

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktorin: Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Hatzfeld)

**Expression der Plakophiline in Melanomzellen und
Analyse morphologischer und funktioneller Veränderungen
nach der Überexpression von Plakophilin 2.**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Sebastian Simmermacher
geboren am 04. Februar 1981 in Darmstadt

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Mechthild Hatzfeld,
Prof. Dr. med. Dirk Vordermark
Prof. Dr. med. Jan C. Simon, Leipzig

Eröffnung des Promotionsverfahrens am 29.01.2013

Öffentliche Verteidigung am 04.09.2013

Für
Danaë

Referat

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der Plakophiline 1, 2 und 3, p0071, p120^{ctn} und der klassischen Cadherine in Melanomzellen zu untersuchen. Die quantitative Untersuchung erfolgte mittels Western Blot Analysen. Die intrazelluläre Lokalisation wurde mit der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass Plakophilin 2 in den Melanomzellen MM1 und HT144 de novo exprimiert wurde, die auch die klassischen Cadherine E-, N- und P-Cadherin exprimierten. Plakophilin 3 wurde von sechs der acht untersuchten Melanomzelllinien de novo exprimiert. In den Melanomzellen Bro und MV3, die keines der klassischen Cadherine exprimierten, lokalisierte Plakophilin 3 ausschließlich zytoplasmatisch. Das Expressionsniveau von p0071 korrelierte mit der Expression der Cadherine. Die Melanomzellen MV3 und Bro exprimierten deutlich weniger p0071 als die übrigen Melanomzellen und die Melanozyten.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde Plakophilin 2 mittels der Plasmide EGFP-PKP2-wt oder PKP2-wt-dsRed in den Melanomzellen 1F6 und Mewo transient überexprimiert. Hiernach zeigte sich die Ausbildung des Branching Phänotyps, der durch die Ausbildung zahlreicher, zellulärer Ausziehungen, Lamellipodien und Filopodien charakterisiert ist. Zudem fand sich eine Reorganisation des Aktinnetzwerkes mit einem Verlust der Stressfasern. Abschließend wurde mittels des Invasion Assay (Callbiochem) untersucht, ob die Überexpression von Plakophilin 2 die Invasivität beeinflusst. Im Vergleich zu EGFP bzw. DsRed transfizierten Melanomzellen war die Invasivität der Plakophilin 2 transfizierten Zellen signifikant reduziert.

