten sollten nun die funktionellen Effekte der detektierten c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin Interaktion untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zu Beginn die siRNA Transfektionseffizienz nach siTUB1A-Transfektion kontrolliert (Abbildung 4.12 A). Anschließend wurden AP-1 Aktivitätsmessungen durchgeführt, die sowohl in Melanomzellen (Mel Juso) (Abbildung 4.12 B) als auch in stabilen Mel Ju AP-1/ pGL2 LUC Klonen (Abbildung 4.12 C) eine signifikant verminderte AP-1 Aktivität nach  $\alpha$ -Tubulin *Knockdown* aufwiesen.

Des Weiteren zeigte sich sowohl eine Abnahme der c-Jun Proteinexpression (Abbildung 4.13 A) als auch der c-Jun Protein Lokalisation im Kern (Abbildung 4.13 B) nach  $\alpha$ -Tubulin *Knockdown*.



**Abbildung 4.12:  $\alpha$ -Tubulin *Knockdown* führt zu einer verminderten AP-1 Aktivität in Melanomzellen.** (A) Western Blot nach Kontroll (si ctrl.)- und siTUB1A-Transfektion von Mel Juso Proteinlysaten.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Densitometrische Auswertung der Western Blots via ImageJ. AP-1 Aktivitätsmessung mit den Melanomzellen (B) Mel Juso und (C) stabilen Mel Ju AP-1/ pGL2 LUC Klonen nach Kontroll- und siTUB1A- Transfektion. Der Leervektor pGL2 *basic* wurde als Negativkontrolle für die AP-1 Aktivitätsmessung verwendet.

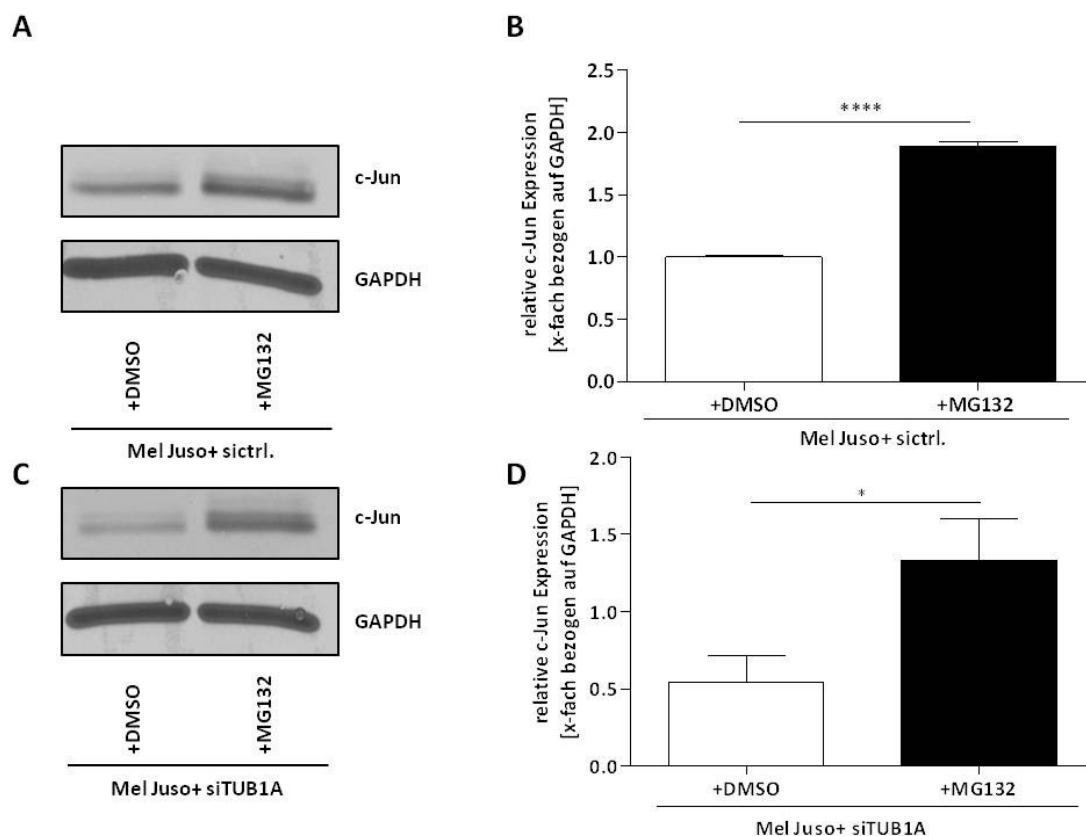


**Abbildung 4.13:  $\alpha$ -Tubulin *Knockdown* führt zu einer verminderten c-Jun Protein Expression und Kernlokalisierung.** Western Blot nach Kontroll (si ctrl.)- und siTUB1A-Transfektion von (A) Proteinlysaten und (B) Kernextrakten. GAPDH diente als Ladekontrolle für Western Blot Analysen mit Proteinlysaten. Lamin diente als Ladekontrolle für Western Blot Analysen mit Kernextrakten.

Zusammenfassend konnten  $\alpha$ -Tubulin-abhängige Effekte auf die AP-1 Aktivität, c-Jun Expression und c-Jun Lokalisation im Kern detektiert werden.

#### 4.2.4 $\alpha$ -Tubulin fungiert als Stabilisator des Transkriptionsfaktors c-Jun

Die bisherigen Ergebnisse wiesen auf eine essentielle Rolle der  $\alpha$ -Tubulin/c-Jun Interaktion im malignen Melanom hin und führten zu der Annahme, dass monomeres  $\alpha$ -Tubulin an der Stabilisierung von c-Jun beteiligt ist. Um dies zu bestätigen, wurden Western Blots mit Proteinlysaten aus kontrolltransfizierten Melanomzellen (Mel Juso) (Abbildung 4.14 A & B) und aus  $\alpha$ -Tubulin *Knockdown* Lysaten (Abbildung 4.14 C & D) durchgeführt. Diese wurden nach der transienten Transfektion (nach 72h) mit MG132 (16h; 30 $\mu$ M) behandelt, ein Substrat, welches das Proteasom inhibiert und somit den Proteinabbau verhindert. Western Blot Analysen zeigten eine Reduktion der c-Jun Proteing Gesamtmenge nach  $\alpha$ -Tubulin *Knockdown*. Diese Verringerung von c-Jun konnte durch zusätzliche MG132 Behandlung wieder annähernd aufgehoben werden (Abbildung 4.14 C & D). Somit konnte bestätigt werden, dass monomeres  $\alpha$ -Tubulin für die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors c-Jun im malignen Melanom verantwortlich ist. Die Western Blots wurden anhand des Programms ImageJ densitometrisch ausgewertet (Abbildung 4.14 B & D).

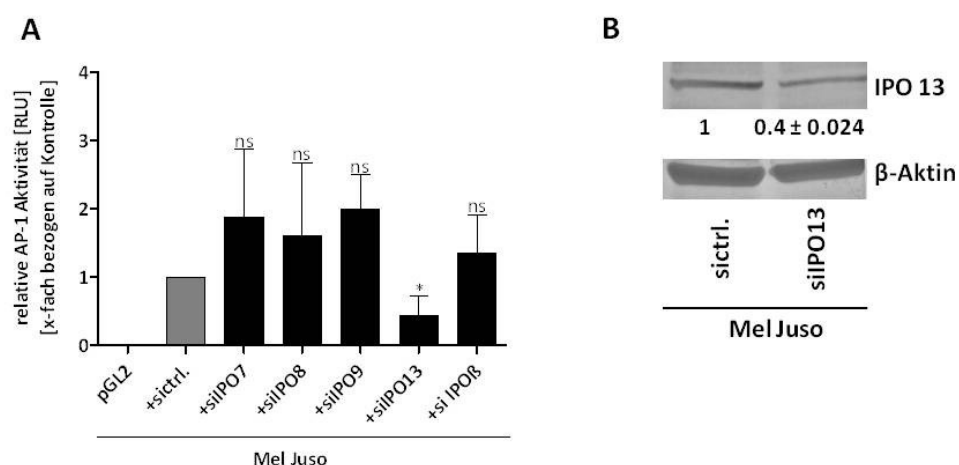


**Abbildung 4.14:  $\alpha$ -Tubulin stabilisiert c-Jun im Melanom.** MG132 (Proteasom Inhibitor) Behandlung (30 $\mu$ M) von (A & B) kontrolltransfizierten (sic) und (C & D) siTUB1A-transfizierten Melanomzellen (Mel Juso). (A & C) Western Blot Analysen mit einem c-Jun Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle für Western Blot Analysen mit Proteinlysaten. (B & D) Densitometrische Auswertung der Western Blots via ImageJ.

#### 4.2.5 Importin 13 vermittelt den c-Jun Kernimport im malignen Melanom

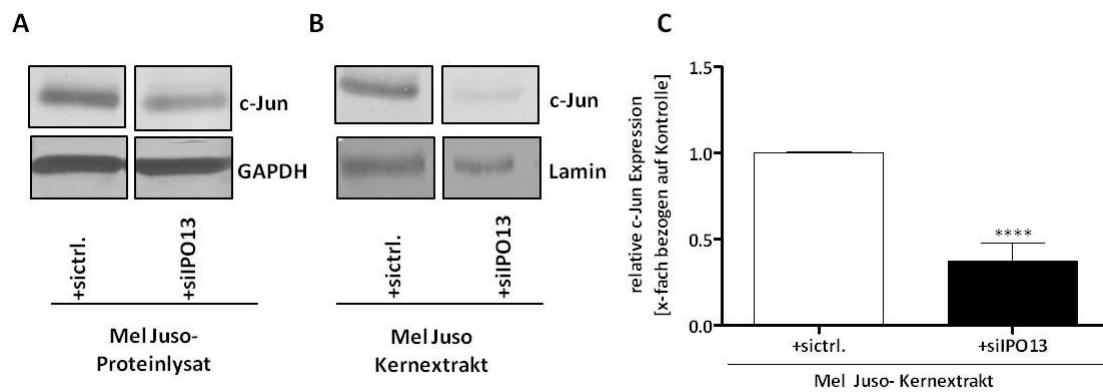
Da in den vorangegangenen Versuchen eine  $\alpha$ -Tubulin-abhängige verminderte c-Jun Lokalisation im Kern detektiert werden konnte, stellte sich die Frage, ob  $\alpha$ -Tubulin am c-Jun Kernimport beteiligt ist. Zu Beginn wurden verschiedene Importine untersucht, welche für den c-Jun Kernimport im malignen Melanom verantwortlich sein könnten. Literaturrecherchen ergaben eine Relevanz der Importine 7, 8, 9, 13 und Importin  $\beta$ , welche nachweislich am c-Jun Kernimport in verschiedenen Tumorzellen beteiligt sind (Waldmann, et al. 2007). In AP-1 Aktivitätsmessungen nach *Knockdown* der verschiedenen Importine konnte Importin 13 (IPO13) als relevantes Importin für die AP-1 Aktivität im malignen Melanom identifiziert werden. Es zeigte sich eine signifikant verminderte AP-1 Aktivität nach IPO13 *Knockdown* verglichen mit den Effekten auf die AP-1 Aktivität nach *Knockdown* der anderen Importine (IPO7, IPO8, IPO9, IPO $\beta$ ) (Abbildung 4.15 A). Die siRNA Transfektionseffizienz nach siIPO13-Transfektion wurde durch Western Blot Analysen der IPO13-*Knockdown* Proteinlysate aus Mel Juso Zellen kontrolliert (Abbildung 4.15 B).

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob IPO13 für den Transport des Transkriptionsfaktors c-Jun in den Kern verantwortlich ist. Dafür wurden aus der Melanomzelllinie Mel Juso nach IPO13 *Knockdown* Gesamtproteinlysate und Kernextrakte gewonnen und in Western Blot Analysen auf ihren c-Jun Proteingehalt hin untersucht. Die c-Jun Gesamtproteinmenge nach IPO13 *Knockdown* zeigte eine leichte Abnahme (Abbildung 4.16 A), wohingegen die c-Jun Kernlokalisierung in IPO13 defizienten Proben stark reduziert war (Abbildung 4.16 B). Folglich konnte IPO13 als Transporter für den Transkriptionsfaktor c-Jun bestätigt werden. Die densitometrische Auswertung der Western Blots (Abbildung 4.15 B) erfolgte durch das Programm ImageJ (Abbildung 4.16 C).

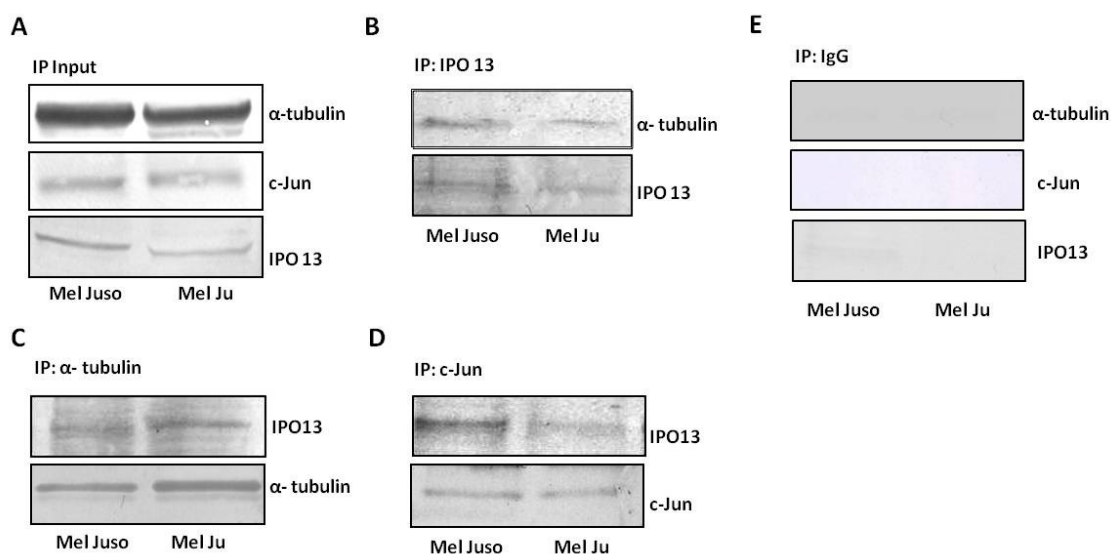


**Abbildung 4.15: Importin 13 (IPO13) beeinflusst die AP-1 Aktivität im malignen Melanom.** (A) Western Blot nach Kontroll (sictrl.)- und siIPO13-Transfektion von Mel Juso Proteinlysaten.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle. Densitometrische Auswertung der Western Blots via ImageJ. (B) AP-1 Aktivitätsmessungen nach Importin *Knockdown* (96h) in Mel Juso Zellen. siRNA Kontrolltransfektionen (sictrl.) dienen als Negativkontrolle für die siRNA Importin (siIPO7, siIPO8, siIPO9, siIPO13 und si IPO  $\beta$ ) Transfektionen. Der Leervektor pGL2 *basic* wurde als Negativkontrolle für die AP-1 Aktivitätsmessung verwendet.





**Abbildung 4.16: IPO13 vermittelt den c-Jun Kernimport in Melanomzellen.** (A) Western Blot Analysen aus Mel Juso Kernextrakten nach IPO13 *Knockdown* zeigen eine Reduktion der c-Jun Kernlokalisation im Vergleich zur Kontrolltransfektion (sictrl.). Lamin diente als Ladekontrolle für Western Blot Analysen mit Kernextrakten. (B) Densitometrische Auswertung der Western Blots via ImageJ.



**Abbildung 4.17: IPO13 interagiert mit c-Jun und α-Tubulin.** Immunpräzipitationen mit (A) Proteinlysaten aus den Melanomzellen Mel Juso und Mel Ju mit einem (B) anti-IPO13 Antikörper, (C) anti-c-Jun Antikörper, (D) anti-α-Tubulin Antikörper und einem (E) anti-IgG Antikörper. Western Blot Analysen der Präzipitate zeigen Interaktionen zwischen IPO13, c-Jun und α-Tubulin. Die Immunpräzipitation mit anti-IgG dient als Negativkontrolle.

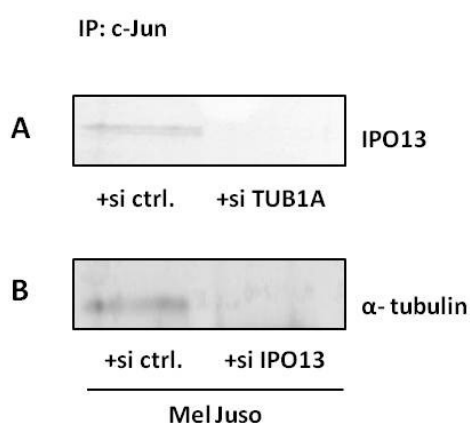
Demnach stellte sich nun die Frage, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen den detektierten α-Tubulin/c-Jun und IPO13/c-Jun Interaktionen besteht. Um dies zu klären, wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Ko-Immunpräzipitation mit einem anti-IPO13 Antikörper zeigte eine Interaktion zwischen IPO13 und α-Tubulin (Abbildung 4.17 B), welche auch durch Ko-Immunpräzipitation mit einem α-Tubulin Antikörper validiert werden konnte (Abbildung 4.17 C). Darüberhinaus konnte durch Immunpräzipitation mit einem anti-c-Jun Antikörper eine Interaktion zwischen c-Jun und IPO13 detektiert werden (Abbildung 4.17 D). Aufgrund der bereits

geringen c-Jun Proteinmenge, welche in Western Blot Analysen der Input Lysate detektiert wurde (Abbildung 4.17 A), konnte eine Interaktion zwischen c-Jun und IPO13 nicht durch Immunpräzipitation mit einem anti-IPO13 Antikörper nachgewiesen werden, da in diesem Fall die Detektionsgrenze durch Western Blot Analysen erreicht wurde. Die Spezifität der Ko-Immunpräzipitationen wurde durch gleichzeitige IgG Kontroll-Immunpräzipitationen gewährleistet (Abbildung 4.17 E).

Folglich konnte angenommen werden, dass es zu einer Komplexbildung zwischen den drei Komponenten IPO13/c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin im malignen Melanom kommt. In weiteren Versuchen soll aufgezeigt werden, wie sich dieser Komplex zusammensetzt und welche Funktion dieser im malignen Melanom einnimmt.

#### 4.2.6 Die Importin 13/c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin Interaktion

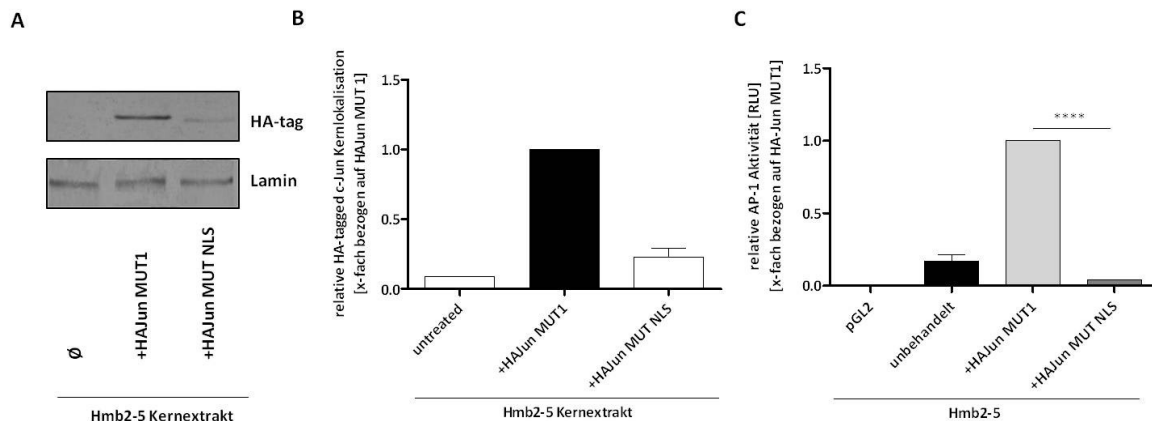
Es konnte bereits gezeigt werden, dass die detektierte Interaktion zwischen IPO13/c-Jun dem Kernimport von c-Jun dient und die c-Jun/ $\alpha$ -tubulin Interaktion der Stabilisierung des Transkriptionsfaktors. Jedoch ist die Zusammensetzung des Komplexes noch ungeklärt. Deshalb sollten anhand von  $\alpha$ -Tubulin- bzw. IPO13- *Knockdown*-Experimenten und anschließender Immunpräzipitation die Zusammensetzung des Komplexes geklärt werden. Es zeigte sich in Western Blot Analysen nach Immunpräzipitation mit einem anti-c-Jun Antikörper, dass im Vergleich zur Kontrolltransfektion (sictrl.) nach  $\alpha$ -Tubulin *Knockdown* keine Interaktion zwischen c-Jun und IPO13 mehr detektierbar ist (Abbildung 4.18 A). Analog dazu konnte auch nach IPO13 *Knockdown* keine c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin Interaktion mehr nachgewiesen werden (Abbildung 4.18 B).



**Abbildung 4.18: Interaktionsverlust von IPO13/c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin nach IPO13 bzw.  $\alpha$ -Tubulin *Knockdown*.** Immunpräzipitation nach Transfektion von siRNAs gegen (A)  $\alpha$ -Tubulin (siTUB1A) und (B) Importin 13 (siIPO13) im Vergleich zur Kontrolle (sictrl.) mit einem anti-c-Jun Antikörper. Die Interaktion zwischen c-Jun und IPO13 bzw.  $\alpha$ -Tubulin ist nach  $\alpha$ -Tubulin bzw. IPO13 *Knockdown* in Western Blot Analysen der Präzipitate nicht mehr detektierbar.

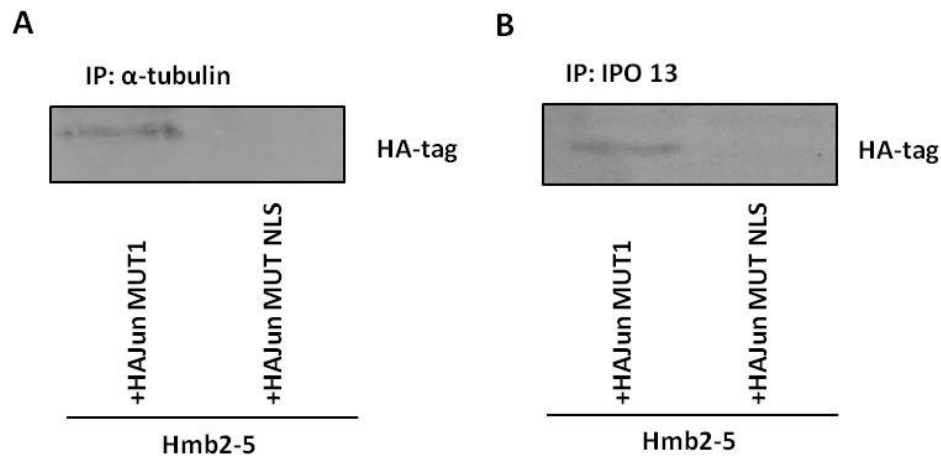
Diese Ergebnisse weisen auf eine abhängige Komplexbildung dieser drei Komponenten hin. Um die direkte Bindung von IPO13 an c-Jun zu bestätigen, wurde in weiterer Folge ein HA-tagged c-Jun Expressionskonstrukt (HAJun MUT 1; siehe Material & Methoden 6.1.7) an der *Nuclear*

*Localization Sequence* (NLS) mutiert (HAJun MUT NLS) (siehe Kapitel 6.1.7; Material und Methoden). Die Sequenz wurde so gewählt, dass entsprechende Adaptormoleküle nicht mehr binden können (z.B. Importin  $\alpha$ ) und folglich auch keine weiteren Importine, die dann das jeweilige Protein in den Kern transportieren würden. Nachfolgende Versuche wurden mit dem



**Abbildung 4.19: Mutation der Nuclear Localization Sequenz führt zu einer Reduktion der c-Jun Kernlokalisierung und der AP-1 Aktivität.** (A) Western Blot Analysen von Kernextrakten aus Hmb2-5 Zellen nach HAJun MUT1 und HAJun MUT NLS Transfektion mit HA-tag Antikörper. Lamin diente als Ladekontrolle für Kernextrakte. (B) Denistometrische Auswertung des Western Blots via ImageJ. (C) AP-1 Aktivitätsmessungen nach HAJun MUT1 und HAJun MUT NLS Transfektion. Der Leervektor pGL2 *basic* wurde als Negativkontrolle für die AP-1 Aktivitätsmessung verwendet.