Simmermacher, Sebastian: Expression der Plakophiline in Melanomzellen und Analyse morphologischer und funktioneller Veränderungen nach der Überexpression von Plakophilin 2.
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das Melanom | 1 |
| 1.1.1 | <i>Inzidenz des malignen Melanoms</i> | <i>1</i> |
| 1.1.2 | <i>Risikofaktoren für die Entstehung des malignen Melanoms</i> | <i>1</i> |
| 1.1.3 | <i>Klassifikation des malignen Melanoms.....</i> | <i>1</i> |
| 1.1.4. | <i>Therapie des malignen Melanoms</i> | <i>3</i> |
| 1.2. | Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung | 4 |
| 1.2.1 | <i>Zell-Zell-Adhäsion</i> | <i>4</i> |
| 1.2.2 | <i>Die Cadherine</i> | <i>4</i> |
| 1.2.3 | <i>Die Familie der Armadillo-repeat Proteine.....</i> | <i>5</i> |
| 1.2.4 | <i>p120^{ctn}</i> | <i>7</i> |
| 1.2.5 | <i>Die Plakophiline 1, 2, 3 und p0071.....</i> | <i>7</i> |
| 1.3 | Zielsetzung der Arbeit | 9 |
| 2. | Material und Methoden..... | 11 |
| 2.1 | Zellbiologisches Arbeiten | 11 |
| 2.1.1 | <i>Zelllinien.....</i> | <i>11</i> |
| 2.1.2 | <i>Zellkultur</i> | <i>11</i> |
| 2.1.3 | <i>Zellauszählung.....</i> | <i>12</i> |
| 2.1.4 | <i>Transfektion</i> | <i>13</i> |
| 2.1.5 | <i>Cell Invasion Assay.....</i> | <i>14</i> |
| 2.1.6 | <i>Ermittlung der Überlebensraten nach Transfektion.....</i> | <i>15</i> |
| 2.2 | Proteinbiologisches Arbeiten | 16 |
| 2.2.1 | <i>Proteinextraktion</i> | <i>16</i> |
| 2.2.2 | <i>Proteinbestimmung</i> | <i>16</i> |
| 2.2.3 | <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> | <i>17</i> |
| 2.2.4 | <i>Western-Blot</i> | <i>18</i> |
| 2.2.5 | <i>Ponceau S-Färbung.....</i> | <i>18</i> |
| 2.2.6 | <i>Immundetektion</i> | <i>19</i> |
| 2.2.7 | <i>Dokumentation der Immundetektion mittels Chemilumineszens.....</i> | <i>19</i> |
| 2.3 | Molekularbiologisches Arbeiten..... | 20 |
| 2.3.1 | <i>Plasmid DNA.....</i> | <i>20</i> |
| 2.3.2 | <i>Transformation von E. coli mit der Plasmid DNA.....</i> | <i>20</i> |
| 2.4 | Immunfluoreszenz..... | 21 |
| 2.5 | Materialien | 22 |
| 2.5.1 | <i>Antikörper.....</i> | <i>22</i> |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.5.2 | <i>Puffer und Lösungen</i> | 23 |
| 2.5.3 | <i>Geräte</i> | 24 |
| 2.5.4 | <i>Verbrauchsmaterialien</i> | 24 |
| 2.5.5 | <i>Kits</i> | 25 |
| 2.5.6 | <i>Software</i> | 25 |
| 3. | Ergebnisse | 26 |
| 3.1 | Expression der klassischen Cadherine in Melanomzellen und Melanozyten..... | 26 |
| 3.1.1 | <i>Epitheliales Cadherin (E-Cadherin)</i> | 26 |
| 3.1.2 | <i>Plazentäres Cadherin (P-Cadherin)</i> | 28 |
| 3.1.3 | <i>Neuronales Cadherin (N-Cadherin)</i> | 29 |
| 3.2 | Expression der Armadillo-repeat Proteine in Melanomzellen und Melanozyten..... | 30 |
| 3.2.1 | <i>p120^{ctn}</i> | 30 |
| 3.2.2 | <i>p0071</i> | 32 |
| 3.2.3 | <i>Plakophilin 1</i> | 33 |
| 3.2.4 | <i>Plakophilin 2</i> | 34 |
| 3.2.5 | <i>Plakophilin 3</i> | 36 |
| 3.3 | Einfluss von Plakophilin 2 auf die Zellmorphologie und das Invasionsverhalten..... | 39 |
| 3.3.1 | <i>Morphologie der Melanomzellen 1F6 und Mewo</i> | 39 |
| 3.3.2 | <i>Einfluss von exogenem Plakophilin 2 auf die Zellmorphologie</i> | 40 |
| 3.3.3 | <i>Einfluss von exogenem Plakophilin 2 auf das Aktinnetzwerk</i> | 42 |
| 3.3.4 | <i>Stabilität der phänotypischen Veränderungen nach Expression von exogenem Plakophilin 2</i> | 43 |
| 3.3.5 | <i>Posttransfektionelle Überlebensraten nach Expression von exogenem Plakophilin 2</i> | 44 |
| 3.3.6 | <i>Vergleich des invasiven Wachstums der Melanomzellen 1F6 und Mewo nach Überexpression von Plakophilin 2 und dem entsprechenden Leervektor</i> | 45 |
| 4. | Diskussion | 49 |
| 4.1 | Expression der Cadherine in Melanomzellen | 49 |
| 4.2 | Expression der Armadillo-repeat Proteine in Melanomzellen..... | 52 |
| 4.2.1 | <i>p120^{ctn} Expression in Melanomzellen</i> | 52 |
| 4.2.2 | <i>Plakophilin 1</i> | 54 |
| 4.2.3 | <i>Plakophilin 2</i> | 55 |
| 4.2.4 | <i>Plakophilin 3</i> | 57 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.2.5 | <i>p0071</i> | 58 |
| 4.3 | Zellmorphologische Veränderungen nach Expression von exogenem Plakophilin 2..... | 59 |
| 4.4 | Veränderungen des Aktinnetzwerks nach Expression von exogenem Plakophilin 2..... | 61 |
| 4.5 | Einfluss von exogenem Plakophilin 2 auf die Migration | 62 |
| 4.6 | Klinische Bedeutung der Expression der Plakophiline in Melanomzellen | 63 |
| 5. | Literatur | 65 |
| 6. | Thesen | 80 |

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

| | |
|-----------------|--|
| % | Prozent |
| ~ | ungefähr |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| cm ² | Quadratcentimeter |
| Cu | Kupfer |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| g | Erdbeschleunigung |
| h | Stunde |
| mA | Milliamper |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol |
| NHEM | normale humane epitheliale Melanozyten |
| nm | Nanometer |
| RT | Raumtemperatur |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| bzw | beziehungsweise |

1. Einleitung

1.1 *Das Melanom*

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der von melanozytären Zellen ausgeht und sich hauptsächlich an der Haut manifestiert. Andere Manifestationsorte können das Auge, die Schleimhäute oder die Hirnhäute sein. In der Regel weist das Melanom eine starke, unregelmäßige Pigmentierung auf. Es sind jedoch auch nicht pigmentierte, sogenannte amelanotische Formen beschrieben (Übersicht bei (Barnhill und Gupta, 2009). Die Prognose des malignen Melanoms ist insgesamt ungünstig, da es zu einer frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung tendiert. Das maligne Melanom ist daher für etwa 90% der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich.