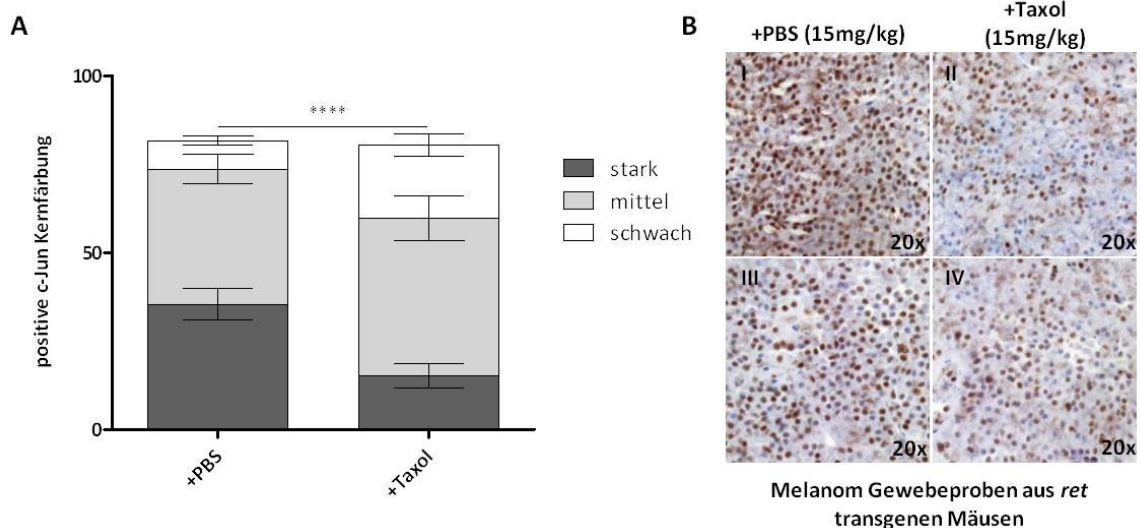
Melanozyten-ähnlichen Modellsystem (Kapitel 4.2.1), den Hmb2-5 Zellklonen, durchgeführt. Nach Mutation der NLS konnte in Western Blot Analysen mit Kernextrakten aus den Hmb2-5 Zellklonen nach Transfektion des Konstruktes nur noch sehr wenig exogenes c-Jun im Kern detektiert werden (Abbildung 4.19 A & B). Darüber hinaus konnte in AP-1 Aktivitätsmessungen keine AP-1 Aktivität durch das HAJun MUT NLS Konstrukt im Vergleich zur Kontrolle (HAJun MUT 1) induziert werden (Abbildung 4.19 C). Des Weiteren wurden Immunpräzipitationen mit HAJun MUT 1 bzw. HAJun MUT NLS transfizierten Hmb2-5 Proteinlysaten durchgeführt. In Western Blot Analysen der Präzipitate konnte der Verlust der c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin Interaktion durch die Mutation der NLS nachgewiesen werden (Abbildung 4.20 A). Auch die c-Jun/IPO13 Interaktion ist durch die Mutation der NLS nicht mehr möglich (Abbildung 4.20 B).



**Abbildung 4.20: Mutation der Nuclear Localization Sequenz führt zu einer Inhibition der c-Jun/IPO13 bzw.  $\alpha$ -Tubulin Interaktion.** Western Blot Analysen der HAJun MUT1 bzw. HAJun MUT1/MUT NLS transfizierten Hmb2-5 Proteinlysate nach Immunpräzipitation mit einem (A) anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper bzw. einem (B) anti-IPO13 Antikörper gegen anti-HA-tagged c-Jun.

#### 4.2.7 Molekulare Funktion der c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin Interaktion *in vivo*

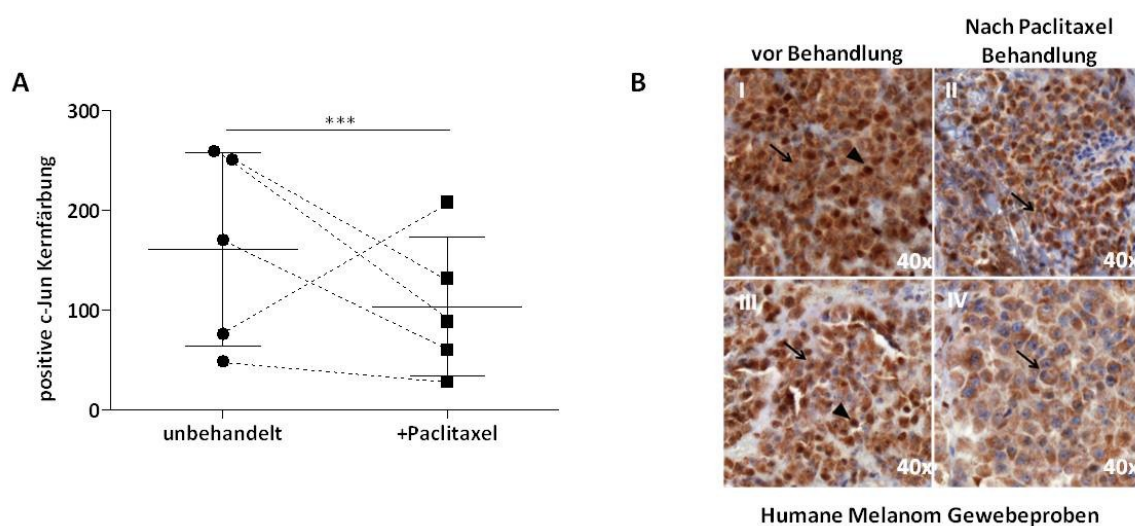
In *in vivo* Experimenten sollte die Relevanz der Beeinflussung des Transkriptionsfaktors c-Jun durch das Mikrotubuli-Zytoskelett im murinen und humanen System nochmals genauer analysiert werden. Dazu wurde zum einen Melanomgewebe aus *ret* transgenen Mäusen isoliert, welche entweder mit Taxol (15mg/kg) oder zur Kontrolle mit PBS behandelt wurden. Die Injektionen



**Abbildung 4.21: Taxolbehandlung führt zu einer verminderten c-Jun Kernlokalisation *in vivo*.** Immunhistochemie von Melanomgewebe aus *ret* transgenen Mäusen nach PBS (Kontrolle) und Taxol (15 mg/kg) Behandlung mit einem anti-c-Jun Antikörper. Die Injektionen erfolgten zweimal täglich (Tag 0-5). Die c-Jun Lokalisation im Kern zeigt eine signifikante Reduktion nach Taxolbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Auszählung der c-Jun Färbung erfolgte unter Einteilung in die Kategorien: starke Kernfärbung, moderate Kernfärbung (mittel) und schwache bis gar keine Kernfärbung (schwach). Vergrößerung 20x.

erfolgten über 5 Tage hinweg zweimal täglich. Dabei wurden 5 Kontrollmäuse mit PBS und 4 Mäuse mit Taxol behandelt. Nach insgesamt 7 Tagen wurden die Melanomgewebeprobe aus den Tieren isoliert und in Paraffin eingebettet (siehe Kapitel 6.2.6; Material und Methoden). Anhand immunhistochemischer Färbung mit einem anti-c-Jun Antikörper konnte eine eindeutige Reduktion der c-Jun Lokalisation im Kern nach Taxolbehandlung detektiert werden, was die bisherigen *in vitro* Daten bestätigt (Abbildung 4.21 A & B). Dieses Ergebnis zeigte sich auch durch immunhistochemische Färbungen von c-Jun von humanen Melanomgewebeprobe aus Patienten vor und nach Taxolbehandlung (Abbildung 4.22 A & B). Dabei handelte es sich um Melanomgewebe-Paare aus 5 verschiedenen Patienten. Die immunhistochemischen Färbungen wurden von einer Pathologin klassifiziert. Die Resultate weisen auf eine zentrale Bedeutung der detektierten c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin Interaktion und deren Inhibition durch Taxolbehandlung im malignen Melanom hin.



**Abbildung 4.22: Taxolbehandlung führt zu einer verminderten c-Jun Kernlokalisierung *in vivo*.** Immunhistochemie von 5 humanen Melanom-Gewebeprobe vor und nach Taxolbehandlung mit einem anti-c-Jun Antikörper zeigten eine signifikante Reduktion der c-Jun Kernlokalisierung nach Taxolbehandlung. Vergrößerung 40x.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Mikrotubuli-Zytoskelett ein Regulator des Transkriptionsfaktors c-Jun ist. Durch eine Interaktion mit monomerem  $\alpha$ -Tubulin wird c-Jun im Melanom stabilisiert, was eine Steigerung der AP-1 Aktivität, AP-1-DNA Bindungsaktivität und c-Jun Akkumulation im Kern zur Folge hat. Darüberhinaus konnte Importin 13 als Mediator des c-Jun Kernimport im malignen Melanom identifiziert werden, welches ebenfalls eine Interaktion mit c-Jun und  $\alpha$ -Tubulin aufweist. Weitere Analysen bestätigten, dass diese detektierte Interaktion zwischen c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin/Importin 13 von allen drei Faktoren und der *Nuclear Localization Sequence* von c-Jun abhängig ist.

### 4.3 Die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch microRNAs

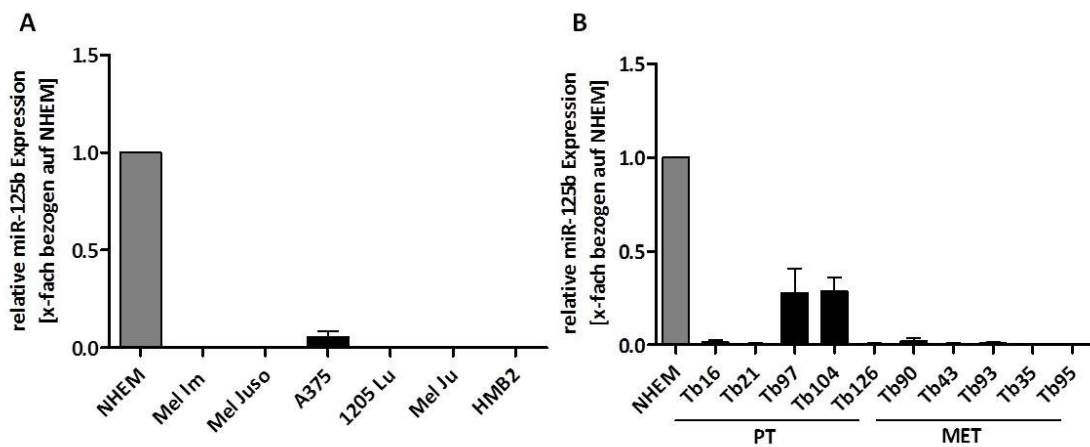
Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird (Spangler, et al. 2011). Dieser Regulationsmechanismus sollte im Rahmen dieser Arbeit näher analysiert werden. Einige Publikationen beschrieben das Phänomen der Protein-Regulation durch miRNAs (Chen, et al. 2010; Deng, et al. 2011), woraufhin die Hypothese aufgestellt wurde, dass c-Jun eventuell durch eine spezifische miRNA posttranskriptionell reguliert werden könnte. Durch computerbasierte Sequenzanalysen ließen sich zwei *seed*-Sequenzen im kodierenden Bereich von c-Jun für die miRNAs miR-125b und miR-527 identifizieren. In nachfolgenden Versuchen soll gezeigt werden, ob die identifizierten miRNAs im malignen Melanom im Vergleich zu normalen Melanozyten dereguliert vorliegen und ob sie eine regulatorische Wirkung auf den Transkriptionsfaktor c-Jun aufweisen. Die Ergebnisse bezüglich der Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch die miR-125b im malignen Melanom konnten bereits erfolgreich veröffentlicht werden (Kappelman, et al. 2013b).

#### 4.3.1 Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch miRNAs

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Regulation durch miRNAs sowohl durch Bindung in der 3'-oder 5'-UTR (untranslated region), als auch in der kodierenden Sequenz der Ziel-mRNA möglich ist. Dabei kann die Regulation über die Bindung einer miRNA in diesen Bereichen auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene erfolgen (Janga and Vallabhaneni 2011; Meister and Tuschl 2004; Vasudevan 2012). Die Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation durch miRNAs ließ vermuten, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun durch miRNAs reguliert werden könnte. Durch *in silico* Analysen anhand des Programms miRWalk (<http://www.umm.uniheidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>), konnten potentielle Bindestellen für die miRNAs miR-125b (CTCAGGGA) und miR-527 (GAGGGCTTCG) in der kodierenden Region der c-Jun mRNA identifiziert werden. Diese miRNAs wurde in weiterer Folge auf ihren Expressionsstatus im malignen Melanom im Vergleich zu normalen Melanozyten hin untersucht.

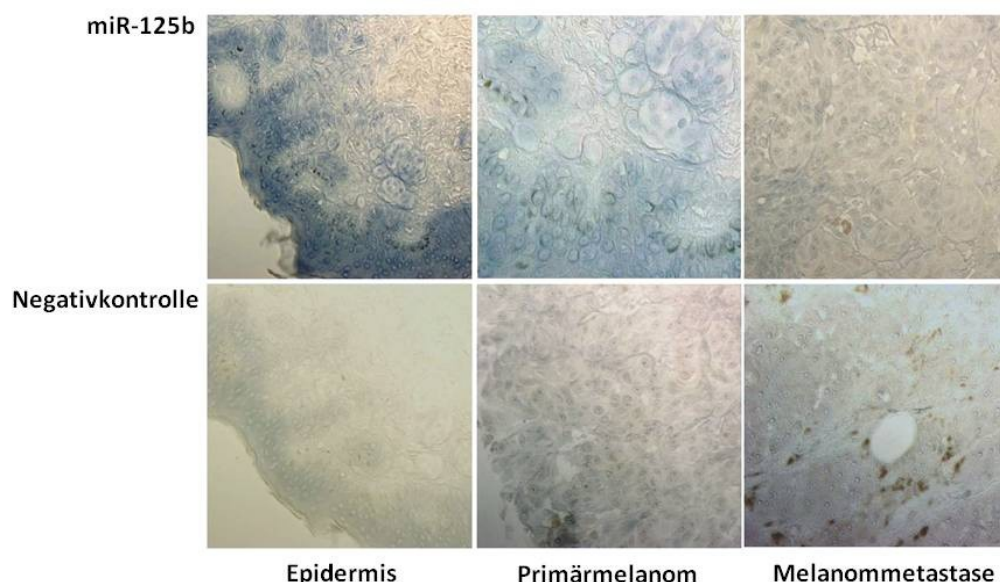
#### 4.3.2 Fehlregulation der miR-125b im malignen Melanom

Durch die Analyse eines *microRNA Array's* (Agilent) (Mueller and Bosserhoff 2009) zeigte sich eine deutliche Fehlregulation der miR-125b in den Melanomzellen verglichen mit normalen Melanozyten. Dies konnte in Expressionsanalysen via qRT-PCR von sechs verschiedenen Melanomzelllinien (Mel Im, Mel Juso, A375, 1205 Lu, Mel Ju, Hmb2) (Abbildung 4.23 A) und von Gewebeproben aus Primärmelanomen (Tb16, Tb21, Tb97, Tb 104, Tb126), als auch



**Abbildung 4.23: Relative miR-125b Expression in Melanomzelllinien und Melanomgewebe.** (A) miR Expressionsanalysen via qRT-PCR der miR-125b in sechs Melanomzelllinien (Mel Im, Mel Juso, A375, 1205 Lu, Mel Ju, Hmb2). Normale Melanozyten (NHEMs) dienen als Positivkontrolle. (B) miR Expressionsanalysen via qRT-PCR der miR-125b in Gewebeproben aus Primärmelanomen (PT) und Melanommetastasen (MET). Normale Melanozyten (NHEMs) dienen als Positivkontrolle. Die Expression der miR-125b ist im malignen Melanom signifikant reduziert.

Melanommetastasen (Tb90, Tb43, Tb93, Tb35, Tb95) (Abbildung 4.23 B) bestätigt werden. Die miR-125b ist demnach im malignen Melanom signifikant reduziert. Eine Fehlregulation der miR-527 im malignen Melanom konnte aufgrund der oben beschriebenen Expressionsanalysen ausgeschlossen werden. Demnach wurden weitere Analysen bezüglich der miR-527 an dieser Stelle eingestellt.



**Abbildung 4.24: Die miR-125b ist im malignen Melanom fehlreguliert.** *In-situ* Hybridisierung zur Detektion der miR-125b in Gewebeproben aus normaler Epidermis, Primärmelanom und Melanommetastase. Die miR-125b Expression ist im malignen Melanom stark reduziert (dunkelblaue Färbung). Eine *scrambled LNA probe* diente als Negativkontrolle.

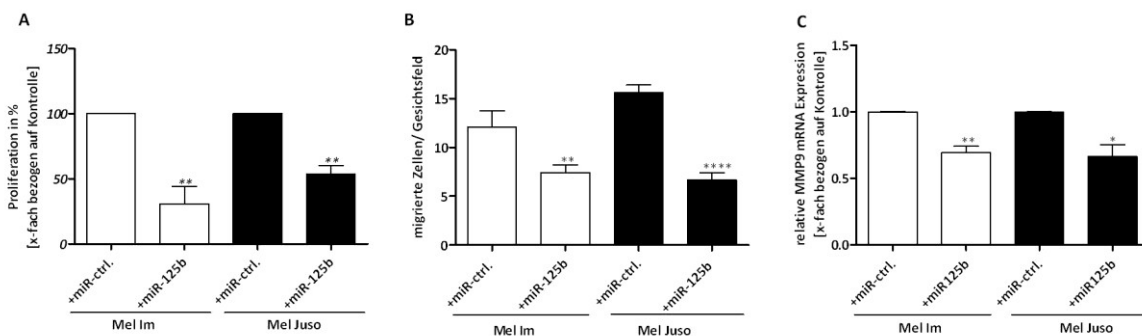
In miRNA *in situ*-Hybridisierungen von Gewebeproben aus normaler Epidermis, Primärmelanomen und Melanommetastasen zeigte sich eine Reduktion der miR-125b Expression im Verlauf der Melanomprogression. In Melanommetastasen ist die Expression der miR-125b nicht mehr detektierbar (Abbildung 4.24).

Zusammenfassend konnte sowohl eine Fehlregulation der miR-125b in Melanomzelllinien als auch in Melanomgewebe im Vergleich zu normalen Melanozyten detektiert werden. In weiteren Analysen sollte die funktionelle Relevanz des Verlustes der miR-125b während der Melanomprogression geklärt werden.

#### 4.3.3 Die miR-125b beeinflusst das proliferative und migratorische Potential von Melanomzellen *in vitro*

In Transfektionsexperimenten der miR-125b in die Melanomzelllinien Mel Im und Mel Juso zeigte sich sowohl in Proliferations-Assays (XTT), als auch in Migrations-Assays (Boyden-Kammer) eine signifikante Abnahme des proliferativen und migratorischen Potentials der Melanomzellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (Abbildung 4.25 A & B).

MMP9 ist ein für c-Jun beschriebenes *Target*-Gen, was unter anderem für das migratorische Potential von Melanomzellen verantwortlich ist. In Expressionsanalysen durch qRT-PCR konnte des Weiteren im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion von MMP9 nach miR-125b



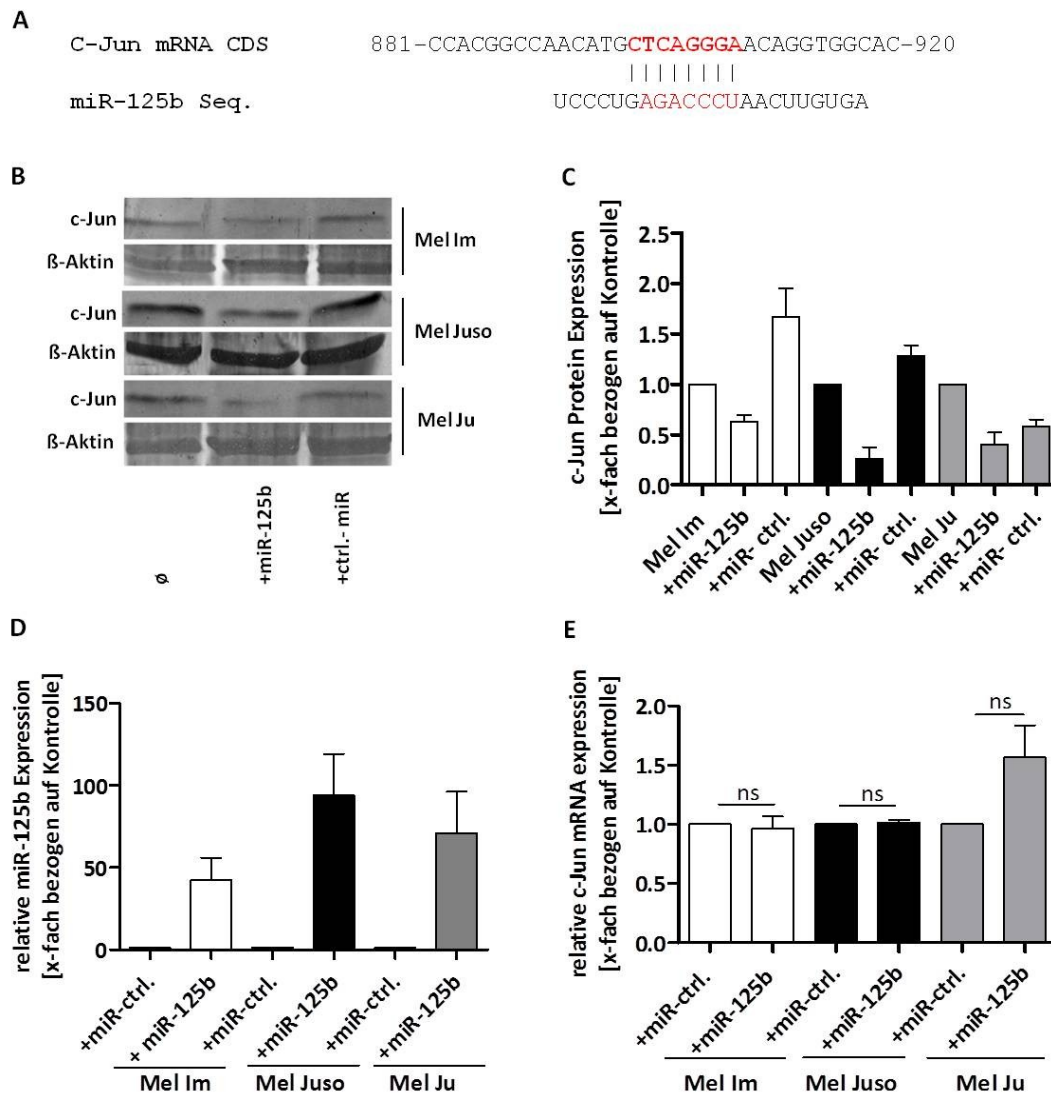
**Abbildung 4.25: Funktionelle Auswirkungen des Verlust der miR-125b im Melanom.** (A) Reduktion des proliferativen und (B) migratorischen Potentials der Melanomzelllinien Mel Im und Mel Juso nach miR-125b Re-Expression im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen (miR-ctrl.). (C) Expressionsanalysen der mRNA von MMP9 nach miR-125b Re-Expression bzw. miR-ctrl. Transfektion via qRT-PCR. Die mRNA Expression von MMP9 zeigte eine signifikante Reduktion nach miR-125b Transfektion im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen (Mel Im und Mel Juso).

Re-Expression detektiert werden (Abbildung 4.25 C). Diese Ergebnisse weisen auf die zentrale funktionelle Bedeutung des Verlust der miR-125b im malignen Melanom hin. In weiteren Experimenten sollte der regulatorische Zusammenhang zwischen der miR-125b und dem Transkriptionsfaktor c-Jun dargestellt werden.



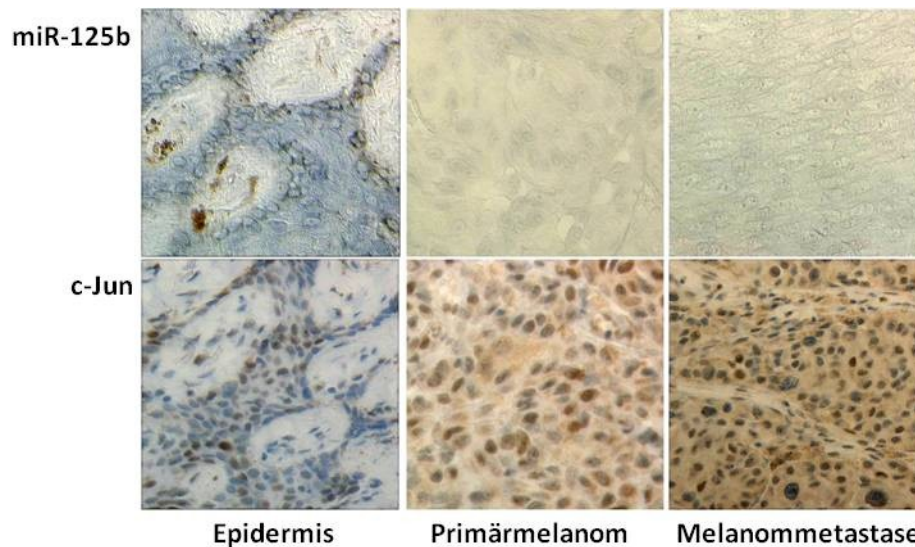
#### 4.3.4 Inverse Korrelation der miR-125b und c-Jun Expression

Wie bereits beschrieben konnte anhand von *in silico* Analysen eine potentielle miR-125b Bindestelle identifiziert werden (Abbildung 4.26 A). In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, ob durch eine direkte Bindung der miR-125b an die kodierende Region der c-Jun mRNA eine translationale Regulation von c-Jun vorliegt. Durch Western Blot Analysen konnte im



**Abbildung 4.26: Regulatorische Effekte der miR-125b auf die c-Jun Translation.** (A) Potentielle miR-125b Bindestelle in der kodierenden Region der c-Jun mRNA (NM\_002228). (B) Western Blot Analysen nach miR-125b Re-Expression bzw. in verschiedenen Melanomzelllinien (Mel Im, Mel Juso und Mel Ju) im Vergleich zur Kontroll-Transfektion. Es konnte im Vergleich zur Kontrolle eine reduzierte c-Jun Protein Menge nach miR-125b Re-Expression beobachtet werden.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (C) Densitometrische Auswertung des c-Jun Protein Gehalts im Vergleich zu  $\beta$ -Aktin. (D) Quantifizierung der miR-125b Expression via qRT-PCR nach miR-125b Re-Expression im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen. (E) Expressionsanalysen der c-Jun mRNA nach miR-125b bzw. miR-ctrl. Transfektion via qRT-PCR zeigen keine Veränderung der c-Jun mRNA Expression.

Vergleich zu unbehandelten oder kontrolltransfizierten Zellen eine verminderte c-Jun Proteinexpression nach miR-125b Re-Expression in den Melanomzelllinien Mel Im, Mel Juso und Mel Ju nachgewiesen werden (Abbildung 4.26 B). Die Western Blot wurden anschließend



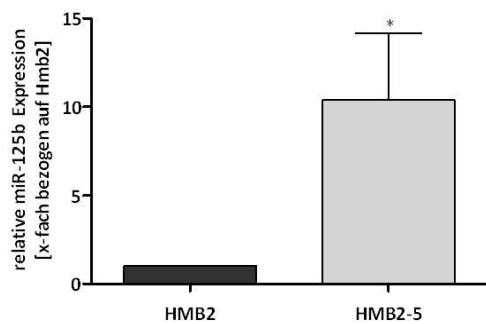
**Abbildung 4.27: Inverse Korrelation der miR-125b und der c-Jun Expression im malignen Melanom.** *In situ* Hybridisierung von Melanomgewebe (Primärmelanom; Melanommetastase) und normaler Epidermis. Die Expression der miR-125b liegt im Melanom stark vermindert vor, wohingegen die c-Jun Expression stark ansteigt.

densitometrisch ausgewertet (Abbildung 4.26 C). Dabei konnte nach miR-125b Transfektion in den Melanomzellen annähernd das in NHEMs vorliegende physiologische miR-125b Expressionslevel erreicht werden (Abbildung 4.26 D). Im Gegensatz dazu zeigte sich in Expressionsanalysen der c-Jun mRNA via qRT-PCR keine Veränderung nach miR-125b Re-Expression, was darauf hindeutet, dass c-Jun nicht auf transkriptioneller Ebene durch die miR-125b reguliert wird (Abbildung 4.26 E).

Des Weiteren konnte anhand von miRNA *In situ* Hybridisierungen und Immunhistochemischen Färbungen von Epidermis, Primärmelanom und Melanommetastasen eine inverse Korrelation der miR-125b Expression und der c-Jun Expression beobachtet werden (Abbildung 4.27).

#### 4.3.5 Translationale Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch die microRNA miR-125b

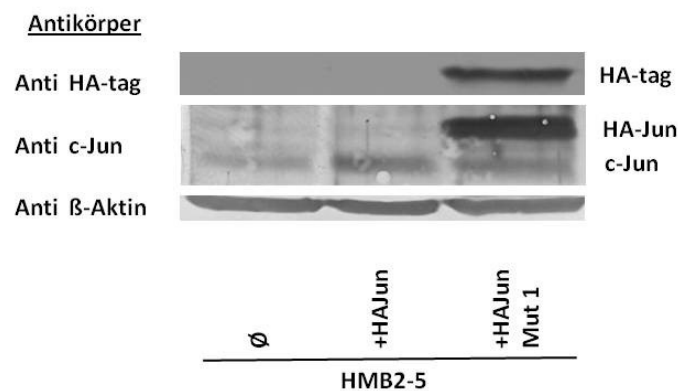
Zur weiteren Bestätigung der Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch die miR-125b im malignen Melanom wurde das bereits in Kapitel 4.2.1 beschriebene Melanozyten-ähnliche Modellsystem verwendet. Diese Hmb2-5 Zellklone zeigten in Expressionsanalysen via qRT-PCR im Vergleich zu Hmb2 Melanomzellen eine erhöhte miR-125b Expression (Abbildung 4.28).



#### Abbildung 4.28: Hmb2-5 Zellklone als Melanozyten-ähnliches Modellsystem.

Expressionsanalysen der miR-125b via qRT-PCR zeigen eine erhöhte miR-125b Expression in Hmb2-5 Zellklonen im Vergleich zu normalen Hmb2 Melanomzellen.

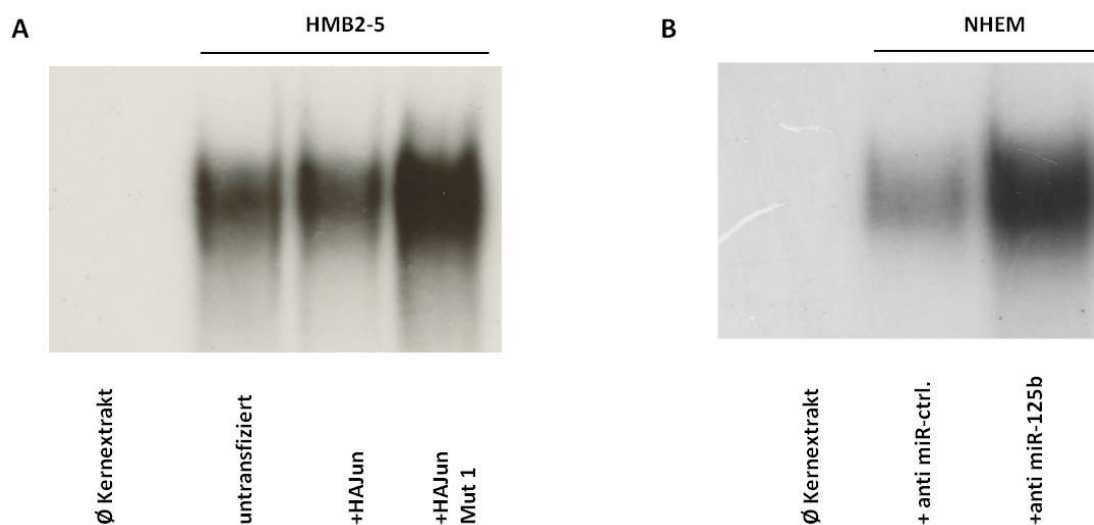
Um die direkte Bindung der miR-125b an die potentielle Bindestelle in der kodierende Region der c-Jun mRNA und auch die direkte Regulation von c-Jun durch diese miRNA nachzuweisen, wurde die *seed*-Sequenz der miR-125b in dem HA-tagged c-Jun Expressionskonstrukt mutiert (CTCAGGGA in CTGCGAGA).



**Abbildung 4.29: Translationale Regulation von c-Jun durch direkte Bindung der miR-125b an die *seed*-Sequenz in der kodierenden Region der c-Jun mRNA.** Western Blot Analysen von HA-tagged c-Jun wt (HAJun) oder HA-tagged c-Jun Mut miR-125 (HAJun Mut 1) transfizierten Hmb2-5 Zellklonen zeigen starke c-Jun Protein Expression nach HAJun Mut miR-125b Transfektion, nicht aber nach HAJun Transfektion. Proteindetektion erfolgte sowohl gegen HA-tag, als auch gegen c-Jun. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Diese mutierte Form des HA-tagged c-Jun Expressionskonstrukts (HAJun Mut 1) sollte im Vergleich zur Bindung an die Wildtyp *seed*-Sequenz zu einer verminderten Bindungsaffinität der miR-125b an die c-Jun mRNA führen und folglich zu einem Verlust der c-Jun Repression. Zu diesem Zweck wurden in den Hmb2-5 Zellklonen das HA-tagged c-Jun wt (HAJun) oder das HA-tagged c-Jun Mut miR-125b (HAJun Mut 1) exogen exprimiert und auf ihren Expressionsstatus via

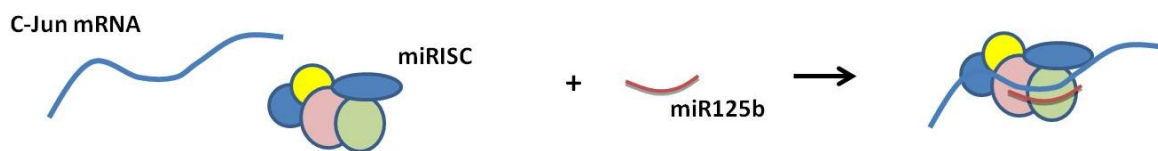
Western Blots analysiert. Es zeigte sich eine starke Induktion der c-Jun Protein Expression nach HAJun MUT 1 Transfektion, nicht aber nach HAJun Transfektion (Abbildung 4.29). Dies deutete auf eine translationale Regulation von c-Jun durch direkte Bindung der miR-125b an die *seed*-Sequenz in der kodierenden Region der c-Jun mRNA hin. In weiterer Folge sollten die Effekte der exogenen HAJun oder HAJun MUT 1 Expression in den Hmb2-5 Zellklonen auf die AP-1-DNA Bindungsaktivität untersucht werden. Dazu wurden EMSAs durchgeführt, welche, in Übereinstimmung mit den Western Blot Analysen, eine starke Induktion der AP-1-DNA Bindung nach HAJun MUT 1 Transfektion zeigten. Die Transfektion des HAJun Konstrukts hingegen, welches eine funktionelle miR-125b Bindestelle enthält, beeinflusste die AP-1-DNA Bindungsaktivität nicht (Abbildung 4.30 A). In weiteren EMSAs wurden NHEMs durch einen gegensätzlichen Ansatz analysiert. Dazu wurden diese NHEMs, welche ein hohes endogenes Expressionslevel an miR-125b und wenig c-Jun aufweisen, mit einer anti-miR-125b transfiziert. Nach Inhibition der miR-125b in NHEMs konnte eine erhöhte AP-1-DNA Bindungsaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 4.30 B).



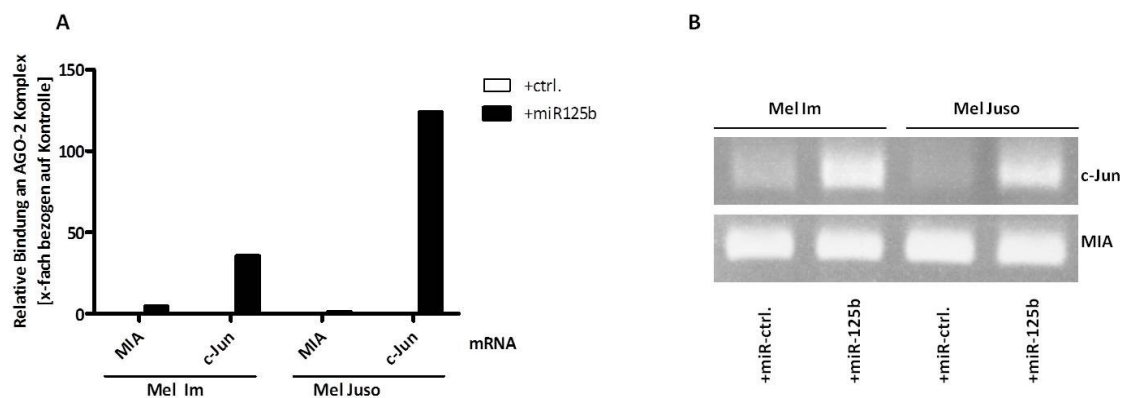
**Abbildung 4.30: Die miR-125b beeinflusst die AP-1-DNA Bindungsaktivität durch direkte Regulation von c-Jun in Melanozyten und Melanozyten-ähnlichen Zellsystemen.** (A) EMSA mit Kernextrakten aus Hmb2-5 Zellklonen zeigt eine Induktion der AP-1-DNA Bindungsaktivität nach HAJun Mut 1 Transfektion, nicht aber nach HAJun Transfektion. (B) EMSA mit Kernextrakten aus NHEMs nach anti-miR-125b bzw. anti-miR-ctrl. (Kontrolle) Transfektion zeigt Induktion der AP-1-DNA Bindung nach Inhibition der endogenen miR-125b im Vergleich zur Kontrolle.

Zur weiteren Bestätigung der direkten Bindung der miR-125b an die detektierte *seed*-Sequenz in der kodierenden Region der c-Jun mRNA sollte in folgenden Experimenten die Bindung der c-Jun mRNA an den RISC Komplex nachgewiesen werden. Dieser Versuchsansatz ist in Abbildung 4.31 schematisch dargestellt.

Die Melanomzelllinien Mel Im und Mel Juso wurden mit einer pre-miR-125b oder einer Kontroll-pre-miR transfiziert. Der RISC Komplex wurde aus den erhaltenen Proteinlysaten unter Verwendung eines anti-AGO2 Antikörpers immunpräzipitiert. Die mRNAs, welche an den RISC Komplex gebunden vorliegen, wurden durch qRT-PCR detektiert. Nach miR-125b Re-Expression in den Melanomzellen zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine Anhäufung der am RISC Komplex gebundenen c-Jun mRNA (Abbildung 4.32 A & B). Demnach konnte eine direkte Bindung der miR-125b an die c-Jun mRNA und damit die translationale Regulation von c-Jun durch diese microRNA bewiesen werden.

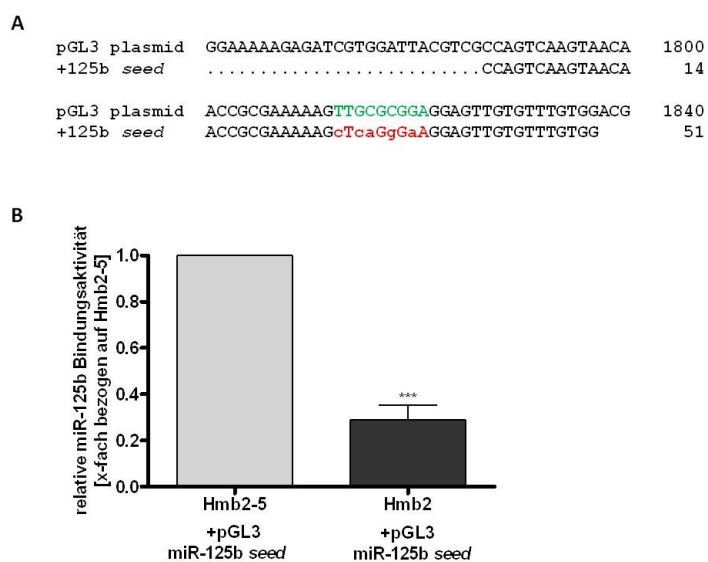


**Abbildung 4.31: Schematische Darstellung der c-Jun mRNA Bindung an den RISC Komplex nach miR-125b Re-Expression in Melanomzellen.**



**Abbildung 4.32: Anhäufung der am RISC Komplex gebundenen c-Jun mRNA nach miR-125b Re-Expression in Melanomzellen.** (A) Expressionsanalysen der c-Jun mRNA via qRT-PCR nach AGO-2 Immunpräzipitation von miR-125b- oder miR-ctrl.-(Kontrolle) transfizierten Melanomzellen (Mel Im und Mel Juso) zeigten eine Akkumulation der c-Jun mRNA gebunden an den RISC Komplex nach miR-125b Re-Expression. (B) Detektion der aus dem RISC Komplex isolierten c-Jun mRNA nach miR-125b Re-Expression in Melanomzellen (Mel Im und Mel Juso) im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen. MIA diente als Negativkontrolle für eine Regulation durch die miR-125b.

Die Analyse der Bindungsaktivität der miR-125b in der kodierenden Region von c-Jun sollte in weiteren Experimenten verdeutlicht werden, da eine translationale Regulation durch Bindung in der kodierenden Region von mRNAs noch weitestgehend ungeklärt ist. Dafür wurde die kodierende Region eines Luciferase Gens in einem pGL3 Plasmid so mutiert, dass eine künstliche miR-125b Bindestelle in dieser Region entstand (Abbildung 4.33 A). Durch *Luziferase Reporter Gene Assays*, nach Transfektion des mutierten Vektors (pGL3 miR-125b *seed*) in Hmb2 oder Hmb2-5 Zellen, konnte im Vergleich zu den Hmb2 Melanomzellen eine signifikant verminderte Luciferase Aktivität in den Hmb2-5 Zellklonen detektiert werden (Abbildung 4.33 B). Dies ist durch die geringe miR-125b Expression in den Hmb2 Melanomzellen und damit einer verringerten Bindungsaktivität an die generierte *seed*-Sequenz zu erklären. Dieses Ergebnis beweist die Fähigkeit der miR-125b durch Bindung im kodierenden Bereich eines Gens dessen Translation zu regulieren.



**Abbildung 4.33: Translationale Regulation durch die Bindung der miR-125b in der kodierenden Region der Ziel mRNA.** (A) Mutagenese der kodierenden Region des Luciferase Gens im pGL3 Plasmid zur Generierung einer miR-125b Bindestelle (TTGCGCGGA in CTCAGGGAA). (B) Luciferase Aktivitätsmessungen von pGL3 miR-125b *seed* transfizierten Hmb2-5 oder Hmb2 Zellen zeigen eine signifikant verminderte miR-125b Bindungsaktivität in Hmb2 Melanomzellen im Vergleich zu den transfizierten Hmb2-5 Zellklonen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die miR-125b im malignen Melanom fehlreguliert vorliegt. Zudem zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der miR-125b und der c-Jun Expression im Melanom. Diese Korrelation kommt durch die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch direkte Bindung der miR-125b im kodierenden Bereich der c-Jun mRNA zustande. Darüberhinaus beeinflusst die miR-125b durch Regulation von c-Jun das proliferative und migratorische Potential der Melanomzellen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Regulation der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie im malignen Melanom

In den letzten Jahrzehnten konnten einige Regulationsmechanismen identifiziert werden, welche sowohl die Progression und Entwicklung des malignen Melanoms, als auch das hohe migratorische und invasive Potential der Melanomzellen beeinflussen. Die detaillierten molekularen Ursachen konnten jedoch bis dato nur sehr unzureichend aufgeklärt werden.

Ein wesentliches Ereignis in der Melanomentwicklung stellt die Fehlregulation tumorrelevanter Transkriptionsfaktoren dar. Dabei kommt der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie im malignen Melanom eine wichtige Rolle zu. Es ist bekannt, dass AP-1 Transkriptionsfaktoren sowohl an der Regulation der Tumorprogression, -proliferation, -migration und -invasion beteiligt sind, als auch an Prozessen der Apoptose und Angiogenese (Eferl and Wagner 2003; Javelaud, et al. 2011; Kovary and Bravo 1991; Mils, et al. 1997; Poser and Bosserhoff 2004; Santiago-Walker and Herlyn 2010; Shaulian and Karin 2001). Auch in diversen anderen Tumorentitäten konnte eine konstitutive Aktivität der AP-1 Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Mucha, et al. 2009; Shimizu, et al. 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das AP-1 Mitglied c-Jun einen Hauptregulator der Melanomprogression darstellt und bezüglich des malignen Melanoms das wichtigste Mitglied der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie ist (Eferl and Wagner 2003; Jochum, et al. 2001; Weiss and Bohmann 2004).

Die Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun erfolgt über viele verschiedene Mechanismen und Signalwege. Die Regulationsmechanismen von c-Jun konnten im malignen Melanom ansatzweise durch die Arbeitsgruppe von Ze'ev Ronai aufgeklärt werden (Fuchs, et al. 1996; Hibi, et al. 1993). Dabei zeigte sich, dass c-Jun durch Aktivierung von JNK und ERK durch Regulation von PDK1 (Phosphoinositide-dependent Kinase 1) phosphoryliert wird und folglich die Tumorprogression des malignen Melanoms fördert (Lopez-Bergami, et al. 2007; Lopez-Bergami, et al. 2010).

### 5.2 E-Cadherin abhängige Regulationsmechanismen im malignen Melanom

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun weitere molekulare Mechanismen der c-Jun Regulation im malignen Melanom analysiert und sollen in weiterer Folge diskutiert werden.

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in früheren Untersuchungen zeigen, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun im malignen Melanom im Vergleich zu normalen Melanozyten stark exprimiert wird. Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Regulation der c-Jun

Aktivität nicht primär nur über Phosphorylierung erfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit waren wir an alternativen Regulationsmechanismen von c-Jun im malignen Melanom interessiert. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits die E-Cadherin-abhängige posttranskriptionelle Regulation von c-Jun bestätigen. Durch den Verlust von E-Cadherin, während der Melanomentstehung, konnte sowohl eine erhöhte c-Jun Expression als auch AP-1 Aktivität nachgewiesen werden (Spangler, et al. 2011). Es ist bekannt, dass die E-Cadherin Expression nicht ausschließlich für die Zell-Zell-Adhäsion, sondern auch für die zelluläre Signalweiterleitung verantwortlich sein kann (Knirsh, et al. 2009; Kuphal, et al. 2004).

### **5.2.1 Die Bedeutung des Verlust von E-Cadherin und dessen Einfluss auf den Transkriptionsfaktor ETS-1 und die GTPase RhoC**

In Folgendem wurde die Signalkaskade, welche über den Verlust von E-Cadherin im malignen Melanom zur Aktivierung von c-Jun führt, identifiziert.

E-Cadherin ist ein Tumorsuppressor, welcher befähigt ist, die Migration und Invasion von Tumorzellen zu inhibieren. Durch den Verlust des Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin entziehen sich die Melanozyten der Kontrolle der Keratinozyten, was es ihnen ermöglicht, unkontrolliert zu proliferieren (Hsu, et al. 2000; Hsu, et al. 2002).

Der Verlust von E-Cadherin spielt bei der Tumorentwicklung und- progression eine entscheidende Rolle und veranlasst im Melanom die Aktivierung verschiedener Signalwege, wie zum Beispiel von NF $\kappa$ B über die  $\beta$ -Catenin-p38 „Achse“ (Kuphal, et al. 2004).

Um die E-Cadherin abhängige Signalkaskade, welche in einer verstärkten c-Jun Expression und Aktivität im Melanom mündet, weiter aufzuklären, wurde zu Beginn nach Faktoren gesucht, welche durch den Verlust von E-Cadherin beeinflusst werden. Wir konnten im Rahmen unserer Arbeiten die GTPase RhoC als Hauptregulator der AP-1/c-Jun Aktivität im malignen Melanom identifizieren und die Beteiligung anderer RhoGTPasen ausschließen. Expressionsanalysen der GTPase RhoC zeigten auf mRNA Level via qRT-PCR im Vergleich zu Melanozyten eine Hochregulation der RhoC Expression in Melanomzellen. Diese Hochregulation der GTPase RhoC konnte durch E-Cadherin Re-Expression in den Melanomzellen inhibiert werden, wodurch sich bestätigte, dass der Verlust von E-Cadherin die Expression der GTPase RhoC reguliert.

Dabei unterstützten die Daten aus unterschiedlichen Publikationen den von uns detektierten Zusammenhang zwischen E-Cadherin und RhoGTPasen. Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben bereits eine Überexpression der GTPase RhoC im malignen Melanom und deren Einfluss auf migratorisches und invasives Verhalten der Melanomzellen (Boone, et al. 2009; Ruth, et al. 2006; Wang, et al. 2003). So konnte in einem GTPase RhoC defizienten Mausmodell (*RhoC*<sup>-/-</sup>)



gezeigt werden, dass der Verlust von RhoC zwar zu einer verminderten Migrationsfähigkeit und Reduktion der Metastasierung führt, jedoch nicht die Tumorentwicklung inhibiert (Hakem, et al. 2005). Auch im Melanom konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten RhoC Expression und einem verstärkten migratorischen Potential der Melanomzellen in die Lunge detektiert werden (Clark, et al. 2000). Zudem konnte eine negative Regulation der Zellproliferation und –migration durch E-Cadherin im nicht-kleinzelligen Lungenkrebs nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine E-Cadherin abhängige Reduktion der aktiven Form von Rho Proteinen (RhoA, Cdc42), welche folglich als E-Cadherin Effektoren identifiziert werden konnten (Asnaghi, et al. 2010). Weitere Studien wiesen eine Korrelation zwischen einer erhöhten RhoC Expression und dem Verlust von E-Cadherin im Kolon Karzinom nach. Auch in diesen Studien wurde spekuliert, ob der Verlust von E-Cadherin für die Induktion der GTPase RhoC verantwortlich ist (Bellovin, et al. 2005; Bellovin, et al. 2006).

In weiterer Folge wurde im Rahmen dieses Projektes nach potentiellen Transkriptionsfaktoren gesucht, welche die Expression der GTPase RhoC regulieren könnten. Durch Bellovin und Kollegen konnten einige ETS-1 Bindestellen im Promotorbereich von RhoC detektiert werden (Bellovin, et al. 2006). Wir untersuchten deshalb, ob E-Cadherin den Transkriptionsfaktor ETS-1 reguliert und ob ETS-1 einen Einfluss auf die GTPase RhoC im Melanom hat. In unseren experimentellen Analysen bestätigte sich anhand von RhoC Expressionsanalysen der regulatorische Zusammenhang zwischen der GTPase RhoC und dem Transkriptionsfaktor ETS-1. In asETS-1 Zellklonen konnte durch qRT-PCR eine stark verminderte RhoC Expression detektiert werden. Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang mit den bereits veröffentlichten Daten, die besagen, dass der Transkriptionsfaktor ETS-1 im Melanom von essentieller Bedeutung ist, indem er sowohl die Entwicklung, als auch die Invasivität des malignen Melanoms beeinflusst (Keehn, et al. 2003; Rothhammer, et al. 2004).

Zudem konnte die Korrelation zwischen dem Verlust von E-Cadherin im Melanom und der ETS-1 Aktivität nachgewiesen werden. Nach E-Cadherin Re-Expression in Melanomzellen ließ sich durch Luziferase *Reporter Gene Assays* eine verminderte ETS-1 Aktivität detektieren. Des Weiteren zeigte sich, dass die Hemmung der ETS-1 Aktivität, durch stabile Transfektion eines asETS-1 Plasmids in Melanomzellen, eine negative Wirkung auf die AP-1 Aktivität hat.

Erstmals konnte demnach eine Regulation der RhoC Expression durch den Verlust von E-Cadherin über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ETS-1 im malignen Melanom experimentell aufgedeckt werden. Dieser Zusammenhang stellt eine komplett neue Entdeckung dar.

### 5.2.2 Die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch den E-Cadherin abhängigen ETS-1/RhoC Signalweg

Des Weiteren wurde die molekulare Funktion der alternativen Signalkaskade im Melanom genauer analysiert.

Nachdem ein regulatorischer Zusammenhang zwischen dem Verlust von E-Cadherin während der Melanomentwicklung und- progression, dem Transkriptionsfaktor ETS-1 und der GTPase RhoC hergestellt werden konnte, wurden in weiteren Analysen die Effekte auf die AP-1/c-Jun Aktivität untersucht.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Verlust des Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin die c-Jun Protein Expression und die AP-1 Aktivität beeinflusst (Spangler, et al. 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte darüberhinaus die molekulare Verknüpfung zwischen der im malignen Melanom vorliegenden starken RhoC Expression und der erhöhten c-Jun Expression bzw. Aktivität aufgeklärt werden.

In den von uns verwendeten Zellsystemen konnte eine Beeinflussung der Phosphorylierung von c-Jun auf die AP-1 Aktivität ausgeschlossen werden. AP-1 Aktivitätsmessungen nach Inhibition von JNK bzw. ERK resultierten in keiner Veränderung der AP-1 Aktivität in den Melanomzellen (Spangler, et al. 2011). Diese Ergebnisse wiesen bereits auf einen alternativen E-Cadherin-abhängigen Signalweg hin. Dabei führt der Verlust von E-Cadherin zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ETS-1, welcher die GTPase RhoC reguliert und folglich die AP-1/c-Jun Aktivität steuert. Anhand von AP-1 Aktivitätsmessungen und Western Blot Analysen konnte eine Beteiligung speziell der RhoGTPasen RhoA und RhoB an der Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun im malignen Melanom ausgeschlossen werden. Nach Transfektion eines dominant negativen RhoA oder RhoB Konstrukts in Melanomzellen zeigte sich keine Veränderung der c-Jun Expression und AP-1 Aktivität, wohingegen die Transfektion eines dominant negativen RhoC Konstrukts zu einer Abnahme der c-Jun Expression und AP-1 Aktivität führte.

In Analogie zu unseren Ergebnissen zeigten frühere Studien in einigen anderen Zellsystemen bereits eine Korrelation zwischen RhoGTPasen und der c-Jun Expression. Zum Beispiel konnte in Fibroblasten eine Phosphorylierung und folglich Aktivierung von c-Jun durch die RhoGTPase RhoA beobachtet werden (Marinissen, et al. 2004). Ein Zusammenhang zwischen der AP-1/c-Jun Aktivität und der RhoC Expression konnte bis heute noch nicht erbracht werden und stellt demnach einen neuen regulatorischen Mechanismus im malignen Melanom dar, welcher unter Umständen auch auf andere Tumorarten übertragbar sein könnte.

Des Weiteren sind bis zum heutigen Zeitpunkt einige Transkriptionsfaktoren bekannt, die durch die Expression von RhoGTPasen reguliert oder aktiviert werden. So fördern RhoGTPasen durch die Stimulation der Transkriptionsfaktoren SRF (*serum response factor*), NFκB und p53,

Veränderungen der Gentranskription (Coso, et al. 1995; Hill, et al. 1995; Sahai and Marshall 2002a). Diese zitierten Arbeiten bestätigen, dass RhoGTPasen die Expression und Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren regulieren können. Diese Daten unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit im Detail gezeigten Ergebnisse, dass die Expression von RhoC im malignen Melanom zur Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun führt.

### 5.3 Die regulatorische Funktion des Zytoskeletts im malignen Melanom

Vordaten wiesen auf eine Beteiligung des Zytoskeletts an der c-Jun Regulation hin. So zeigten Immunfluoreszenzfärbungen von Melanomzellen nach Taxol Behandlung, ein Zytostatika welches das Zytoskelett stabilisiert, eine verminderte c-Jun Akkumulation im Kern (Spangler, et al. 2011). RhoGTPasen sind unter Anderem auch für die Organisation des Zytoskeletts verantwortlich (Hall 1998; Hall and Nobes 2000; Price and Collard 2001) und folglich könnte die Regulation von c-Jun durch die GTPase RhoC durch zytoskelettale Veränderungen induziert werden. Veränderungen der zytoskelettalen Struktur beeinflussen sowohl die Signalweiterleitung, als auch das Genexpressionsprofil in der Zelle, was ein breites Spektrum an Alterationen biologischer Prozesse nach sich zieht und folglich zur Tumorentwicklung führen kann.

Der regulatorische Mechanismus der c-Jun Regulation durch das Zytoskelett konnte bis dato nicht aufgeklärt werden. Demnach untersuchten wir im Rahmen dieser Arbeit das Zytoskelett als möglichen Regulator des Transkriptionsfaktors c-Jun.

Veränderungen der Zellmotilität, Zellmorphologie und Zelladhäsion sind für Tumorzellen zur Entwicklung eines malignen Phänotyps essentiell. Der Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin spielt dabei eine entscheidende Rolle (Knirsh, et al. 2009; Kuphal, et al. 2004; Poser, et al. 2001) und führt in weiterer Folge zur Umstrukturierung des Zytoskeletts (Alt-Holland, et al. 2008) und folglich zu den beschriebenen Veränderungen bezüglich Motilität, Morphologie und Adhäsion (Matrone, et al. 2010; Pawlak and Helfman 2001). Durch den bereits detektierten Zusammenhang zwischen dem Verlust von E-Cadherin und der c-Jun Expression im malignen Melanom (Spangler, et al. 2012), lag die Annahme einer Korrelation zwischen der E-Cadherin Expression, dem Zytoskelett und der c-Jun Aktivität nahe.

Demnach untersuchten wir eine mögliche Korrelation zwischen dem Verlust von E-Cadherin und einer folgerichtigen Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts. Wir vermuteten einen Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und überprüften deren Einfluss auf die AP-1 Aktivität im Melanom. In AP-1 Aktivitätsmessungen nach Latrunkulin oder Cytochalasin (*Actin targeting drugs*; hemmen die Polymerisation der Aktinfilamente) Behandlung von Melanomzellen zeigten sich keine Effekte auf die AP-1 Aktivität. Die Ergebnisse unserer Analysen ergaben demzufolge, dass die

Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts auf die transkriptionelle Aktivität von c-Jun/ AP-1 keinen Einfluss hat.

In verschiedenen anderen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der Wachstumskontrolle von Zellen während der Tumorgenese nachgewiesen werden. Jedoch zeigten auch diese Daten keine Modulation von c-Jun. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts sowohl die Organisation und Funktion adhäsiver Strukturen, wie Integrine und Cadherine, als auch verschiedene Signalwege beeinflussen (Pawlak and Helfman 2001; Schoenwaelder and Burridge 1999). Demnach stellt die aktive Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts in verschiedenen Tumorarten ein entscheidendes Ereignis dar, welches das invasive und metastasierende Potential von Tumorzellen fördert (Yamaguchi and Condeelis 2007). Aufgrund dessen, dass das Aktin-Zytoskelett durch unsere Analysen als Regulator der c-Jun/ AP-1 Aktivität ausgeschlossen werden konnte, wurden die funktionellen Effekte der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts im malignen Melanom nicht weiter untersucht.

### 5.3.1 Regulation von c-Jun durch Mikrotubuli

Neben dem Aktin-Zytoskelett kommt auch dem Mikrotubuli-Zytoskelett eine bedeutende Rolle während der Tumorprogression und –entwicklung zu, indem die Mikrotubuli unter Anderem die Migrationsfähigkeit der Zellen beeinflussen. Jedoch ist der molekulare Mechanismus bezüglich der Motilität der Zellen durch die Mikrotubuli noch weitestgehend unverstanden (Wittmann and Waterman-Storer 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit stand in weiterer Folge die regulatorische Funktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts auf die AP-1/c-Jun Aktivität im malignen Melanom im Fokus der Analysen und wird nachfolgend diskutiert.

Wir konnten anhand detaillierter Analysen nachweisen, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun durch das Mikrotubuli-Zytoskelett über einen bis dato noch unbekanntem molekularen Mechanismus reguliert wird. Einige Studien befassten sich bereits mit der Regulation tumorrelevanter Moleküle durch das Mikrotubuli-Zytoskeletts in verschiedenen Zellsystemen (HEK-Zellen, HeLa-Zellen, Nierenkarzinom-Zellen) (Carbonaro, et al. 2012; Gao, et al. 2008; Ishiguro, et al. 2011).

So wurde  $\alpha$ -Tubulin durch Ishiguro und Kollegen als Adaptor für den Kerntransport des Transkriptionsfaktors NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) durch Importin  $\beta$  identifiziert. Durch den Transport von NFAT in den Kern werden in weiterer Folge Immunantworten reguliert (Ishiguro, et al. 2011). Darüberhinaus konnte eine Interaktion zwischen dem Tumorsuppressor CYLD und dem Mikrotubuli-Zytoskelett detektiert werden. Dabei ist die CAP-Gly Domäne von

CYLD für die Interaktion mit Mikrotubuli verantwortlich. Des Weiteren zeigte sich, dass CYLD die Polymerisierung von Tubulin zu Mikrotubuli fördert (Gao, et al. 2008). Dementsprechend könnte ein Zusammenhang zwischen diesen regulatorischen Mechanismen und der Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts bestehen. Eine weitere Studie beschrieb die Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  durch das Mikrotubuli-Zytoskelett. Dabei sind die polymerisierten Mikrotubuli direkt am Kernimport von HIF-1 $\alpha$  und dessen transkriptioneller Aktivität beteiligt (Carbonaro, et al. 2012). Diese Arbeiten zeigen verschiedenste regulatorische Funktionen von  $\alpha$ -Tubulin bzw. polymerisierten Mikrotubuli auf und unterstützen unsere Annahme, dass Mikrotubuli im Melanom eine regulatorische Funktion haben.

### **5.3.2 Microtubule targeting drugs (MTDs)**

Mikrotubuli sind hoch dynamische Polymere, deren Polymerisation präzise reguliert wird. Diese sogenannte dynamische Instabilität der Mikrotubuli spielt eine entscheidende Rolle während der Mitose und Zellteilung. Aufgrund der essentiellen Bedeutung der Mikrotubuli während der Tumorprogression- und -entwicklung und der Annahme, dass das Zytoskelett eine regulatorische Wirkung auf c-Jun haben könnte, untersuchten wir den Einfluss des Mikrotubuli-Zytoskeletts auf die AP-1 Aktivität im Melanom. Nach Behandlung von Melanomzellen mit MTDs konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun in seiner Aktivität, DNA-Bindung und seiner nuklearen Akkumulation stark beeinflusst wird. Der Behandlung von Melanomzellen speziell mit Taxol, ein MTD welches die Polymerisation der Mikrotubuli induziert, folgte eine Reduktion der AP-1/c-Jun Aktivität, wohingegen die Behandlung mit Nocodazol, ein MTD, welches die Polymerisation der Mikrotubuli hemmt, zu einer Steigerung der c-Jun/AP-1 Aktivität führte. Darüberhinaus ließen sich diese Daten auch *in vivo* bestätigen. Nach Taxolbehandlung zeigte sich sowohl in *ret* transgenen Mäusen, als auch in humanen Gewebeproben eine signifikante Reduktion der c-Jun Akkumulation im Kern. Diese Ergebnisse wiesen auf eine regulatorische Wirkung der Mikrotubuli auf c-Jun hin. Im Rahmen dieser Arbeit konnte demnach eine Beeinflussung der AP-1 Aktivität und der c-Jun Expression im Melanom durch MTDs dargestellt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass dem dynamischen Mikrotubuli-Zytoskelett im malignen Melanom eine essentielle regulatorische Funktion zukommt.

Derzeitig befinden sich einige MTDs in klinischen Studien und zahlreiche sind bereits zugelassen, wie zum Beispiel Taxol (*Paclitaxel*) oder *Vinca* Alkaloide (Jordan and Wilson 2004). Im Allgemeinen inhibieren MTDs die Depolymerisierung von polymerisierten Mikrotubuli und senken damit das proliferative Potential der Tumorzellen durch Zerstörung des Mitose-Spindels (Dumontet and Jordan 2010; Jordan and Wilson 2004; Wilson and Jordan 2004).

Dumontet und Kollegen konnten zeigen, dass die dynamische Instabilität der Mikrotubuli durch die Behandlung mit Taxol (*Paclitaxel*), ein Chemotherapeutikum welches bereits zur Behandlung des malignen Melanoms eingesetzt wird, supprimiert werden kann (Dumontet and Jordan 2010).

### 5.3.3 Tubulinmodifikationen und deren Bedeutung in der Tumorgenese

Posttranslationale Modifikationen von Tubulin entscheiden über die zelluläre Funktion der Mikrotubuli. So spielen Tubulinmodifikationen eine bedeutende Rolle sowohl für die Mikrotubulistabilität und -struktur, als auch für die Zellmotilität, die Zellteilung und den intrazellulären Transport durch Mikrotubuli. Dabei unterscheidet man folgende mögliche Modifikationen von Tubulin: Detyrosinierung, Tyrosinierung, Glutamylierung, Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Palmitoylierung (Hammond, et al. 2008; Westermann and Weber 2003). In dieser Arbeit sollen nur die ersten beiden Modifikationen, Detyrosinierung und Tyrosinierung, beschrieben und diskutiert werden.

Wir konnten in unseren Analysen nachweisen, dass eine Stabilisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts und damit eine Induktion von detyrosiniertem (Glu-) Tubulin durch Taxol Behandlung eine Reduktion der AP-1 Aktivität, AP-1-DNA Bindungsaktivität und der c-Jun Akkumulation im Kern im malignen Melanom zur Folge hat. Im Gegensatz dazu zeigte sich in verschiedenen Tumorarten bis dato, dass die Tubulin Tyrosin Ligase (TTL) Aktivität während der Tumorentwicklung stark reduziert ist und folglich  $\alpha$ -Tubulin überwiegend in der detyrosinierten Form (Glu-Tubulin) vorliegt. Diese  $\alpha$ -Tubulin Modifikation fördert insbesondere das proliferative Potential der Tumorzellen (Lafanechere, et al. 1998; Mialhe, et al. 2001). Damit stehen unsere Daten diesbezüglich im Widerspruch zu denen in anderen Tumorarten detektierten Ergebnissen, da eine Reduktion der c-Jun Aktivität meist mit einem verminderten migratorischen Potential der Melanomzellen einhergeht (Kappelmann, et al. 2013a). Darüberhinaus konnte im Mammakarzinom bereits ein Zusammenhang zwischen Epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) und der erhöhten Glu-Tubulin Expression detektiert werden. In diesem Fall wird durch die EMT das Enzym TTL inhibiert und folglich die Detyrosinierung von  $\alpha$ -Tubulin, durch Twist oder Snail Expression, gefördert. Durch die erhöhte Expression von Glu-Tubulin sind die Tumorzellen zur Ausbildung von Mikrotentakeln befähigt, welche es den Zellen ermöglichen endotheliale Strukturen zu durchdringen und folglich Metastasen auszubilden (Whipple, et al. 2010). Es ist für das Mammakarzinom also bekannt, dass die E-Cadherin Repressoren Snail und Twist die Detyrosinierung von  $\alpha$ -Tubulin fördern. Während der Melanomprogression können maligne Melanozyten, durch einen EMT-ähnlichen Prozess, reprogrammiert werden. Dieser Vorgang steht in engem Zusammenhang mit der Expression von Twist und Snail, dem Verlust von E-Cadherin

und der Erlangung eines migratorischen Phänotyps. Die Beziehung zwischen dem Mikrotubuli-Zytoskelett und den EMT-ähnlichen Prozessen im malignen Melanom ist bis heute weitestgehend ungeklärt, es kann aber spekuliert werden, dass der für das Mammakarzinom beschriebene molekulare Mechanismus auch im malignen Melanom eine entscheidende Rolle spielen könnte (Poser, et al. 2001; Spangler, et al. 2011; Whipple, et al. 2010). Diese Fragestellung war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit und wurde folglich nicht im Detail untersucht.

In weiteren Analysen fokussierten wir auf das tyronisierte  $\alpha$ -Tubulin (Tyr-Tubulin), da wir aufgrund unserer Ergebnisse eine Interaktion zwischen polymerisierten Mikrotubuli (Glu-Tubulin) und c-Jun ausschließen konnten. Im Rahmen der experimentellen Arbeiten wurde ein für monomeres  $\alpha$ -Tubulin (Tyr-Tubulin) spezifischer Antikörper verwendet. Durch Ko-Immünpräzipitationen konnte eine Interaktion zwischen c-Jun und monomerem  $\alpha$ -Tubulin in Melanomzellen identifiziert werden. Des Weiteren zeigte sich in nachfolgenden Untersuchungen, dass Tyr-Tubulin der Stabilisierung des Transkriptionsfaktors c-Jun im malignen Melanom dient und folglich eine regulatorische Wirkung auf c-Jun hat. Bis dato sind bezüglich der detaillierten molekularen Funktion von Tyr-Tubulin während der Tumorgenese keine weiteren Daten verfügbar. Jedoch könnte Tyr-Tubulin durch die hoch dynamische Instabilität der Mikrotubuli während der Entwicklung eines metastasierenden Phänotyps der Melanomzellen induziert werden.

#### **5.3.4 Die molekulare Funktion der c-Jun/Importin 13 Interaktion**

Neben der bereits beschriebenen c-Jun/ $\alpha$ -Tubulin Interaktion konnte des Weiteren eine Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor c-Jun und dem Importin 13 detektiert werden. Es zeigte sich, dass Importin 13 für den Kernimport von c-Jun und damit dessen Aktivität im malignen Melanom verantwortlich ist. Durch AP-1 Aktivitätsmessungen konnte nachgewiesen werden, dass ausschließlich Importin 13 im malignen Melanom einen Einfluss auf den Kernimport von c-Jun zu haben scheint. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion zwischen Importin 13 und c-Jun von der c-Jun-NLS abhängig ist. Auch konnte eine Interaktion zwischen Importin 13 und  $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass beide Faktoren für die Aktivität des Transkriptionsfaktors c-Jun von Bedeutung sind und folglich eine zentrale Rolle in der Melanomprogression und- entwicklung spielen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Importin 13 die NLS von c-Jun erkennt und dieser entstandene Komplex durch  $\alpha$ -Tubulin stabilisiert wird. Diese Stabilisierung könnte durch Bindung an c-Jun oder Importin 13 erfolgen, jedoch bleiben die Bindungsmodalitäten von  $\alpha$ -Tubulin an den c-Jun/Importin 13

Komplex in dieser Arbeit noch ungeklärt. Auch die Beteiligung weiterer Proteine an diesem Komplex wäre die Aufgabenstellung einer neuen Arbeit.

Der molekulare Mechanismus des klassischen Kernimports wird durch die NLS der *Cargo* Moleküle gesteuert, welche von spezifischen Importinen erkannt und folglich gebunden wird. Diese klassische NLS besteht aus einer kurzen Aminosäureabfolge, meist Lysine, welche die Interaktion zwischen dem Zielmolekül und dem Adaptormolekül bedingt. Der entstandene Komplex zwischen Ziel- und Adaptormolekül kann dann in weiterer Folge von dem spezifischen Importrezeptor (Importin) gebunden und in den Kern transportiert werden. In den meisten Fällen des Kernimport wird die Adaptorfunktion von Importin  $\alpha$  und die Importrezeptorfunktion von Importin  $\beta$  übernommen (Freitas and Cunha 2009). Dies konnte jedoch im Fall des c-Jun Kernimports nicht bestätigt werden (Waldmann, et al. 2007). Es konnte in einer früheren Studie in HeLa Cervixkarzinomzellen schon gezeigt werden, dass verschiedene Importine dazu befähigt sind, den Transkriptionsfaktor c-Jun zu binden und folglich in den Kern zu transportieren. So konnten die Importine Importin  $\beta$ , Transportin, Importin 5, Importin 7, Importin 9 und Importin 13 als spezifisch c-Jun bindende nukleäre Importrezeptoren identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwar mögliche weitere Importine und deren Bindungsaffinität an die NLS von c-Jun im Melanom nicht gänzlich ausgeschlossen werden und auch eine Redundanz der Importine wurde nicht im Detail untersucht, jedoch zeigte nur Importin 13 einen direkten Einfluss auf die AP-1 Aktivität. Zudem konnte die *Nuclear Localization* Sequenz (NLS) von c-Jun als zentrale Bindesequenz für diese Importine nachgewiesen werden (Waldmann, et al. 2007), was in Einklang mit unseren Ergebnissen steht.

Bezüglich des molekularen Mechanismus des c-Jun Kernimports im malignen Melanom stehen bisher noch keine Daten zur Verfügung.

Zusammenfassend konnte eine Interaktion zwischen monomerem  $\alpha$ -Tubulin und c-Jun detektiert werden, nicht jedoch mit polymerisierten Mikrotubuli. Diese Interaktion konnte als Stabilisator des Transkriptionsfaktors c-Jun identifiziert und somit die molekulare Funktion dieser Komplexbildung aufgeklärt werden. Des weiteren zeigte sich eine Interaktion zwischen Importin 13/ $\alpha$ -Tubulin und c-Jun, welche bis zum heutigen Zeitpunkt noch nie beschrieben wurde und unter Umständen einen generellen molekularen Mechanismus zur Stabilisierung und Aktivierung onkogener Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Tumorarten darstellt.



## 5.4 Die regulatorische Bedeutung von microRNAs im malignen Melanom

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass veränderte Expressionsprofile von miRNAs mit der Initiation und Progression des malignen Melanoms korrelieren (Chen, et al. 2010; Esquela-Kerscher and Slack 2006; Mueller, et al. 2009). Einige dieser fehlregulierten miRNAs konnten als sogenannte *Oncomirs* identifiziert werden. Darüberhinaus können miRNAs auch tumorsuppressive Funktionen inne haben. Dabei sind miRNAs dazu befähigt, eine Vielzahl von verschiedenen mRNAs auf transkriptineller oder translationaler Ebene zu regulieren und folglich die Zellproliferation, -differenzierung und den Metabolismus zu beeinflussen. Es wird spekuliert, dass nahezu ein Drittel aller humanen proteinkodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden, was auf eine zentrale Bedeutung dieser regulatorischen Maschinerie hindeutet (Chen, et al. 2010; Philippidou, et al. 2010; Xu, et al. 2012).

Verschiedene Studien zeigten eine differentielle Expression einiger miRNAs in benignen Melanozyten versus Melanomzellen auf. Darunter fanden sich miRNAs, wie *let-7a* und *b*, miR-23a und *b*, miR-148, miR-155, miR-182, miR-200c, miR-211, miR-214, miR-221 und die miR-222. Einige dieser miRNAs regulieren Melanom-assoziierte Gene wie das NRAS Onkogen, den Microphthalmia-assoziierten Transkriptionsfaktor (MITF), die Rezeptor Tyrosin Kinase c-KIT oder AP-2 Transkriptionsfaktoren (TFAP2). Die funktionelle Bedeutung der Regulation dieser melanomrelevanten Gene durch miRNAs ist jedoch noch weitestgehend ungeklärt (Kunz 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine im malignen Melanom fehlregulierte miRNA, die miR-125b, und deren funktionelle Bedeutung identifiziert werden.

### 5.4.1 Die Rolle der miR-125b im malignen Melanom

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die miR-125b im malignen Melanom im Vergleich zu normalen Melanozyten fehlreguliert vorliegt. Im Vergleich zu normalen Melanozyten konnte eine stark verminderte Expression der miR-125b in Melanomzellen und -gewebe detektiert werden. Auch Calin und Kollegen postulierten, dass die miR-125b einen zentralen Regulator in Brust-, Lungen-, Ovarial- und Gebärmutterhalskrebs darstellt (Calin, et al. 2004). Jedoch sind die regulatorischen Prozesse durch diese miRNA noch weitestgehend ungeklärt.

Diese verminderte Expression der miR-125b wurde auch in weiteren Studien bestätigt, in welchen auch bereits gezeigt werden konnte, dass in malignen Melanomen ein regulatorischer Zusammenhang zwischen Zellüberleben und Seneszenz und der verminderten miR-125b Expression besteht (Glud, et al. 2011; Glud, et al. 2010). Darüberhinaus konnten wir in unseren Untersuchungen auch eine Beeinflussung von proliferativen Prozessen im malignen Melanom durch die miR-125b nachweisen, welche durch eine Regulation der Genexpression von

Tumorsuppressoren und/oder der Induktion der CyclinD1 Transkription durch den Transkriptionsfaktor c-Jun erklärt werden könnte. Zudem zeigte sich in unseren Analysen nach miR-125b Re-Expression in Melanomzellen auch eine Reduktion des migratorischen Potentials, was unter anderem auf eine verringerte MMP9 Expression zurückzuführen war. MMP9 ist als Zielgen des Transkriptionsfaktors c-Jun bekannt und wird folglich indirekt über die miR-125b reguliert. Im malignen Melanom konnten bereits Effekte der miR-125b auf apoptotische Prozesse beschrieben werden (Glud, et al. 2011), welche möglicherweise auch auf die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch die miR-125b zurückzuführen sein könnten.

Diese Ergebnisse weisen im malignen Melanom auf eine zentrale Bedeutung dieser microRNA hin. Auch wurden einige miR-125b regulierte melanomrelevante Gene, wie zum Beispiel Akt3, Bcl-2, und E2F2, identifiziert (Glud, et al. 2010). Demnach scheint die miR-125b einen potentieller Tumorsuppressor im malignen Melanom darzustellen, durch dessen Verlust die Melanomprogression und- entwicklung gefördert wird.

#### **5.4.2 Die Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun durch die microRNA miR-125b**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die miR-125b als direkter Regulator des Transkriptionsfaktors c-Jun im malignen Melanom identifiziert werden. Diese Regulation erfolgt auf posttranskriptioneller Ebene durch direkte Bindung der miR-125b an die entsprechende *seed*-Sequenz im kodierenden Bereich der c-Jun mRNA, was in Einklang mit den bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe steht, welche eine posttranskriptionelle Regulation von c-Jun detektierte (Spangler, et al. 2011). Western Blot Analysen nach miR-125b Re-Expression in Melanomzellen zeigten eine verminderte c-Jun Proteinmenge, wobei Expressionsanalysen nach miR-125b Re-Expression in Melanomzellen keine Veränderung des c-Jun mRNA Levels ergaben. Neben der Regulation der c-Jun Proteinmenge konnte darüberhinaus bestätigt werden, dass in Abhängigkeit von c-Jun auch die AP-1 Aktivität, die AP-1-DNA Bindungsaktivität und die Expression verschiedener c-Jun Zielgene durch die Expression bzw. den Verlust der miR-125b beeinflusst werden. Darüberhinaus zeigte sich in immunhistochemischen Färbungen und miRNA *In-situ* Hybridisierung von Melanom-Gewebeproben eine inverse Korrelation der miR-125b und der c-Jun Expression.

Der Nachweis der Regulation durch direkte Bindung der miR-125b im kodierenden Bereich der c-Jun mRNA konnte unter anderem durch AGO2 Ko-Immunpräzipitationen erbracht werden. Dabei wurde die miR-125b in Melanomzellen reexprimiert, was eine theoretische Bindung der miR-125b an die *seed*-Sequenz im kodierenden Bereich der c-Jun mRNA bewirkt. Der RISC Komplex wurde dann mit einem anti-AGO2 Antikörper präzipitiert und daraus die mRNA isoliert. In Expressionsanalysen via qRT-PCR konnte im Vergleich zu den kontrolltransfizierten

Melanomzellen die c-Jun mRNA vermehrt in den miR-125b reexprimierenden Präzipitaten detektiert werden, da die c-Jun mRNA nur in diesen Proben im RISC Komplex gebunden vorlag. Die meisten miRNAs weisen eine regulatorische Wirkung auf spezifische Zielgene durch Bindung in der 3'-bzw. 5'-UTR der entsprechenden mRNA auf (Janga and Vallabhaneni 2011; Meister and Tuschl 2004; Vasudevan 2012). Dabei kann die miRNA Bindung an eine bestimmte mRNA zu einer Degradation der gebundenen mRNA führen, aber auch zu einer Inhibition der Translation (Bartel 2009; Orom, et al. 2008). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist wenig über den Mechanismus der posttranskriptionellen Regulation durch miRNAs während der Tumorgenese bekannt. Auch der molekulare Mechanismus der Regulation durch miRNA Bindung in der kodierenden Region spezifischer mRNAs ist noch weitestgehend unerforscht. Daher konnten wir im Rahmen der durchgeführten Studien im malignen Melanom einen neuen Regulationsmechanismus auf posttranskriptioneller Ebene durch miRNAs identifizieren.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Allgemeine Materialien

**Ambion, Austin, USA**

mirVana™ miRNA Isolation Kit, mirVana™  
qRT-PCR miRNA Detection Kit, mirVana™  
qRT-PCR Primer Sets, mirVana™ qRT- PCR Primer  
Sets for Normalization, Pre-miR™ miRNA (Precursor  
Molecules), Anti-miR™ (miRNA Inhibitors), Negative-  
control miR #1, Negative-anti-miR

**AppliChem, Darmstadt**

Nocodazol, Taxol

**BD Discovery Labware Falcon™,  
Boston, USA**

Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene  
Round-Bottom Tubes für  
LUC-Assay, Lab-Teks Objektträger für  
Immunfluoreszenz, Matrigel der Boydenkammer

**Behrens, Hamburg**

Agar für Bakterienkulturen

**Bio-Rad, München**

Immun-Blot™ PVDF Membran, Precision  
Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™

**BioWhittaker Molecular Applications,  
Rockland, USA**

SeaKern® LE Agarose

**Carl Zeiss, München-Hallbergmoos**

AxioCam, MR Grab Software

**Cytoskeleton, Denver, USA**

Microtubule Binding Protein Spin-down Assay Kit,  
Actin Binding Protein Biochem Kit

**Exiqon, Woburn, USA**

miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit  
(FFPE), miRCURY LNA microRNA Detection probe  
has-miR-125b

**GE Healthcare Europe GmbH, Germany**

Nick™ Columns

**GraphPad Software Inc., San Diego, USA**

GraphPad Prism 4.03 Software

**Invitrogen, Carlsbad, USA**

Lipofectamine LTX™ Reagent, Lipofectamine  
RNAiMAX™ Reagent, SuperScript™ II Reverse  
Transcriptase Kit,  
Ready-Load™ 100bp und 1kb DNA  
Ladder; Geneticin

---

<b>Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz</b>	Amaxa™ NHEM-Neo Nucleofector™ Kit
<b>Neuro Probe, Gaithersburg, USA</b>	Polykarbonat-Membranen für Boydenkammer (Porengröße 8µm)
<b>New England Biolabs, Ipswich, USA</b>	Restriktionsendonukleasen, NEBuffer für Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, Antarktische Phosphatase, NEB 10-beta <i>Competent E.coli</i>
<b>PAA Laboratories GmbH, Dartmouth, USA</b>	Trypsin
<b>PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach</b>	Fötales Kälberserum (FKS), Penicillin/ Streptomycin
<b>PerkinEmer, Rodgau</b>	ATP [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]- 6000Ci/mmol
<b>Pierce/Peribo Science, Bonn</b>	BCA Protein Assay Kit
<b>Promega, Heidelberg</b>	Dual-Luciferase® Reporter Assay System, pRL-TK Vektor, AP-1 LUC Vector, pGL2-basic und pGL3- control Vektor; AP-1 Oligonukleotide
<b>PromoCell, Heidelberg</b>	Melanocyte Growth Medium, Melanozyten
<b>Qiagen, Hilden</b>	HiSpeed™ Plasmid MIDI Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, HiPerFect Transfection Reagent, siRNAs
<b>Roche Diagnostics, Mannheim</b>	Taq®-DNA Polymerase, RNase A, LightCycler® Kapillaren, dN6 Primer, Polynukleotid Kinase, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Ethidiumbromid
<b>Roth, Karlsruhe</b>	Roti® Load1 4x denaturierend
<b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München</b>	alle nicht aufgeführten Chemikalien in Pulverform in p.a. Qualität, Acrylamid 40% Lösung, Bromphenolblau, BSA, Trypsin, TEMED, Ampicillin (Amp), DMSO, SDS, DTT, Tween-20, Oligonukleotide, Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640), Phosphate Buffered Saline (PBS)
<b>Stratagene, Heidelberg</b>	Epicurian Coli® XL2-Blue MRF' Ultra-competent Cells, QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit
<b>Takara Bio Inc., Shiga, Japan</b>	SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real-time)

<b>Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA</b>	Vectashield® Mounting Medium with DAPI
<b>VWR, Darmstadt</b>	Kaiser's Glycerin Gelatine, Schnellfärbelösungen 1, 2, 3 für Boydenkammer, 96-Well Platten für BCA-Messungen, Lab-Tek™ Chamber Slides
<b>Whatman International Ltd., Maidstone, England</b>	Whatman 3MM Filterpapier, Nucleopore® Track-Etch Membrane
<b>Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA</b>	BCIP/NBT Substrate Kit

### 6.1.2 Geräte

#### Autoklaven

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

#### Blotapparaturen

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell
------------------------------------	--------------------------------------

#### Brutschränke

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

#### Gelelektrophoreseapparaturen

Bio-Rad, München	Wide Mini Sub® Cell GT
------------------	------------------------

#### Heiz- und Kühlblöcke

Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436, Thermomixer comfort, Thermomixer compact
--------------------	---

#### Mikroskope

Leica Microsystems CMS GmbH, Bensheim	DM IL Type 090-135.001
Zeiss, Jena	Axiovert 10, Axiovert 200, Axio Imager Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskop

#### Spannungsgeräte

Bio-Rad, München	PowerPac Basic, PowerPac HC
GE Healthcare Life Science, Freiburg	Electrophoresis Power Supply 1001, Electrophoresis Power Supply 301

---

**Sterilwerkbanken**

Heraeus, Hanau	LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18
----------------	---------------------------------

---

**Thermocycler**

MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Roche Diagnostics, Mannheim	LightCycler® II
	LightCycler® 480

---

**Waagen**

Sartorius, Göttingen	R160P, L2200S
----------------------	---------------

---

**Zentrifugen**

Eppendorf, Hamburg	MiniSpin Plus, Centrifuge 5810R
Heraeus, Hanau	Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0
Kisker, Steinfurt	Tischzentrifuge
Roche Diagnostics, Mannheim	LC Carousel Centrifuge

---

**Sonstige Geräte**

Agilent, Santa Clar, USA	Hybridisierungssofen, SureHyb
	Hybridisierungskammer
Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz	Nucleofector™ I Device
Bachhofer, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 350 K, 245nm
Berthold, München	Lumat LB 9507, Geiger-Zähler LB122
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
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
Peqlab Biotechnologie GmbH,	Nanodrop® ND-1000-UV/Vis
Erlangen	Spektralphotometer
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522

**6.1.3 Bakterien**

NEB 10-beta Competent *Escherichia coli* (High Efficiency): Stamm K12, DH10β™-Derivat.

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF' ultrakompetente *Escherichia coli* Zellen (Stratagene, Heidelberg).

#### 6.1.4 Viren

Replikationsdefiziente Adenoviren (Ad):

Ad-E-Cadherin

Der Ad-E-Cadherin wurde von Prof. Dr. Meenhard Herlyn, The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania zur Verfügung gestellt.

#### 6.1.5 Säugerzelllinien

<b>A375</b>	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase (ATCC Nr. CRL-1619)
<b>Mel Ei</b>	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
<b>Mel Ho</b>	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (DSMZ-Nr. ACC62)
<b>Mel Im</b>	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
<b>Mel Ju</b>	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
<b>Mel Juso</b>	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (DSMZ-Nr. ACC74)
<b>Melanozyten (NHEMs)</b>	Normale humane epidermale Melanozyten
<b>SkMel 28</b>	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (ATCC-Nr. HTB- 72)
<b>Hmb2</b>	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase

#### 6.1.6 Gewebeproben

##### 6.1.6.1 Humane Gewebeproben

Tiefgefrorenes humanes Melanomgewebe (Primärtumor (PT) 16, 21, 97, 104, 126 und Metastase (Met) 90, 43, 93, 35, 95) sowie Formalin-fixiertes Paraffinmaterial von humanen Melanomen, Nävusproben und normaler Epidermis wurden von der Gewebebank des Institutes für Pathologie des Klinikums Regensburg bezogen. Die Verwendung des Patientenmaterials erfolgte unter Einhaltung der Richtlinien der Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg. Formalin-fixiertes Paraffinmaterial von humanen Melanomen aus Patienten vor und nach Taxolbehandlung, wurden von Prof. Dr. Dirk Schadendorf zur Verfügung gestellt (Institut für Dermatologie, Essen, Germany).

##### 6.1.6.2 Murine Gewebeproben

Alle verwendeten murinen Gewebeproben wurden vom DKFZ Heidelberg in Kooperation mit Prof. Dr. Umansky (DKFZ Heidelberg und Universitäts Klinikum Mannheim) bereitgestellt.



### 6.1.7 Vektoren

#### pcDNA3

Der pcDNA3 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) ermöglicht unter Verwendung des CMV (*Cytomegalovirus*) Promotors eine hohe, konstitutive Expression einklonierter Gensequenzen in einer Großzahl von Säugetierzelllinien.

#### pGL2-basic

Der pGL2-basic Vektor (Promega, Madison, USA) beinhaltet eine modifizierte kodierende Region für das Luziferase Gen der in Nord- und Mittelamerika verbreiteten Feuerfliege (*Photinus pyralis*), welches hinter einer multiplen Klonierungsstelle (MCS, multiple cloning site) liegt.

#### pGL3-control

Im Gegensatz zum pGL3-basic Vektor besitzt der pGL3-control Vektor (Promega, Madison, USA) SV40 (Simian vacuolating virus 40) Promotor und Enhancer Sequenzen. Diese führen zu einer starken, konstitutiven Expression des Luziferase Gens in einer Vielzahl von Säugetierzellen.

#### pGL3 miR-125b seed

Der pGL3-control Vektor (Promega, Madison, USA) wurde mit Hilfe der entsprechenden Primer (siehe 6.1.9.2) so mutiert, dass im kodierenden Bereich des Luziferase Gens eine potentielle miR-125b Bindestelle entstand.

#### pRL-TK

Dieser Vektor dient zur Kontrolle der Transfektionseffizienz bei der Durchführung von Luziferase Assays. Der pRL-TK Vektor (Promega, Madison, USA) wird zusammen mit dem Reporter-Plasmid kotransfiziert. Der Vektor enthält ein modifiziertes Luziferase Gen, welches aus dem marinen Organismus *Renilla reniformis* isoliert wurde, hinter einem HSV-TK (Herpes simplex Virus Thimidinkinase) Promotor. Durch Verwendung dieses Promotors wird eine schwache bis moderate Expression der *Renilla* Luziferase in den transfizierten Säugetierzellen ermöglicht.

#### AP-1 LUC

Das AP-1 Luciferase Plasmid (*Luciferase Assay*, Promega, Heidelberg) beinhaltet die AP-1 konsensus Bindungssequenz 5'-TGACTAA-3' siebenmal, welche in den pLUC-MCS Vektor, der das Luciferase-Gen enthält, kloniert wurde.

**ETS-1 Luciferase (ETS-1 LUC)**

Für das ETS-1 Luciferase Plasmid (*Luciferase Assay*, Promega, Heidelberg) wurde dreimal die Sequenz 5'-GATCTCGAGGAAGTGACTAACTGAGCACAGTCGA-3', mit der ETS-1 *Binding Site* (unterstrichen) in den PTKFLUC Vektor, welcher das Luciferase- Gen enthält, kloniert (Rothhammer, et al. 2004).

(Dieser Vektor wurde von Herrn Prof. Dr. F. Soncin, Institut de Biologie de Lille, Frankreich zur Verfügung gestellt.)

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

Die cDNAs der RhoGTPasen RhoA/B/C wurden jeweils zwischen die EcoR1 und Xho1 Schnittstellen des pCDNA3.1 Vektors (Invitrogen) kloniert. Die in diesen cDNAs enthaltenen T19N Mutation führt zu einem dominant negativen Phänotyp. Die Plasmide wurden vom Missouri S&T cDNA Resource Center käuflich erworben.

**asETS-1/ sense ETS-1**

Die antisense ETS-1 bzw. sense ETS-1 cDNA wurde in einen pCDNA3 Expressionsvektor (Invitrogen NV, Leek, Niederlande) kloniert (Rothhammer, et al. 2004).

**HJun CDS**

Der HJun Expressionsvektor beinhaltet sowohl den murinen Promotor von c-Jun, die kodierende Sequenz des c-Jun Gens als auch einen HA-tag einkloniert in einen pGL3 Vektor (Promega) (Polak, et al. 2006).

**HJun MUT 1**

Der HJun Expressionsvektor (HJun CDS) wurde im kodierenden Bereich an der potentiellen miR-125b Bindestelle mutiert (CTCAGGGA in CTGCGAGA).

**HJun MUT NLS**

Der an der potentiellen miR-125b Bindestelle mutierte HJun Expressionsvektor (HJun MUT 1) wurde an der *Nuclear Localization Sequence* (NLS) mit den entsprechenden Primern (siehe 6.1.9.2) mutiert.

### 6.1.8 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung	Verdünnung
c-Jun	Cell Signaling (Frankfurt am Mai, Germany)	WB	1:1000
c-Jun	Upstate; Merck (Darmstadt, Germany)	EMSA	
c-Jun	Active Motif	CoIP	1,5µg
E-Cadherin	BD Biosciences, Bedford, USA	WB	1:1000
HA-tag	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Germany)	WB	1:1000
Karyopherin 13 (Importin 13)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	WB	1:200
CYLD	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Germany)	WB CoIP	1:1000 1:50
β-actin	Sigma, St. Louis, USA	WB, CoIP	1:2000
α-tubulin (TYR)	Millipore, Merck (Darmstadt, Germany)	WB CoIP EMSA	1:2000 1µg/mg Lysat
RhoC	Santa Cruz Biotechnologies, INC. (Santa Cruz, USA)	WB	1:1000
Lamin	Millipore, Merck (Darmstadt, Germany)	WB	1:200
H2A	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Germany)	WB	1:1000

### Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung	Verdünnung
anti- mouse- AP	Chemicon (Hofheim)	Western Blot	1:3000
anti- rabbit- AP	Chemicon (Hofheim)	Western Blot	1:3000
anti- rat- AP	Chemicon (Hofheim)	Western Blot	1:3000
anti- goat- AP	Sigma-Aldrich (München)	Western Blot	1:30000
anti- mouse TRITC	DAKO (Hamburg)	Immunfluoreszenz	1:40
anti- rabbit FITC	DAKO (Hamburg)	Immunfluoreszenz	1:50

Die Abkürzung „FITC“ steht für Fluoresceinisothiocyanat, „TRITC“ steht für Tetramethylrhodamine-5-(and-6)-Isothiocyanate und „AP“ steht für Alkalische Phosphatase.

### 6.1.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) synthetisiert. Nach dem Lösen der lyophilisierten Primer mit ddH<sub>2</sub>O wurde die Stammlösung von 100µM bei -20°C gelagert. Für die (quantitative Real Time-) PCR Analysen wurden die entsprechenden Primer auf eine Konzentration von 20µM verdünnt.

#### 6.1.9.1 Oligonukleotide für EMSA

Name	Sequenz
<b>AP-1 Consensus Oligonucleotide</b>	5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3' 3'-GCGAACTACTCAGTCGGCCTT-5'

#### 6.1.9.2 Oligonukleotide für Expressionsanalysen und Mutagenese

Gen	Primer Nukleotidsequenz (fwd/rev)
<b><i>β-actin</i></b>	5'-CTACGTCGCCCTGGCTTCGAGC-3' 5'-GATGGAGCCGCCGATCCACACGG-3'
<b><i>c-Jun 45/251</i></b>	5'-TTCCTCCCGTCCGAGAGCGG-3' 5'-TCGGCGTGGTGGTGTGATGTGC-3'

<b><i>c-Jun 801/991</i></b>	5'-CGCGCGCGAGTCGACAAGTA-3'
	5'-GGGCTGCGCGCACAAGTTTC-3'
<b><i>MIA 220/544</i></b>	5'-CATGCATGCGGTCTATGCCCAAGCTG-3'
	5'-GATAAGCTTTCACTGGCAGTAGAAATC-3'
<b><i>MMP9</i></b>	5'-CCG CGC TGA CTC GAC GGT GAT G-3'
	5'- GAGGTGCCCCGGATGCCATTCACGT-3'
<b><i>Importin 6</i></b>	5'-CAGCAGAACAAGGACGGCCCC-3'
	5'-TGCTGCTTTGCAGGGTTCCA-3'
<b><i>Importin 5</i></b>	5'-AAAGCTCGTTCTGCCGATGA-3'
	5'-AGCAGAGCTGCAATCACCTT-3'
<b><i>Importin 7</i></b>	5'-AGTGAGTGCGCTATTCCTG-3'
	5'-CCCTGGTGCTGTTTCTCGAT-3'
<b><i>Importin 8</i></b>	5'-GAACCTCCACCAGGAGAAGC-3'
	5'-AGCTTGCACTGCTCTGTGAT-3'
<b><i>Importin 9</i></b>	5'-AATTCAGACCAGGCTCACCG-3'
	5'-AGGCGGGGCAAAATAATCCA-3'
<b><i>Importin 13</i></b>	5'-TTCCCTGAGGCACCTACTGT-3'
	5'-GCCTCCTTGATCCACATGCT-3'
<b><i>α-tubulin</i></b>	5'-GAAGCAGCAACCATGCGTGA-3'
	5'-GTGCCAGTGCGAACTTCATC-3'
<b><i>RhoC</i></b>	5'-CTGAGAAGTGGACCCCAGAG-3'
	5'-CAAGGTAGCCAAAGGCACTG-3'
<b><i>Mut-primer HAJun mut miR-125b (HAJun MUT 1)</i></b>	5'-GGCGTCCACGGCCAACATGCTGCGAGAACAGGTGGC-3'
	5'-GCCACCTGTTCTCGCAGCATGTTGGCCGTGGACGCC-3'
<b><i>Mut-primer pGL3 miR-125b wt (pGL3 miR-125b seed)</i></b>	5'CCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGCTCAGGGAAGGAGTTG
	TGTTTGTGG-3'
	5'CCACAAACACAACCTCCTCCCTGAGCTTTTTTCGCGGTTGTTACTT
	GACTGG-3'
<b><i>MUTPrimer NLS c-JUN_ R273A/R275A</i></b>	5'-CCTCCAAGTGCGCGAAAGCGAAGCTGGAGAGAATCGCCC-3'
	5'-GGGCGATTCTCTCCAGCGCCGCCGCCGCGCACTTGGAGG-3'
<b><i>MUTPrimer NLS c-Jun_ K274A/K276A (HAJun MUT NLS)</i></b>	5'-GCCTCCAAGTGCGCGGCGGCGGCGCTGGAGAG-3'
	5'-CTCTCCAGCGCCGCCGCCGCGCACTTGGAGGC-3'

### 6.1.9.3 Oligonukleotide für miRNA Expressionsanalysen

Die für die qRT-PCR Analysen der miRNA Expression notwendigen spezifischen RT- und PCR Primer wurden selbst entworfen, die zugehörigen RT- und PCR Primer zur Normalisierung (U6 snRNA) wurden von der Firma Ambion (Austin, USA) bezogen.

Name des Primers	Nukleotidsequenz
miR-125b_RT	CGCGCCTGCAGGTCGACAATTAACCCTCACTAAAGGGTCACAAGTTAGG
miR-125b_PCR	GTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGAGTCCCTGAGACC
miR-527_RT	CGCGCCTGCAGGTCGACAATTAACCCTCACTAAAGGGGAAAGGGCTTC
miR-527_PCR	GTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGAGCTGCAAAGGGA

### 6.1.9.4 siRNAs und miR Moleküle

Die siRNAs wurden von der Firma Qiagen (Hilden, Germany) bzw. bimers.net (Ulm, Germany) synthetisiert, die pre- und anti- miRs wurden von der Firma Ambion (Austin, Texas, USA) bezogen.

siRNA	Target Sequenz
si TUB1A 3_2	CTGAATAGGTTAATAGGTCAA
siImportinβ	GACTTACTCGATTCCCTTTA
siImportin5	CTCTTTACGTGCTCCGTTAA
siImportin7	CCTTTCTCCATGACGTTTTA
siImportin8	AATCACTCTCAGGTTAATTAA
siImportin9	GGATTACCCAACCTCTCTTAA
siImportin13	GGGAAGACTACTCCTTATAA
hsa-miR-125b pre-miR	CTCAGGGA
hsa-miR-125b anti-miR	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
Pre-miR Negative Control	nicht verfügbar
Anti-miR Negative Control	nicht verfügbar

### 6.1.10 Medien, Puffer/ Lösungen und Antibiotika

#### 6.1.10.1 Medien

<b>Luria Bertani Medium</b>	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl in H <sub>2</sub> O gelöst und autoklaviert Für Agarplatten: Zugabe von 15 g/l Agar Zur Selektion: Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin
<b>Dulbeccos Modified Eagle Medium</b>	DMEM: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Zusätze: 10% FKS 0,1% Penicillin/Streptomycin
<b>RPMI-1640</b>	RPMI: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Zusätze: 10% FKS 0,1% Penicillin/Streptomycin 2.0 gm/L sodium bicarbonate
<b>NHEM Medium</b>	MGM2 (Melanocyte Growth Medium 2), PromoCell, Heidelberg
<b>Einfriermedium</b>	50 ml DMEM (mit 10% FKS) 30 ml FKS 20 ml DMSO

#### 6.1.10.2 Puffer und Lösungen

##### Lösungen zur Isolation von Plasmiden

---

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	60 ml KOAc (5M) 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H <sub>2</sub> O

### Lösungen für die Agarose- Gelelektrophorese

---

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

### Lösungen zur Herstellung von Proteinlysaten (RIPA-Puffer)

---

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% (w/v) Nonidet® P40 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1% (w/v) SDS Proteaseinhibitoren
-------------	--

### Lösungen für die SDS (sodium-dodecyl-sulfat)-Gelelektrophorese

---

SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
12,5% Gel (Angaben für 1 Gel) (Trenngel)	3,125 ml Acrylamid 40% 3,75 ml Tris pH 8,8 (1 M) 2,97 ml H <sub>2</sub> O 100 µl SDS (40%) 50 µl APS 10 µl TEMED
10% Gel (Angaben für 1 Gel) (Trenngel)	2,5 ml Acrylamid 40% 3,75 ml Tris pH 8,8 (1 M) 3,6 ml H <sub>2</sub> O 100 µl SDS (40%) 50 µl APS 10 µl TEMED



8,75% Gel (Angaben für 1 Gel) (Trenngel)	2,2 ml Acrylamid 40% 3,75 ml Tris pH 8,8 (1 M) 3,925 ml H <sub>2</sub> O 100 µl SDS (40%) 50 µl APS 10 µl TEMED
4% Gel (Angaben für 1 Gel) (Sammelgel)	375 µl Acrylamid 40% 450 µl Tris pH 6,8 (1 M) 2,85 ml H <sub>2</sub> O 37,5 µl SDS (40%) 25 µl APS 3,5 µl TEMED
APS- Lösung (10%)	1g Ammoniumpersulfat in 10ml H <sub>2</sub> O

### Western Blot Lösungen

Western Blot Transferpuffer	10% (v/v) Methanol 25 mM Tris 190 mM Glycin
PBS (10x)	80g/l NaCl (1370mM) 2,0g/l KCl (27mM) 14,4g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (80mM) 2,4g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (18mM) mit HCl auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren
Blockingreagenzien	3% BSA/ PBS 5% BSA/ TBS-Tween (0,1%) 5% Milchpulver/ TBS-Tween (0,1%)

### Lösungen für Isolation von Kernproteinen und Puffer für *Electrophoretischen 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 <sub>2</sub> 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 <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 2 mM EDTA
TE Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA

### Sonstige Lösungen und Puffer

---

PBS (für die Zellkultur)	PAA, Dartmouth, USA
RNAse A Lösung	10 mM Tris/HCl pH 7,0 10 mg/ml RNAse A DNAsen werden durch 15min 100°C inaktiviert

#### 6.1.10.3 Antibiotika

Ampicillin- Stammlösung (500x)	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O (-20°C)
Geneticin-Stammlösung	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O (-20°C)

## 6.2 Methoden

Alle beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurden unter Verwendung steriler Gefäße und steriler Lösungen durchgeführt. Arbeiten mit Säugetierzellen wurden ausschließlich unter einer Sterilbank ausgeführt. Experimente, bei denen keine anderen Reaktionstemperaturen angegeben werden, fanden bei Raumtemperatur statt.

### 6.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

#### 6.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Transformierte *Escherichia coli* Bakterien wurden zur Amplifizierung von Plasmiden sowohl auf festem Nährboden als auch in Flüssigmedium kultiviert. Zur Selektion wurde dem Nährmedium ein spezifisches Antibiotikum (meist Ampicillin) zugesetzt. Kulturen in Flüssigmedium wurden durch Picken eines Klons mit einer sterilen Spitze angeimpft, zur Kultivierung auf Agarplatten wurden die Bakterien mit Hilfe eines Trigalsky Spatel ausplattiert. Flüssigkulturen wurden über Nacht in einem Schüttler bei 250 rpm und 37°C inkubiert, die Kultivierung der Bakterien auf Agarplatten erfolgte ebenfalls bei 37°C in einem Brutschrank.

#### 6.2.1.2 Transformation von *E.coli*

Kompetente *E.coli* Bakterien (100µl) wurden einer entsprechenden Menge an Plasmid-DNA zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgte ein 30sekündiger Hitzeschock bei 42°C, welcher die Plasmidaufnahme ins Zellinnere gewährleistet. Anschließend folgte eine weitere Inkubation von 5 Minuten auf Eis, nach welcher den Zellen 950µl LB-Medium zugesetzt und die Kultur 1 Stunde bei 37°C geschüttelt wurde. Die transformierten *E. coli* wurden bei 4000 rpm abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in dem verbleibenden Medium resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Die Bakteriensuspension wurde auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum, für welches ein Resistenzgen in der eingebrachten Plasmid-DNA vorliegt, ausplattiert und 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 6.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse wurde die Plasmid-DNA isoliert. Für die Plasmid Minipräparation (bis 5µg Plasmid-DNA) wurde 5ml steriles LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kultivierung erfolgte 16 Stunden bei 37°C und 250 rpm auf dem Bakterenschüttler. Aus 1 ml der Flüssigkultur wurde durch Abzentrifugieren ein Bakterienpellet gewonnen, welches in 100µl der Lösung I

resuspendiert wurde. Zur Lyse der Bakterien wurde nach 5 Minuten Inkubation auf Eis 200µl der Lösung II zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Durch die Zugabe der alkalischen, SDS enthaltenden Lösung II wird eine spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA ermöglicht. Nach anschließender Zugabe von 150µl der Lösung III und 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm sowohl denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA als auch chromosomale DNA entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene Plasmid-DNA mit 900µl reinem Ethanol durch 10-minütige Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm gefällt. Des dadurch gewonnene DNA Pellet wurde bei 37°C getrocknet und anschließend in 10µl eines H<sub>2</sub>O/ RNase Mixes (150µl H<sub>2</sub>O+ 5µl RNase) resuspendiert und 20 Minuten bei 37°C geschüttelt, um störende RNA aus dem Präparat zu entfernen.

Zur Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA (bis 250µg) wurden 50ml steriles LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum versetzt und mit 200µl Baktereinsuspension einer Vorkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte 16 Stunden bei 37°C in einem Bakterienschüttler. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem *HiSpeed™ Plasmid Midi Kit* der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit 1 ml RNase freiem H<sub>2</sub>O eluiert und bei -20 bzw. 4°C gelagert.

## 6.2.2 Nukleinsäureanalytik

### 6.2.2.1 Polymerase -Ketten- Reaktion (PCR)

Die Polymerase- Ketten- Reaktion ist eine in der Gentechnik routinemäßig eingesetzte Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Polymerasen sind Enzyme, die ein DNA-Fragment anhand des komplementären DNA- oder RNA- Matrizenstrangs synthetisieren. Dabei nutzt man thermophile DNA- Polymerasen aus Bakterien (*Thermus aquaticus*), die *Taq*-Polymerase, welche an den Enden des neu synthetisierten DNA- Stranges Überhänge herstellt. Bei der Polymerase-Ketten- Reaktion wird selektiv ein bestimmter DNA Abschnitt, welcher zwischen zwei gegenläufigen Primern (Oligonukleotiden) liegt, amplifiziert. Diese Primer sind komplementär zu den Randbereichen des zu vervielfältigenden DNA-Fragments. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50µl und der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

5µl	10x PCR-Puffer
0,5µl	dNTPs (je 10 mM)
1µl	Primer forward (20 mM)
1µl	Primer reverse (20 mM)
10ng	Template-DNA

0,5µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)  
ad 50µl ddH<sub>2</sub>O

Die Reaktion wurde in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Nach einem ersten Denaturierungsschritt für 5 Minuten bei 94°C wurde die Reaktion folgendem PCR-Programm unterzogen:

Denaturierung bei	94°C, 45 Sekunden
Annealing der Primer bei	x°C, 60 Sekunden
Elongation bei	72°C, y Sekunden

Sowohl die optimale Annealing Temperatur (**x**) als auch die optimale Dauer der Elongation (**y**) sind abhängig von der Nukleinsäuresequenz der verwendeten Primer, bzw. der Größe des erwarteten Produkts und wurden dementsprechend angepasst. Die Amplifikation erfolgte über 35 Zyklen und wurde durch einen 5-minütigen Elongationsschritt bei 72°C abgeschlossen.

#### **6.2.2.2 Quantitative Echtzeit PCR**

Zur Quantifizierung der Expressionsstärke einer spezifischen mRNA wurde die Technik der quantitativen RT-PCR Reaktion, mit Hilfe des LightCycler® II Systems bzw. des LightCycler® 480 Systems von Roche Diagnostics, Mannheim, genutzt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem in 6.2.2.7 beschriebenen Protokoll. Die RT-PCR wurde wie folgt in einem 20µl Ansatz durchgeführt:

8,0µl ddH<sub>2</sub>O  
0,5µl Primer forward (20µM)  
0,5µl Primer reverse (20µM)  
10µl TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ (LightCycler® II) bzw. 10µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master (LightCycler® 480 Systems)  
1,0µl cDNA Template (10ng/µl)

Der Versuchsansatz wurde dabei folgendem Programm im LightCycler® II unterzogen:

Denaturierung	1 Zyklus	20°C/sec auf 95°C, 30 s ec
Amplifikation	40 Zyklen	20°C/sec auf 95°C, 15 sec

		20°C/sec auf x°C, 5 sec
		20°C/sec auf 72°C, 10 sec
	Messtemperatur	20°C/s auf x°C
Schmelzpunktanalyse	1 Zyklus	20°C/sec auf 95°C, 15 sec
		20°C/sec auf 65°C, 15 sec
		20°C/sec auf 95°C, 15 sec
		0,1°C/sec auf 40°C

Der Versuchsansatz wurde dabei folgendem Programm im LightCycler® 480 unterzogen:

Denaturierung	1 Zyklus	4,4°C/sec auf 95°C, 10 min
Amplifikation	45 Zyklen	4,4°C/sec auf 95°C, 10 sec
		2,2°C/sec auf x°C, 10 sec
		4,4°C/sec auf 72°C, 20 sec
	Messtemperatur	4,4°C/sec auf x°C, 1 sec
Schmelzpunktanalyse	1 Zyklus	4,4°C/sec auf 95°C, 5 sec
		2,2°C/sec auf 65°C, 60 sec
		0,11°C/sec auf 97°C
		2,2°C/sec auf 40°C, 30 sec

Annealing- und Messtemperaturen sind abhängig vom jeweiligen Primerpaar. Als Standard zur Quantifizierung wurde  $\beta$ -Aktin bzw. U6 (für miRNA Quantifizierung) genutzt. Die Analyse erfolgte mit der zugehörigen Software nach Angaben des Herstellers.

### 6.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese zur DNA- Auftrennung

Die negative Ladung der DNA gewährleistet, dass sie in einem elektrischen Feld zum positiven Pol wandert. Somit erfolgt die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,8-2% Agarose in TAE) bei einer konstanten Spannung von 10V/cm. Je nach Größe der DNA-Moleküle verwendet man unterschiedlich prozentuale Anteile an Agarose im Gel (bis 100bp: 2-3% Agarose; 500bp-12kb: 0,8-1% Agarose). Die DNA wurde anhand einer Ethidiumbromidlösung (0,04%) für 10-30 Minuten gefärbt und konnte folglich durch Anregung mit UV-Licht bei 245nm detektiert werden, da das interkalierte Ethidiumbromid durch die UV-Absorption im sichtbaren Bereich fluoresziert. Die Größe der Fragmente wurde durch einen ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA Längenstandards abgeschätzt.

#### **6.2.2.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung in Ethidiumbromidlösung (siehe 3.2.2.3) wurden die zu untersuchenden Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, abgewogen und nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Elution erfolgte mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### **6.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Die Konzentrationen von DNA bzw. RNA Lösungen wurden anhand eines Nanodrop® Spektralphotometers (Firma Peqlab, Erlangen) vermessen.

#### **6.2.2.6 Isolierung von RNA aus Säugetierzellen**

Die RNA Isolation aus konfluent wachsenden Zellen erfolgte unter Verwendung des *E.Z.N.A. Total RNA Kit I* (Firma Omega Bio-Tek, VWR, Darmstadt). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% bzw. 0,02% (w/v)) von der Zellkulturschale abgelöst und pelletiert. Die Isolierung der RNA erfolgte anschließend nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 40 µL RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert und bei -20° gelagert.

Für miRNA Expressionsanalysen erfolgte eine fraktionierte Isolierung von kleinen und großen RNA-Spezies unter Verwendung des *mirVana™ miRNA Isolation Kits* der Firma Ambion (Austin, USA).

#### **6.2.2.7 Reverse Transkription**

Für die Transkription von mRNA in cDNA wurden pro Reaktion 500ng RNA eingesetzt.

4µl	First Strand buffer (5x)
2µl	DTT (0,1 M)
1µl	dNTPs (jeweils 10 mM)
1µl	dN6 Primer (random Hexamer Primer, 2 mg/ml)
1µl	Total-RNA (500 ng/µl)
ad 20µl	mit ddH <sub>2</sub> O

Zur Denaturierung der mRNA wurde der Ansatz 5 Minuten bei 70°C inkubiert und nach anschließendem Abkühlen des Ansatzes 1µl (200 Units) Superscript II Reverse Transkriptase zugegeben. Nach 60 Minuten Reverser Transkription bei 37°C erfolgte eine 10-minütige

Denaturierung des Enzyms bei 70°C. Nach einem RNA Verdau von 30 Minuten bei 37°C durch Zugabe von 1µl RNase A Lösung konnte die cDNA bei -20°C gelagert werden.

### **6.2.2.8 miRNA in situ Hybridisierung**

Zur Detektion der miR-125b Expression in humanen Gewebeproben wurde der *miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit* (FFPE) von Exiqon (Woburn, USA) verwendet. Dazu wurde die miRCURY LNA microRNA hsa-miR-125b und eine Negativkontrolle des Herstellers eingesetzt. Das Protokoll wurde entsprechend der Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

### **6.2.3 Arbeiten mit Radioaktivität**

#### **6.2.3.1 Herstellung von radioaktiv markierten EMSA Proben**

Das von der Firma Promega, Heidelberg kommerziell erworbene AP-1 DNA- Fragment wurde in einem 20µl Reaktionsansatz radioaktiv markiert:

3µl	dsOligonukleotid
2µl	Polynukleotidkinase Puffer (10x)
11µl	H <sub>2</sub> O
1µl	Polynukleotidkinase
3µl	[γ- <sup>32</sup> P] ATP

Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei wurde eine radioaktiv markierte Phosphatgruppe durch die Polynukleotidkinase auf die dsDNA übertragen.

#### **6.2.3.2 Reinigung radioaktiv markierter Oligonukleotide**

Um radioaktiv markierte DNA-Fragmente von freien, nicht eingebauten Nukleotiden zu trennen, wurden *NICK™-Columns* der Firma Amersham verwendet. Nachdem die Pufferlösung aus den Säulen abgetropft ist, wurde der Reaktionsansatz der radioaktiven Markierung mit <sup>32</sup>P auf die Säule gebracht und anschließend mit 200µl TE- Puffer (pH 7,5) gespült. Die erste, hauptsächlich aus Puffer bestehende Fraktion wurde verworfen. Durch weiteres dreimaliges Spülen der Säule mit je 200µl TE-Puffer wurden noch drei Fraktionen gewonnen, wobei die markierte dsDNA Matrize mit der dritten und vierten Fraktion von der Säule gespült wurde. Freie Nukleotide verblieben in der Säule. Diejenige Fraktion, welche die höchste Effizienz der Markierung aufwies wurde für die *Electrophoretic Mobility Shift Assays* verwendet.

#### **6.2.3.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Zur *in vitro* Analyse von DNA-Protein- Interaktionen wurden *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs) durchgeführt. Diese Methodik basiert auf einem veränderten Laufverhalten von DNA-



Fragmenten mit gebundenen Proteinen im Gegensatz zu freier DNA in nativer Gelelektrophorese. Die Visualisierung der DNA erfolgt über deren Radioaktivmarkierung. Ein Reaktionsansatz für den EMSA enthielt folgende Komponenten:

5-10µg	Kernprotein
4µl	5x EMSA Binding Puffer
1µl	Poly (dIdC) (1mg/ml)
2µl	radioaktiv markiertes Oligonukleotid (20000cpm/µl)
auf 20µl	H <sub>2</sub> O

Durch eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur konnten die im Kernextrakt enthaltenen, nachzuweisenden Proteine an die DNA-Matrize binden. Zur Gewährleistung der Spezifität der Bindung des Proteins an die DNA-Matrize wurde in Kontrollansätzen unmarkiertes Oligonukleotid in 50- bis 200-fachem Überschuss als Kompetitor zugegeben. Die Ansätze wurden mit 4µl Ladepuffer beschwert und anschließend auf ein natives 4,5% Polyacrylamidgel aufgetragen, welches bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm in 1/4x TBE für ca. 2,5 Stunden lief. Das Gel wurde auf Whatman-Filterpapier in einem Vakuumgeltdrockner getrocknet und konnte anschließend autoradiographisch analysiert werden. Hierfür wurde ein Röntgenfilm (Kodak Biomax MR, Scientific Imaging Film) für etwa 24h aufgelegt und entwickelt.

## **6.2.4 Proteinanalytik**

### **6.2.4.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten**

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden die Zellen in der Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS aufgenommen, resuspendiert und nochmals bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellyse erfolgte durch Inkubation mit 100-200 µl RIPA Lysepuffer für 15 Minuten auf dem Schüttler bei 4°C. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C konnten Zellbestandteile sowie RNA und DNA von den Proteinen im Überstand abgetrennt werden. Der Gesamtproteinextrakt wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

### **6.2.4.2 Präparation von Kernproteinen**

Alle Schritte der Kernproteinextraktion erfolgten auf Eis, Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in der Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1ml PBS aufgenommen, resuspendiert und

nochmals 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Zellmembranlyse erfolgte durch Zugabe von 200µl Puffer I (siehe 6.1.9.2) und 15-minütiger Inkubation auf Eis. Nach der Inkubation wurden 12,5µl 10%iges Nonylphenylpolyethylene Glykol NP-40 zur Verbesserung der Lyse zugegeben. Die Kerne wurden bei 10000 rpm für 1 Minute abzentrifugiert und der Überstand, welcher die zytoplasmatische Fraktion enthält, verworfen. Die Kernproteine wurde durch 15-minütiges Schütteln bei 4°C in 40µl Puffer II (siehe 6.1.9.2) über eine Hochsalzkonzentration isoliert. Zur Entfernung von Kerndebris folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm. Nach der Zentrifugation konnten die sich im Überstand befindenden Kernproteine in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert werden. Die Kernproteine können nach dem Auftauen nicht wieder eingefroren werden, da es dabei zu einer Degradation der Proteine kommt.

#### **6.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Gesamt- und Kernproteinen**

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in wässrigen Lösungen wurde das *BCA-Protein-Assay Kit* der Firma Pierce (Pierce/Peribo Science, Bonn) verwendet. Diese Methode basiert auf der durch Peptidbindungen in Proteinen vermittelten alkalischen Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  (Biuret Reaktion). Das einwertige Kupfer bildet mit Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, welcher durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann. Von der Gesamtproteinlösung werden 5µl mit 200µl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in das Well einer 96-Well Platte gegeben. Anschließend erfolgt eine ca. 20-minütige Inkubation unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur bis zur Entwicklung der violetten Färbung. Die Messung der Absorption bei 562nm erfolgte in einem ELISA-Reader (MWG Biotech, Ebersberg). Durch die parallele Quantifizierung von BSA-Standards konnte die in den Proteinextrakten enthaltene Konzentration bestimmt werden.

#### **6.2.4.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch die Anlagerung von SDS an die Proteine werden deren Tertiär- und Sekundärstrukturen zerstört und Ladungsunterschiede neutralisiert. Durch die so erhaltene negative Ladung der Proteine können sie elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dazu wurden 20-40 µg Proteinproben (Kernextrakte oder Gesamtproteinextrakte) mit 1x Roti-Load Probenpuffer für 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> auf 8 bis 12,75%igen Polyacrylamid Gelen aufgetrennt.

#### **6.2.4.5 Western Blot**

Um durch SDS-Page aufgetrennte Proteine durch spezifische Antikörper nachzuweisen, wurden die Proteine zunächst auf eine PVDF-Membran geblottet. Das Polyacrylamidgel wurde zunächst 15 Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Die PVDF Membran wurde 5 Minuten in Methanol und anschließend weitere 5 Minuten in 1x Western-Blot Puffer (siehe 6.1.9.2) inkubiert. Die PVDF-Membran und jeweils 2 x 2 Whatman Papiere wurden 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 (*Sandwich-Methode*). Danach wurden die Proteine mittels elektrophoretischen Transfers (Bio-Rad, Wide Mini Sub<sup>®</sup>Cell GT, 45 min bei 15V) auf die Membran transferiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur in der jeweiligen Blockinglösung inkubiert und danach über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen Primär-Antikörper in geeigneter Verdünnung in der Blockinglösung geschwenkt. Nach dem Waschen (3x5min mit TBS/ 0,1% Tween) wurde die Membran für eine Stunde mit dem Sekundär-Antikörper, welcher gegen den konstanten Teil des Primär-Antikörpers gerichtet ist und mit AP (Alkalischer Phosphatase) konjugiert ist, inkubiert. Nach abschließendem Waschen der Membran von 3x10 Minuten mit dem entsprechenden Puffer erfolgte die Detektion mittels des *BCIP/ NBT Substrate Kit*.

#### **6.2.4.6 Ko-Immunpräzipitation**

Zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen wurden Ko-Immunpräzipitationen mittels G-Sepharosebeads durchgeführt. Vor Verwendung der G-Sepharosebeads müssen diese 5x mit PBS gewaschen werden. 100µg des entsprechenden Proteinlysates wurden dann auf 500µl mit PBS aufgefüllt und mit 15µl der gewaschenen G- Sepharosebeads bei 4°C auf dem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Dieser sogenannte Preclearing Schritt dient dazu Proteine, welche unspezifisch an die G-Sepharosebeads binden, zu entfernen. Nach der Inkubation wurden die G-Sepharosebeads bei 4°C und 2000 rpm abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit den entsprechenden Antikörpern (anti-c-Jun, anti-α-tubulin, anti-Importin 13, anti-Aktin, anti-CYLD Antikörper) über Nacht bei 4°C auf dem Über-Kopf-Schüttler inkubiert, um die spezifische Protein- Antikörper Bindung zu gewährleisten. Nach diesem weiteren Inkubationsschritt wurden 30µl gewaschene G-Sepharosebeads zu den einzelnen Versuchsansätzen gegeben und erneut über Nacht bei 4°C auf dem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die Antikörper mit den spezifisch gebundenen Proteinen binden in diesem Schritt an die G-Sepharosebeads und können nach Beendigung der Inkubation nach 3-maligen Waschen mit eiskaltem PBS durch Abzentrifugieren bei 4°C und 2000 rpm isoliert werden. Die Detektion der

Proteine, welche an die Protein-Antikörper Komplexe gebunden haben, erfolgte via Western-Blot nach Aufkochen der G-Sepharosebeads mit 30µl Lämmli-puffer bei 70°C.

#### **6.2.4.7 *Microtubuli Spin down Assay***

Um direkte Interaktionen zwischen Proteinen und Mikrotubuli zu detektieren, wurde der *Microtubule Binding Protein Spin-down Assay Kit* (Cytoskeleton, Denver, USA) verwendet. Dazu wurden 30µg Proteinlysate eingesetzt und das Protokoll entsprechend der Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

#### **6.2.4.8 *Immunfluoreszenz***

Für die Immunfluoreszenz werden 20.000- 50.000 Zellen auf sogenannte „Lap Teks“ (chamber cover slides) ausgesät. Diese *Lap-Teks* sind Objektträger, welche in 4-8 Kammern unterteilt sind. Nach 24-48 Stunden Inkubationszeit im 37°C Brutschrank werden die Zellen auf den Objektträger mit 4%igem Paraformaldehyd 15 Minuten fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen durch eine 5-minütige Inkubation mit 0,1% Triton-X100. Danach folgten 3 weitere Waschschrte von jeweils 5 Minuten mit PBS. Um unspezifische Proteine zu blocken wurden die Zellen mit 1% BSA/PBS eine Stunde in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend folgte die einstündige Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper (anti- $\alpha$ -tubulin, anti-c-Jun), welcher je nach Produkt 1:10 bis 1:40 mit PBS verdünnt wurde. Nach weiterem 3-maligen Waschen mit PBS wurde mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (FITC anti-rabbit 1:40, bzw. TRITC-anti-mouse 1:150) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch erneutes viermaliges Waschen für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde der überschüssige Antikörper entfernt. Die Kernfärbung erfolgte mit einer DAPI-Lösung, die dem VectaShield Slide Mounting Medium zugesetzt war. Dieses Medium wurde zum Eindeckeln der Objektträger verwendet. Die Analyse der Fluoreszenzfärbung (Wellenlänge des Exzitationsmaximums: 495nm, Emissions-maximum: 528nm) erfolgte am Axio Imager Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskop (Axiovision, Carl Zeiss, Oberkochen).

#### **6.2.4.9 *Immunhistologie***

Die immunhistologischen Untersuchungen wurden von Rudolf Jung (Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) mit Hilfe des *Envision™ Systems* von Dako (Hamburg) etabliert und durchgeführt. Die Paraffinschnitte der verschiedenen Gewebe wurden im Wärmeschrank bei 72°C für 30 Minuten inkubiert, durch Behandlung mit Xylol entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Schnitte im Schnellkochtopf bei 120°C für 5 Minuten mit Tris-EDTA Puffer inkubiert, um das Antigen zu demaskieren. Des Weiteren wurde die

endogene Peroxidase mit Hilfe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abgesättigt. Nach dem Waschen erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten mit dem spezifischen c-Jun Antikörper und die nachfolgende Behandlung mit dem Sekundäntikörper für ebenfalls 30 Minuten. Durch Inkubation mit DAB+Substrat-Chromogen Lösung für 10 Minuten konnte eine spezifische Färbung des Gewebes detektiert werden. Die Gegenfärbung mit positiv geladenem Hämatoxylin ermöglichte die Visualisierung der negativ geladenen Zellkerne.

## **6.2.5 Zellkulturmethoden**

### **6.2.5.1 Kultivierung von humanen Melanomzellen und normalen humanen Melanozyten**

Die verwendeten Melanomzellen wurden in DMEM bzw. RPMI mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte durch Waschen mit PBS, Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA, anschließender Aufnahme der flottierenden Zellen in DMEM bzw. RPMI und Zentrifugation bei 1200 rpm für 4 Minuten. Das Zellpellet wurde in DMEM bzw. RPMI resuspendiert und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflasche überführt. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Normale humane epidermale Melanozyten (NHEMs) wurden in Melanozytenmedium (PromoCell, Heidelberg) kultiviert und bevorzugt nur in den frühen Passagen verwendet (Passage 1-6). Die Passagierung erfolgte analog zu den Melanomzelllinien.

Die Kultivierung von Melanomzellen, welche stabil mit einem Expressionsvektor transfiziert worden waren, erfolgte unter Geneticinzugabe (25µl/ml), um durch diesen Selektionsdruck den Verlust des eingebrachten Plasmids zu verhindern.

### **6.2.5.2 Transiente und stabile Transfektion von humanen Zellen**

Zur Transfektion von Melanomzellen mit kleinen RNA Molekülen (siRNAs und pre-miR<sup>TM</sup> bzw. anti-miR<sup>TM</sup> Molekülen) wurde das HiPerFect Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) bzw. das RNAiMAX Transfektionsreagenz (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Dazu wurden die Zellen in 6-Well Kulturplatten ausgesät (80.000- 200.000 Zellen/well in 2 ml DMEM bzw RPMI). Es wurden 40nM siRNA, -miR<sup>TM</sup> oder anti-miR<sup>TM</sup> (20µM Stock-Lösung) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Die entsprechenden Transfektionsansätze wurden entsprechend den Herstellerangaben angesetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen nach einer Inkubationszeit von 24-96 Stunden zur Isolierung von RNA (siehe 6.2.2.6) bzw. Gesamtproteinlysate (siehe 6.2.4.1) verwendet, in Luziferase *Reporter Gene Assays* (siehe 6.2.5.3) oder in funktionelle Assays (siehe 6.2.5.4; 6.2.5.5) eingesetzt.

Die Transfektion von Melanomzellen mit Plasmiden erfolgte durch die Lipofektamin Methode mit Lipofektamin™ LTX und LipofektaminPlus™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). Zur transienten Transfektion wurden 80.000-200.000 Zellen pro Well im 6-Well Format ausgesät. Bei 50-80% Konfluenz der Zellen wurden diese mit frischem Medium versorgt und der entsprechende Transfektionsansatz nach Angaben des Herstellers zugegeben. Pro Transfektionsansatz wurden zwischen 0,5 bis 1,0µg Plasmid DNA eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen bis zur Ernte weitere 24 bis 96h inkubiert. Transient transfizierte Zellen wurden entweder in Luziferase-Reporter Assays eingesetzt oder zur Isolation von Gesamtzellprotein bzw. RNA herangezogen. Zur stabilen Transfektion von Zelllinien wurde der Vektor mittels der Lipofektamin Methode in die Zellen eingebracht und durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums einem Selektionsdruck ausgesetzt. Das Antibiotikum wurde anhand des Resistenzgens, welches der Vektor trägt, ausgewählt.

Normale humane epidermale Melanozyten (NHEMs) wurden mithilfe der Nucleofector® Technologie (Amaxa, Köln) transfiziert. Hierbei wurde der *NHEM-Neo Nucleofector® Kit* entsprechend den Herstellerangaben angewandt.

### **6.2.5.3 Luziferase Reporter Gene Assay**

Durch sogenannte Reporter Gen Analysen lassen sich regulatorische DNA Sequenzen untersuchen. Die Aktivität eines Promotors lässt sich über Transfektion eines Reporterplasmids pGL2-basic, in welches ein DNA-Fragment mit dem zu untersuchenden Promotorbereich kloniert wurde, analysieren. Diesem Promotorbereich ist das Luziferase-Gen nachgeschaltet, dessen Chemilumineszenz durch Zugabe des Substrates Luziferin am Photometer gemessen werden kann. Die Expression des Reportergens verhält sich dabei im eukaryotischen Testsystem proportional zum Aktivierungspotential des klonierten DNA-Fragments. Um Variationen der Transfektionseffizienz in den einzelnen Transfektionsansätzen berücksichtigen zu können wurde der Kontrollvektor pRL-TK (Promega, Heidelberg), welcher das Renilla Luziferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält ko-transfiziert. Zur Durchführung des Luziferase Reporter Gene Assays wurde das *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* von Promega (Heidelberg) verwendet. Die Zellen wurden dazu mittels der Lipofektamin Methode transfiziert (siehe 6.2.5.2) und nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium abgegossen. Anschließend wurde die Zellen im 6-Well Format zweimal mit Leitungswasser gespült und 20 Minuten mit je 300µl Lysispuffer (1:5 verdünnt) bei leichtem Schütteln lysiert. Nach der Lyse wurden je 50µl eines Versuchsansatzes mit den im Kit bereitgestellten Reagenzien im Luminometer vermessen.

#### **6.2.5.4 Proliferations Assay (XTT)**

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Melanomzellen wurde der XTT Zellproliferations-Kit der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Es wurden Zellen in verschiedenen Zellzahlen (500, 1.000 oder 2.000 Zellen pro Well) in eine 96-Well Platte in dreifach Ansätzen in DMEM High Glucose (ohne Phenolrot) ausgesät. Die Inkubation erfolgte 24 Stunden bei 37°C, 8% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Pro Well wurden anschließend 50µl XTT Reagenz (*XTT labeling reagent & electron coupling reagent*) zugesetzt. Die Stoffwechselleistung aktiver Zellen wurde durch die Reduktion bzw. Spaltung eines Tetrazolium-Salzes (*XTT labeling reagent*) zu einem Formazan-Salz, in der Gegenwart eines Elektronen-Akzeptors (electron coupling reagent), bestimmt. Proportional zu der Reduktion erfolgte ein Farbumschlag der Reagenzien von gelb nach orange. Dieser Farbumschlag wurde im *ELISA reader (Emax precision microplate reader, Molecular Devices GmbH, München)* bei 490nm nach 2 und 4 stündiger Inkubation gemessen. Die Zugabe der Reagenzien und Vermessung der einzelnen Platten erfolgte in den 3 folgenden Tagen analog.

#### **6.2.5.5 Migrations-Assay (Boyden Kammer)**

Zur Untersuchung des Migrationspotentials von Melanomzellen wurde der *Migrations-Assay* verwendet. Dazu wurden sogenannte Boydenkammer im unteren Kompartiment mit 210µl konditioniertem Medium befüllt. Konditioniertes Medium wurde durch 24-stündige Kultivierung von konfluenten Fibroblasten in Medium ohne FKS gewonnen. Auf das untere Kompartiment mit konditioniertem Medium wurde ein mit Gelatine beschichteter Polycarbonat Filter (Neuro Pore, Gaithersburg, USA) mit einer Porengröße von 8µm luftblasenfrei aufgelegt und der Aufsatz der Boydenkammer aufgeschraubt. Die jeweiligen Zellen wurden mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und gezählt, um anschließend 30.000 Zellen pro ml einstellen zu können. In weiterer Folge wurden die Zellen in DMEM bzw. RPMI ohne FKS aufgenommen und je 800µl der Zellsuspension in das obere Kompartiment der Boydenkammer gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 8% CO<sub>2</sub> wurde die Zellsuspension aus allen Kammern abgegossen, der Aufsatz abgeschraubt und der Filter herausgenommen. Die obere Seite der Filter wurde mit einem feuchten Papiertuch abgewischt, die Filter in einen Färberahmen gelegt und mittels Hemacolor Schnellfärbung (bestehend aus Fixierlösung, Eosin-Färbelösung und Thiazin-Färbelösung; VWR, Darmstadt) gefärbt. Nach abschließendem Spülen der Filter mit Leitungswasser wurden diese mit der Unterseite nach oben auf Objektträger aufgelegt. Die Anzahl der migrierten Zellen konnte durch Auszählen im Mikroskop bestimmt werden.

### 6.2.6 Arbeiten mit Mäusen

Alle Arbeiten mit Mäusen wurden am DKFZ Heidelberg im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Umansky (DKFZ Heidelberg und Universitäts Klinikum Mannheim) durchgeführt. Die *ret* transgenen Mäuse (Zhao, et al. 2009), welche Melanome entwickeln, wurden über 5 Tage hinweg zweimal täglich mit Taxol (15mg/kg) oder PBS (Kontrolle) behandelt. Am Tag 7 wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen an Mausgewebe Paraffinpräparate hergestellt.

### 6.2.7 Statistik

Statistische Auswertungen wurden mittels der GraphPad Prism Software (GraphPad software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Alle Experimente wurden in mindestens zwei unabhängigen Versuchen wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Signifikanzberechnungen zwischen einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's paired t-Test oder dem Two-Way Anova-Test durchgeführt. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns: nicht signifikant.



## 7 Eigene Publikationen

Spangler, B., **M. Kappelmann**, B. Schittek, S. Meierjohann, L. Vardimon, A. K. Bosserhoff & S. Kuphal (2012) ETS-1/RhoC signaling regulates the transcription factor c-Jun in melanoma. *Int J Cancer*, 130, 2801-11.

**Kappelmann, M.**, S. Kuphal, G. Meister, L. Vardimon & A. K. Bosserhoff (2013) MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression. *Oncogene*, 32, 2984-91.

**Kappelmann, M.**, A. Bosserhoff & S. Kuphal (2013) AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol.* (Review).

**Kappelmann, M.**; S. Kuphal, R. Krupar, D. Schadendorf, V. Umansky, L. Vardimon and Anja-Katrin Bosserhoff, 2014. Crucial role of Microtubule Dynamics on c-JUN activity in melanoma. (Zur Veröffentlichung eingereicht)

## 8 Anhang

### 8.1 Literaturverzeichnis

Agarwal, S. K., S. C. Guru, C. Heppner, M. R. Erdos, R. M. Collins, S. Y. Park, S. Saggari, S. C. Chandrasekharappa, F. S. Collins, A. M. Spiegel, S. J. Marx, and A. L. Burns, 1999. Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* 96(1):143-52.

Algazi, A. P., C. W. Soon, and A. I. Daud, 2010. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. *Cancer Manag Res* 2:197-211.

Alt-Holland, A., Y. Shamis, K. N. Riley, T. M. DesRochers, N. E. Fusenig, I. M. Herman, and J. A. Garlick, 2008. E-cadherin suppression directs cytoskeletal rearrangement and intraepithelial tumor cell migration in 3D human skin equivalents. *J Invest Dermatol* 128(10):2498-507.

Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, and M. Karin, 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49(6):729-39.

Asnaghi, L., W. C. Vass, R. Quadri, P. M. Day, X. Qian, R. Braverman, A. G. Papageorge, and D. R. Lowy, 2010. E-cadherin negatively regulates neoplastic growth in non-small cell lung cancer: role of Rho GTPases. *Oncogene* 29(19):2760-71.

Bakiri, L., D. Lallemand, E. Bossy-Wetzel, and M. Yaniv, 2000. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J* 19(9):2056-68.

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

Bartel, D. P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215-33.

Bellovin, D. I., R. C. Bates, A. Muzikansky, D. L. Rimm, and A. M. Mercurio, 2005. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res* 65(23):10938-45.

Bellovin, D. I., K. J. Simpson, T. Danilov, E. Maynard, D. L. Rimm, P. Oettgen, and A. M. Mercurio, 2006. Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene* 25(52):6959-67.

Bemis, L. T., R. Chen, C. M. Amato, E. H. Classen, S. E. Robinson, D. G. Coffey, P. F. Erickson, Y. G. Shellman, and W. A. Robinson, 2008. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Res* 68(5):1362-8.

Berking, C., R. Takemoto, K. Satyamoorthy, R. Elenitsas, and M. Herlyn, 2001. Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin. *Am J Pathol* 158(3):943-53.

Berx, G., and F. van Roy, 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(6):a003129.

Bhoumik, A., and Z. Ronai, 2008. ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle* 7(15):2341-5.

Bienz, M., 2005. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* 15(2):R64-7.

Boone, B., M. Van Gele, J. Lambert, M. Haspelslagh, and L. Brochez, 2009. The role of RhoC in growth and metastatic capacity of melanoma. *J Cutan Pathol* 36(6):629-36.

Bos, T. J., P. Margiotta, L. Bush, and W. Wasilenko, 1999. Enhanced cell motility and invasion of chicken embryo fibroblasts in response to Jun over-expression. *Int J Cancer* 81(3):404-10.

Breslow, A., 1970. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172(5):902-8.

Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C. M. Croce, 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15524-9.

Calin, G. A., Y. Pekarsky, and C. M. Croce, 2007. The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 20(3):425-37.

Calin, G. A., C. Sevignani, C. D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini, and C. M. Croce, 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):2999-3004.

Cano, A., M. A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo, and M. A. Nieto, 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2(2):76-83.

Carbonaro, M., D. Escuin, A. O'Brate, M. Thadani-Mulero, and P. Giannakakou, 2012. Microtubules regulate hypoxia-inducible factor-1alpha protein trafficking and activity: implications for taxane therapy. *J Biol Chem* 287(15):11859-69.

Cavaliere, F., T. Ruscio, R. Tinoco, S. Benedict, C. Davis, and P. K. Vogt, 1985. Isolation of three new avian sarcoma viruses: ASV 9, ASV 17, and ASV 25. *Virology* 143(2):680-3.

Chan, J. A., A. M. Krichevsky, and K. S. Kosik, 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65(14):6029-33.

Chapman, P. B., A. Hauschild, C. Robert, J. B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S. J. O'Day, J. A. Sosman, J. M. Kirkwood, A. M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R. J. Lee, K. T. Flaherty, G. A. McArthur, and Brim- Study Group, 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364(26):2507-16.

Checchi, P. M., J. H. Nettles, J. Zhou, J. P. Snyder, and H. C. Joshi, 2003. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharmacol Sci* 24(7):361-5.

Chen, J., H. E. Feilotter, G. C. Pare, X. Zhang, J. G. Pemberton, C. Garady, D. Lai, X. Yang, and V. A. Tron, 2010. MicroRNA-193b represses cell proliferation and regulates cyclin D1 in melanoma. *Am J Pathol* 176(5):2520-9.

Cimmino, A., G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, and C. M. Croce, 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39):13944-9.

Clark, E. A., T. R. Golub, E. S. Lander, and R. O. Hynes, 2000. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406(6795):532-5.

Clark, W. H., Jr., D. E. Elder, D. th Guerry, M. N. Epstein, M. H. Greene, and M. Van Horn, 1984. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 15(12):1147-65.

Clark, W. H., Jr., H. L. Evans, M. A. Everett, E. R. Farmer, J. H. Graham, M. C. Mihm, Jr., J. Rosai, R. W. Sagebiel, and M. R. Wick, 1991. Early melanoma. Histologic terms. *Am J Dermatopathol* 13(6):579-82.

Clark, W. H., Jr., and M. C. Mihm, Jr., 1969. Lentigo maligna and lentigo-maligna melanoma. *Am J Pathol* 55(1):39-67.

Collisson, E. A., C. Kleer, M. Wu, A. De, S. S. Gambhir, S. D. Merajver, and M. S. Kolodney, 2003. Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2(10):941-8.

Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J. S. Gutkind, 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81(7):1137-46.

Croce, C. M., 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10(10):704-14.

Dalmay, T., and D. R. Edwards, 2006. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene* 25(46):6170-5.

Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal, 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417(6892):949-54.

Deng, Y., H. Deng, F. Bi, J. Liu, L. T. Bemis, D. Norris, X. J. Wang, and Q. Zhang, 2011. MicroRNA-137 targets carboxyl-terminal binding protein 1 in melanoma cell lines. *Int J Biol Sci* 7(1):133-7.

Dumontet, C., and M. A. Jordan, 2010. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9(10):790-803.

Dynek, J. N., S. M. Chan, J. Liu, J. Zha, W. J. Fairbrother, and D. Vucic, 2008. Microphthalmia-associated transcription factor is a critical transcriptional regulator of melanoma inhibitor of apoptosis in melanomas. *Cancer Res* 68(9):3124-32.

Eferl, R., and E. F. Wagner, 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3(11):859-68.

Eis, P. S., W. Tam, L. Sun, A. Chadburn, Z. Li, M. F. Gomez, E. Lund, and J. E. Dahlberg, 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(10):3627-32.

Esquela-Kerscher, A., and F. J. Slack, 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6(4):259-69.

Fang, Y., J. L. Xue, Q. Shen, J. Chen, and L. Tian, 2012. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 55(6):1852-62.

Fanghänel J., Pera F., Anderhuber F., Nitsch R. , 2003 Waldeyer Anatomie des Menschen. Berlin - New York: Walter de Gruyter GmbH 6 Co. KG.

Felicetti, F., M. C. Errico, P. Segnalini, G. Mattia, and A. Care, 2008. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 8(11):1759-65.

Fialka, I., H. Schwarz, E. Reichmann, M. Oft, M. Busslinger, and H. Beug, 1996. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol* 132(6):1115-32.

Flaherty, K. T., C. Robert, P. Hersey, P. Nathan, C. Garbe, M. Milhem, L. V. Demidov, J. C. Hassel, P. Rutkowski, P. Mohr, R. Dummer, U. Trefzer, J. M. Larkin, J. Utikal, B. Dreno, M. Nyakas, M. R. Middleton, J. C. Becker, M. Casey, L. J. Sherman, F. S. Wu, D. Ouellet, A. M. Martin, K. Patel, D. Schadendorf, and Metric Study Group, 2012. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 367(2):107-14.

Fletcher, D. A., and R. D. Mullins, 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463(7280):485-92.

Flitney, E. W., E. R. Kuczmarski, S. A. Adam, and R. D. Goldman, 2009. Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. *FASEB J* 23(7):2110-9.

Freitas, N., and C. Cunha, 2009. Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. *Curr Genomics* 10(8):550-7.

Fremin, C., and S. Meloche, 2010. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 3:8.

Friedman, E. B., S. Shang, E. V. de Miera, J. U. Fog, M. W. Teilum, M. W. Ma, R. S. Berman, R. L. Shapiro, A. C. Pavlick, E. Hernando, A. Baker, Y. Shao, and I. Osman, 2012. Serum microRNAs as biomarkers for recurrence in melanoma. *J Transl Med* 10:155.

Fuchs, S. Y., L. Dolan, R. J. Davis, and Z. Ronai, 1996. Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* 13(7):1531-5.

Fuse, N., K. Yasumoto, H. Suzuki, K. Takahashi, and S. Shibahara, 1996. Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 219(3):702-7.

Ganem, N. J., Z. Storchova, and D. Pellman, 2007. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17(2):157-62.

Gao, J., L. Huo, X. Sun, M. Liu, D. Li, J. T. Dong, and J. Zhou, 2008. The tumor suppressor CYLD regulates microtubule dynamics and plays a role in cell migration. *J Biol Chem* 283(14):8802-9.

Garbe, C., 2000. [Increasing incidence of malignant melanoma]. *Hautarzt* 51(7):518.

Gershenwald, J. E., W. Sumner, T. Calderone, Z. Wang, S. Huang, and M. Bar-Eli, 2001. Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumor growth in vivo. *Oncogene* 20(26):3363-75.

Gilchrist, B. A., M. S. Eller, A. C. Geller, and M. Yaar, 1999. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 340(17):1341-8.

Glud, M., V. Manfe, E. Biskup, L. Holst, A. M. Dirksen, N. Hastrup, F. C. Nielsen, K. T. Drzewiecki, and R. Gniadecki, 2011. MicroRNA miR-125b induces senescence in human melanoma cells. *Melanoma Res* 21(3):253-6.

Glud, M., M. Rossing, C. Hother, L. Holst, N. Hastrup, F. C. Nielsen, R. Gniadecki, and K. T. Drzewiecki, 2010. Downregulation of miR-125b in metastatic cutaneous malignant melanoma. *Melanoma Res* 20(6):479-84.

Gottardi, C. J., and B. M. Gumbiner, 2001. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol* 11(19):R792-4.

Guo, J., L. Si, Y. Kong, K. T. Flaherty, X. Xu, Y. Zhu, C. L. Corless, L. Li, H. Li, X. Sheng, C. Cui, Z. Chi, S. Li, M. Han, L. Mao, X. Lin, N. Du, X. Zhang, J. Li, B. Wang, and S. Qin, 2011. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol* 29(21):2904-9.

Haass, N. K., and M. Herlyn, 2005. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Invest Dermatol Symp Proc* 10(2):153-63.

Hafliadottir, B. S., K. Bergsteinsdottir, C. Praetorius, and E. Steingrimsson, 2010. miR-148 regulates Mitf in melanoma cells. *PLoS One* 5(7):e11574.

Hakem, A., O. Sanchez-Sweetman, A. You-Ten, G. Duncan, A. Wakeham, R. Khokha, and T. W. Mak, 2005. RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev* 19(17):1974-9.

Halaban, R., 1996. Growth factors and melanomas. *Semin Oncol* 23(6):673-81.

Hall, A., 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279(5350):509-14.

Hall, A., 2009. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28(1-2):5-14.

Hall, A., and C. D. Nobes, 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1399):965-70.

Hammond, J. W., D. Cai, and K. J. Verhey, 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 20(1):71-6.

Hauschild, A., J. J. Grob, L. V. Demidov, T. Jouary, R. Gutzmer, M. Millward, P. Rutkowski, C. U. Blank, W. H. Miller, Jr., E. Kaempgen, S. Martin-Algarra, B. Karaszewska, C. Mauch, V. Chiarion-Sileni, A. M. Martin, S. Swann, P. Haney, B. Mirakhur, M. E. Guckert, V. Goodman, and P. B. Chapman, 2012. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380(9839):358-65.

Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin, 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7(11):2135-48.

Hill, C. S., J. Wynne, and R. Treisman, 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81(7):1159-70.

Hsu, M., T. Andl, G. Li, J. L. Meinkoth, and M. Herlyn, 2000. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* 113 ( Pt 9):1535-42.

Hsu, M. Y., F. Meier, and M. Herlyn, 2002. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 70(9-10):522-36.

Huang, S., D. Jean, M. Luca, M. A. Tainsky, and M. Bar-Eli, 1998. Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J* 17(15):4358-69.

Ishiguro, K., T. Ando, O. Maeda, O. Watanabe, and H. Goto, 2011. Cutting edge: tubulin alpha functions as an adaptor in NFAT-importin beta interaction. *J Immunol* 186(5):2710-3.

Janga, S. C., and S. Vallabhaneni, 2011. MicroRNAs as post-transcriptional machines and their interplay with cellular networks. *Adv Exp Med Biol* 722:59-74.

Javelaud, D., V. I. Alexaki, M. J. Pierrat, K. S. Hoek, S. Dennler, L. Van Kempen, C. Bertolotto, R. Ballotti, S. Saule, V. Delmas, and A. Mauviel, 2011. GLI2 and M-MITF transcription factors control exclusive gene expression programs and inversely regulate invasion in human melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 24(5):932-43.

Jean, D., J. E. Gershenwald, S. Huang, M. Luca, M. J. Hudson, M. A. Tainsky, and M. Bar-Eli, 1998. Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J Biol Chem* 273(26):16501-8.

Jin, X., X. Song, L. Li, Z. Wang, Y. Tao, L. Deng, M. Tang, W. Yi, and Y. Cao, 2007. Blockade of AP-1 activity by dominant-negative TAM67 can abrogate the oncogenic phenotype in latent membrane protein 1-positive human nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog* 46(11):901-11.

Jochum, W., E. Passegue, and E. F. Wagner, 2001. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20(19):2401-12.

Johannessen, C. M., J. S. Boehm, S. Y. Kim, S. R. Thomas, L. Wardwell, L. A. Johnson, C. M. Emery, N. Stransky, A. P. Cogdill, J. Barretina, G. Caponigro, H. Hieronymus, R. R. Murray, K. Salehi-Ashtiani, D. E. Hill, M. Vidal, J. J. Zhao, X. Yang, O. Alkan, S. Kim, J. L. Harris, C. J. Wilson, V. E. Myer, P. M. Finan, D. E. Root, T. M. Roberts, T. Golub, K. T. Flaherty, R. Dummer, B. L. Weber, W. R. Sellers, R. Schlegel, J. A. Wargo, W. C. Hahn, and L. A. Garraway, 2010. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468(7326):968-72.

Johnson, J. P., 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18(3):345-57.

Johnson, S. M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown, and F. J. Slack, 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120(5):635-47.

Jordan, M. A., and L. Wilson, 1999. The use and action of drugs in analyzing mitosis. *Methods Cell Biol* 61:267-95.

Jordan, M. A., and L. Wilson, 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4(4):253-65.

Kappelmann, M., A. Bosserhoff, and S. Kuphal, 2013a. AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol*.

Kappelmann, M., S. Kuphal, G. Meister, L. Vardimon, and A. K. Bosserhoff, 2013b. MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression. *Oncogene* 32(24):2984-91.

Karin, M., 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270(28):16483-6.

Keehn, C. A., B. R. Smoller, and M. B. Morgan, 2003. Expression of the ets-1 proto-oncogene in melanocytic lesions. *Mod Pathol* 16(8):772-7.

Knirsh, R., I. Ben-Dror, B. Spangler, G. D. Matthews, S. Kuphal, A. K. Bosserhoff, and L. Vardimon, 2009. Loss of E-cadherin-mediated cell-cell contacts activates a novel mechanism for up-regulation of the proto-oncogene c-Jun. *Mol Biol Cell* 20(7):2121-9.

Kovary, K., and R. Bravo, 1991. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11(9):4466-72.

Kunz, M., 2013. MicroRNAs in melanoma biology. *Adv Exp Med Biol* 774:103-20.

Kuphal, S., I. Poser, C. Jobin, C. Hellerbrand, and A. K. Bosserhoff, 2004. Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* 23(52):8509-19.

Lafanechere, L., C. Courtay-Cahen, T. Kawakami, M. Jacrot, M. Rudiger, J. Wehland, D. Job, and R. L. Margolis, 1998. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci* 111 ( Pt 2):171-81.



Lamb, R. F., R. F. Hennigan, K. Turnbull, K. D. Katsanakis, E. D. MacKenzie, G. D. Birnie, and B. W. Ozanne, 1997. AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol Cell Biol* 17(2):963-76.

Lekmine, F., C. K. Chang, N. Sethakorn, T. K. Das Gupta, and G. I. Salti, 2007. Role of microphthalmia transcription factor (Mitf) in melanoma differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 354(3):830-5.

Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn, 2001. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 61(9):3819-25.

Lopez-Bergami, P., H. Habelhah, A. Bhoumik, W. Zhang, L. H. Wang, and Z. Ronai, 2005. RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]. *Mol Cell* 19(3):309-20.

Lopez-Bergami, P., C. Huang, J. S. Goydos, D. Yip, M. Bar-Eli, M. Herlyn, K. S. Smalley, A. Mahale, A. Eroshkin, S. Aaronson, and Z. Ronai, 2007. Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell* 11(5):447-60.

Lopez-Bergami, P., H. Kim, A. Dewing, J. Goydos, S. Aaronson, and Z. Ronai, 2010. c-Jun regulates phosphoinositide-dependent kinase 1 transcription: implication for Akt and protein kinase C activities and melanoma tumorigenesis. *J Biol Chem* 285(2):903-13.

Mackie, R. M., A. Hauschild, and A. M. Eggermont, 2009. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 20 Suppl 6:vi1-7.

Maki, Y., T. J. Bos, C. Davis, M. Starbuck, and P. K. Vogt, 1987. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(9):2848-52.

Marinissen, M. J., M. Chiariello, and J. S. Gutkind, 2001. Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway. *Genes Dev* 15(5):535-53.

Marinissen, M. J., M. Chiariello, T. Tanos, O. Bernard, S. Narumiya, and J. S. Gutkind, 2004. The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol Cell* 14(1):29-41.

Matrone, M. A., R. A. Whipple, E. M. Balzer, and S. S. Martin, 2010. Microtentacles tip the balance of cytoskeletal forces in circulating tumor cells. *Cancer Res* 70(20):7737-41.

Meister, G., 2010. Small RNA-guided gene silencing. *Forschungsbericht, RNA Biologie* (Meister, MPI) (Dr. Gunter Meister).

Meister, G., and T. Tuschl, 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431(7006):343-9.

Mialhe, A., L. Lafanechere, I. Treilleux, N. Peloux, C. Dumontet, A. Bremond, M. H. Panh, R. Payan, J. Wehland, R. L. Margolis, and D. Job, 2001. Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Res* 61(13):5024-7.

Miller, A. J., and M. C. Mihm, Jr., 2006. Melanoma. *N Engl J Med* 355(1):51-65.

Mils, V., J. Piette, C. Barette, J. Veyrone, A. Tesniere, C. Escot, J. J. Guilhou, and N. Basset-Seguin, 1997. The proto-oncogene c-fos increases the sensitivity of keratinocytes to apoptosis. *Oncogene* 14(13):1555-61.

Minden, A., A. Lin, T. Smeal, B. Derijard, M. Cobb, R. Davis, and M. Karin, 1994. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 14(10):6683-8.

Mucha, S. R., A. Rizzani, A. L. Gerbes, P. Camaj, W. E. Thasler, C. J. Bruns, S. T. Eichhorst, E. Gallmeier, F. T. Kolligs, B. Goke, and E. N. De Toni, 2009. JNK inhibition sensitises hepatocellular carcinoma cells but not normal hepatocytes to the TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Gut* 58(5):688-98.

Mueller, D. W., and A. K. Bosserhoff, 2009. Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma. *Br J Cancer* 101(4):551-6.

Mueller, D. W., M. Rehli, and A. K. Bosserhoff, 2009. miRNA expression profiling in melanocytes and melanoma cell lines reveals miRNAs associated with formation and progression of malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 129(7):1740-51.

Muller, D. W., and A. K. Bosserhoff, 2008. Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. *Oncogene* 27(52):6698-706.

Nakabeppu, Y., K. Ryder, and D. Nathans, 1988. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell* 55(5):907-15.

Oikawa, M., M. Abe, H. Kurosawa, W. Hida, K. Shirato, and Y. Sato, 2001. Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 289(1):39-43.

Oren, A., A. Herschkovitz, I. Ben-Dror, V. Holdengreber, Y. Ben-Shaul, R. Seger, and L. Vardimon, 1999. The cytoskeletal network controls c-Jun expression and glucocorticoid receptor transcriptional activity in an antagonistic and cell-type-specific manner. *Mol Cell Biol* 19(3):1742-50.

Orom, U. A., F. C. Nielsen, and A. H. Lund, 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30(4):460-71.

Panka, D. J., M. B. Atkins, and J. W. Mier, 2006. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 12(7 Pt 2):2371s-2375s.

Pawlak, G., and D. M. Helfman, 2001. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11(1):41-7.

Perl, A. K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb, and G. Christofori, 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392(6672):190-3.

Philippidou, D., M. Schmitt, D. Moser, C. Margue, P. V. Nazarov, A. Muller, L. Vallar, D. Nashan, I. Behrmann, and S. Kreis, 2010. Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma. *Cancer Res* 70(10):4163-73.

Podar, K., M. S. Raab, G. Tonon, M. Sattler, D. Barila, J. Zhang, Y. T. Tai, H. Yasui, N. Raje, R. A. DePinho, T. Hideshima, D. Chauhan, and K. C. Anderson, 2007. Up-regulation of c-Jun inhibits proliferation and induces apoptosis via caspase-triggered c-Abl cleavage in human multiple myeloma. *Cancer Res* 67(4):1680-8.

Polak, P., A. Oren, I. Ben-Dror, D. Steinberg, S. Sapoznik, A. Arditi-Duvdevany, and L. Vardimon, 2006. The cytoskeletal network controls c-Jun translation in a UTR-dependent manner. *Oncogene* 25(5):665-76.

Pollock, P. M., U. L. Harper, K. S. Hansen, L. M. Yudt, M. Stark, C. M. Robbins, T. Y. Moses, G. Hostetter, U. Wagner, J. Kakareka, G. Salem, T. Pohida, P. Heenan, P. Duray, O. Kallioniemi, N. K. Hayward, J. M. Trent, and P. S. Meltzer, 2003. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33(1):19-20.

Polsky, D., and C. Cordon-Cardo, 2003. Oncogenes in melanoma. *Oncogene* 22(20):3087-91.

Poser, I., and A. K. Bosserhoff, 2004. Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histol Histopathol* 19(1):173-88.

Poser, I., D. Dominguez, A. G. de Herreros, A. Varnai, R. Buettner, and A. K. Bosserhoff, 2001. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 276(27):24661-6.

Poser, I., J. Tatzel, S. Kuphal, and A. K. Bosserhoff, 2004. Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene* 23(36):6115-24.

Price, L. S., and J. G. Collard, 2001. Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. *Semin Cancer Biol* 11(2):167-73.

Rigoutsos, I., 2009. New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res* 69(8):3245-8.

Rothhammer, T., J. C. Hahne, A. Florin, I. Poser, F. Soncin, N. Wernert, and A. K. Bosserhoff, 2004. The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci* 61(1):118-28.

Ruth, M. C., Y. Xu, I. H. Maxwell, N. G. Ahn, D. A. Norris, and Y. G. Shellman, 2006. RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. *J Invest Dermatol* 126(4):862-8.

Sahai, E., and C. J. Marshall, 2002a. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2(2):133-42.

Sahai, E., and C. J. Marshall, 2002b. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol* 4(6):408-15.

Saito, Y., T. Furukawa, Y. Arano, Y. Fujibayashi, and T. Saga, 2010. Basic study on SH2 domain of Grb2 as a molecular probe for detection of RTK activation. *Int J Oncol* 37(2):281-7.

Sanders, D. S., K. Blessing, G. A. Hassan, R. Bruton, J. R. Marsden, and J. Jankowski, 1999. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol* 52(3):151-7.

Santiago-Walker, A., and M. Herlyn, 2010. The ups and downs of transcription factors in melanoma. *J Natl Cancer Inst* 102(15):1103-4.

Schoenwaelder, S. M., and K. Burridge, 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11(2):274-86.

Schreiber, M., A. Kolbus, F. Piu, A. Szabowski, U. Mohle-Steinlein, J. Tian, M. Karin, P. Angel, and E. F. Wagner, 1999. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* 13(5):607-19.

Segura, M. F., D. Hanniford, S. Menendez, L. Reavie, X. Zou, S. Alvarez-Diaz, J. Zakrzewski, E. Blochin, A. Rose, D. Bogunovic, D. Polsky, J. Wei, P. Lee, I. Belitskaya-Levy, N. Bhardwaj, I. Osman, and E. Hernando, 2009. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6):1814-9.

Shah, M., A. Bhoumik, V. Goel, A. Dewing, W. Breitwieser, H. Kluger, S. Krajewski, M. Krajewska, J. Dehart, E. Lau, D. M. Kallenberg, H. Jeong, A. Eroshkin, D. C. Bennett, L. Chin, M. Bosenberg, N. Jones, and Z. A. Ronai, 2010. A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development. *PLoS Genet* 6(12):e1001258.

Sharrocks, A. D., 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(11):827-37.

Shaulian, E., 2010. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal* 22(6):894-9.

Shaulian, E., and M. Karin, 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20(19):2390-400.

Shaulian, E., and M. Karin, 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4(5):E131-6.

Shaulian, E., M. Schreiber, F. Piu, M. Beeche, E. F. Wagner, and M. Karin, 2000. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 103(6):897-907.

- Shimizu, Y., I. Kinoshita, J. Kikuchi, K. Yamazaki, M. Nishimura, M. J. Birrer, and H. Dosaka-Akita, 2008. Growth inhibition of non-small cell lung cancer cells by AP-1 blockade using a cJun dominant-negative mutant. *Br J Cancer* 98(5):915-22.
- Silye, R., A. J. Karayiannakis, K. N. Syrigos, S. Poole, S. van Noorden, W. Batchelor, H. Regele, W. Sega, H. Boesmueller, T. Krausz, and M. Pignatelli, 1998. E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 186(4):350-5.
- Sosman, J. A., K. B. Kim, L. Schuchter, R. Gonzalez, A. C. Pavlick, J. S. Weber, G. A. McArthur, T. E. Hutson, S. J. Moschos, K. T. Flaherty, P. Hersey, R. Kefford, D. Lawrence, I. Puzanov, K. D. Lewis, R. K. Amaravadi, B. Chmielowski, H. J. Lawrence, Y. Shyr, F. Ye, J. Li, K. B. Nolop, R. J. Lee, A. K. Joe, and A. Ribas, 2012. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 366(8):707-14.
- Spangler, B., M. Kappelmann, B. Schitteck, S. Meierjohann, L. Vardimon, A. K. Bosserhoff, and S. Kuphal, 2012. ETS-1/RhoC signaling regulates the transcription factor c-Jun in melanoma. *Int J Cancer* 130(12):2801-11.
- Spangler, B., L. Vardimon, A. K. Bosserhoff, and S. Kuphal, 2011. Post-transcriptional regulation controlled by E-cadherin is important for c-Jun activity in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 24(1):148-64.
- Steingrimsson, E., N. G. Copeland, and N. A. Jenkins, 2004. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 38:365-411.
- Straub, B. K., S. Rickelt, R. Zimbelmann, C. Grund, C. Kuhn, M. Iken, M. Ott, P. Schirmacher, and W. W. Franke, 2011. E-N-cadherin heterodimers define novel adherens junctions connecting endoderm-derived cells. *J Cell Biol* 195(5):873-87.
- Suyama, E., H. Minoshima, H. Kawasaki, and K. Taira, 2002. Identification of AP-2-regulated genes by macroarray profiling of gene expression in human A375P melanoma. *Nucleic Acids Res Suppl* (2):247-8.
- Suzuki, S. T., 1996. Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *J Cell Biochem* 61(4):531-42.
- Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81(1):153-208.
- Tergaonkar, V., 2006. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 38(10):1647-53.
- Thompson, J. F., R. A. Scolyer, and R. F. Kefford, 2005. Cutaneous melanoma. *Lancet* 365(9460):687-701.
- Toft, D. J., S. B. Rosenberg, G. Bergers, O. Volpert, and D. I. Linzer, 2001. Reactivation of proliferin gene expression is associated with increased angiogenesis in a cell culture model of fibrosarcoma tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23):13055-9.

- van Dam, H., and M. Castellazzi, 2001. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20(19):2453-64.
- Vasudevan, S., 2012. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3(3):311-30.
- Verhey, K. J., and J. Gaertig, 2007. The tubulin code. *Cell Cycle* 6(17):2152-60.
- Villanueva, J., A. Vultur, and M. Herlyn, 2011. Resistance to BRAF inhibitors: unraveling mechanisms and future treatment options. *Cancer Res* 71(23):7137-40.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers, and F. van Roy, 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66(1):107-19.
- Vogt, P. K., 2001. Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 20(19):2365-77.
- Vogt, P. K., T. J. Bos, and R. F. Doolittle, 1987. Homology between the DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxyl-terminal region of a protein coded for by the oncogene jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(10):3316-9.
- Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, and C. M. Croce, 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7):2257-61.
- Voller, D., C. Ott, and A. Bosserhoff, 2013. MicroRNAs in malignant melanoma. *Clin Biochem* 46(10-11):909-17.
- Wagener, C., and O. Müller, 2010. *Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumore*. Stuttgart, New York: Thieme.
- Waldmann, I., S. Walde, and R. H. Kehlenbach, 2007. Nuclear import of c-Jun is mediated by multiple transport receptors. *J Biol Chem* 282(38):27685-92.
- Wang, A. X., and X. Y. Qi, 2013. Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. *IUBMB Life* 65(9):748-58.
- Wang, L., L. Yang, Y. Luo, and Y. Zheng, 2003. A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J Biol Chem* 278(45):44617-25.
- Weiss, C., and D. Bohmann, 2004. Deregulated repression of c-Jun provides a potential link to its role in tumorigenesis. *Cell Cycle* 3(2):111-3.
- Westermann, S., and K. Weber, 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(12):938-47.

Weston, C. R., and R. J. Davis, 2007. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19(2):142-9.

Whipple, R. A., M. A. Matrone, E. H. Cho, E. M. Balzer, M. I. Vitolo, J. R. Yoon, O. B. Ioffe, K. C. Tuttle, J. Yang, and S. S. Martin, 2010. Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Res* 70(20):8127-37.

Wilson, L., and M. A. Jordan, 2004. New microtubule/tubulin-targeted anticancer drugs and novel chemotherapeutic strategies. *J Chemother* 16 Suppl 4:83-5.

Wittmann, T., and C. M. Waterman-Storer, 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci* 114(Pt 21):3795-803.

Xu, Y., T. Brenn, E. R. Brown, V. Doherty, and D. W. Melton, 2012. Differential expression of microRNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumour suppressors. *Br J Cancer* 106(3):553-61.

Yajima, I., M. Y. Kumasaka, N. D. Thang, Y. Goto, K. Takeda, O. Yamanoshita, M. Iida, N. Ohgami, H. Tamura, Y. Kawamoto, and M. Kato, 2012. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatol Res Pract* 2012:354191.

Yamaguchi, H., and J. Condeelis, 2007. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 1773(5):642-52.

Yang, J., and R. A. Weinberg, 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14(6):818-29.

Zenz, R., H. Scheuch, P. Martin, C. Frank, R. Eferl, L. Kenner, M. Sibilica, and E. F. Wagner, 2003. c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev Cell* 4(6):879-89.

Zhang, G., C. R. Dass, E. Sumithran, N. Di Girolamo, L. Q. Sun, and L. M. Khachigian, 2004. Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents. *J Natl Cancer Inst* 96(9):683-96.

Zhao, F., C. Falk, W. Osen, M. Kato, D. Schadendorf, and V. Umansky, 2009. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase drives dendritic cells to become tolerogenic in ret transgenic mice spontaneously developing melanoma. *Clin Cancer Res* 15(13):4382-90.

Zhou, J., and P. Giannakakou, 2005. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5(1):65-71.

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP-1	Activating Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	antisense
ATF	Activation Transcription Factor
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchromsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bZIP	Basic leucine zipper Domain
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA
CRE	cyclic AMP Responsive Element
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
E-cadherin	Epithelial Cadherin
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E-coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N', N', N', N', Tetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	Extracellular Signaling-Regulated Kinase
et al.	et alii
etc.	et cetera
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm



h	Stunden
IPO	Importin/ Karyopherin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen (-paare)
kDA	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertani
LMM	Lentigo-maligna Melanom
LUC	Luziferase
μ	Mikro ( $10^{-6}$ )
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar (mol/L)
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MIA	Melanoma Inhibitory Activity
min	Minuten
miR	microRNA
MITF	Microphthalmie assoziierter Transkriptionsfaktor
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
MTD	<i>Microtubule Targeting Drug</i>
N-cadherin	Neuronal Cadherin
NFκB	Nuclear Factor of kappa Light Chain Gene Enhancer in B-Cells
NHEM	Normale humane epidermale Melanozyten
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
PAA	Poly-Acrylamid
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKC	Protein Kinase C

Poly dIdC	Poly-desoxy-Cytosin-desoxy-Inosin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RGP	Radial Growth Phase
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate
TRE	Phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate (TPA) Response Element
TUB1A	$\alpha$ -Tubulin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VGP	Vertical Growth Phase
(v/v)	Volumenverhältnis
(w/v)	Masse pro Volumen

### 8.3 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen, die mich während meiner Promotionsarbeit begleitet und unterstützt haben sehr herzlich bedanken.

#### Mein besonderer Dank gilt...

...Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff für die intensive Betreuung, die vielen Anregungen und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeiten beigetragen haben. Danke für die gute Zusammenarbeit und die vielen Möglichkeiten, die Du mir während meiner Promotion in Deiner Arbeitsgruppe eröffnet hast.

...PD Dr. Silke Kuphal für die Einarbeitung in die Labortätigkeit, die zeitintensiven Diskussionen und die Betreuung meines Projekts. Zudem ein großes Dankeschön für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die vielen hilfreichen Anregungen. Vielen Dank Silke für Deinen Beistand mit Rat und Tat zu jeder Zeit in diesen drei Jahren!

...Prof. Dr. Rainer Deutzmann für die Übernahme der Mentorenschaft und Vertretung meiner Doktorarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III.

...Prof. Dr. Birgit Schittek für die Übernahme der Mentorenschaft im Rahmen des Melanomverbunds und ihre Unterstützung während meiner Dissertation.

...Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie durchführen zu können.

...Susanne Wallner und Rudi Jung für die experimentelle Unterstützung. Vielen Dank Susanne für die wunderbare Zusammenarbeit, die vielen erholsamen Mittagspausen und Deine positive Motivation in all den Jahren.

...der gesamten Arbeitsgruppe Boßerhoff für die gute Zusammenarbeit und die nette Laboratmosphäre.

...meinen ehemaligen Kollegen Matthias Molnar und Susanne Schiffner für die gute Laborstimmung und Zusammenarbeit im Labor 2.

...meinen Eltern Herta und Günther, meinen Schwestern Andrea und Denise, meinem Schwager Franz und meinen Schwiegereltern *in spe* Christa und Sepp, die für mich da sind und mich immer unterstützt haben.

...meinem Freund Christian für seine Geduld, sein Verständnis und die vielen Ablenkungs- und Aufmunterungsversuche in dieser stressigen Zeit.