1.1.1 *Inzidenz des malignen Melanoms*

Die Inzidenz des malignen Melanoms steigt weltweit, insbesondere unter der hellhäutigen Bevölkerung (Garbe *et al.*, 2007; Jemal *et al.*, 2009; Marcos-Gragera *et al.*, 2010). In Mitteleuropa beträgt die Inzidenz 10-12 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr, in den USA 10-25 Fälle. Die höchste Inzidenz mit 50-60 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr wurde in Australien ermittelt (Garbe *et al.*, 2007).

1.1.2 *Risikofaktoren für die Entstehung des malignen Melanoms*

Ein Risikofaktor zur Entwicklung eines malignen Melanoms ist die intermittierende, starke Exposition gegenüber natürlicher oder künstlicher UV-Strahlung. Generell sind hellhäutige Menschen häufiger betroffen (Whiteman, 1995; Veierod *et al.*, 2003; 2007). Ein gesteigertes Risiko ein malignes Melanom zu entwickeln haben Menschen mit einer hohen Zahl an Naevi und Träger sogenannter dysplastischer oder kongenitaler Naevi, die Melanomvorläufer darstellen. Auch eine familiäre, also erbliche Belastung ist bekannt (Greene *et al.*, 1985).

1.1.3 *Klassifikation des malignen Melanoms*

Klinisch und histologisch lassen sich verschiedene Typen des malignen Melanoms unterscheiden, wobei Sonderformen wie das amelanozytäre Melanom in der Gruppe der nicht klassifizierten Melanome zusammengefasst werden (Tab. 1.1).

Tab. 1: **Klinisch-histologische Subtypen des kutanen malignen Melanoms. Ergebnisse des Zentralregisters Malignes Melanom 1983 - 1995 (n = 30.015) (Garbe et al., 2005).**

| Typ | Prozentualer Anteil |
|----------------------------------|----------------------------|
| Superfiziell spreitendes Melanom | 57,4 % |
| Noduläres Melanom | 21,4 % |
| Lentigo-maligna-Melanom | 8,8 % |
| Akral-lentiginöses-Melanom | 4,0 % |
| Nicht klassifizierbare Melanome | 3,5 % |
| Sonstige Melanome | 4,9 % |

Der häufigste Melanomtyp, das superfiziell spreitende Melanom zeigt einen zunächst rein oberflächlichen (radialen) Tumorprogress, bevor nach wenigen Jahren der Übergang zum vertikal-invasiven Wachstum vollzogen wird. Hauptsächlich lokalisiert das superfiziell spreitende Melanom am Rücken und an den Beinen. Auch die Lentigo-maligna zeigt zunächst für Jahre ein ausschließlich radiales Wachstum. Der Übergang zum Lentigo-maligna-Melanom erfolgt nach bis zu 15 Jahren und ist ebenfalls durch die Entwicklung eines vertikal-invasiven Wachstums gekennzeichnet. Das Lentigo-maligna-Melanom lokalisiert hauptsächlich im Gesicht. Anders verhält es sich beim nodulären Melanom, das meist schon initial ein vertikal-invasives Wachstum zeigt und frühzeitig lymphogen und hämatogen metastasiert. Das akral-lentiginöse Melanom lokalisiert, wie der Name schon sagt, vorwiegend an den Akren. Sein Wachstum ist gezeichnet von einer langen radialen Wachstumsphase, die insgesamt jedoch schneller verläuft als die des Lentigo-maligna-Melanoms. Unter den sonstigen Melanomen sind solche der Schleimhäute, der Aderhaut und der Meningen subsumiert.

Die Metastasierung des malignen Melanoms erfolgt lymphogen und hämatogen. Auf dem Weg der lymphogenen Metastasierung kommt es häufig zu sogenannten Satellitenmetastasen um den Primärtumor herum und im weiteren Verlauf werden dann die regionären Lymphknoten erreicht. Die Fernmetastasierung erfolgt zumeist in die Haut, die Lunge, die Leber, das Gehirn und die Knochen.

Zur diagnostischen Abgrenzung des malignen Melanoms wird die sogenannte A-B-C-D Regel herangezogen. Hierbei sind charakteristisch für ein malignes Melanom: Die **A**symmetrie, eine unregelmäßige **B**egrenzung, ein inhomogenes „Haut-**C**olorit“ und ein **D**urchmesser von mehr als 5 mm.

1. Einleitung

Die klinische Stadieneinteilung des malignen Melanoms erfolgt über die Bestimmung der Tumordicke nach Breslow und dem Grad der Metastasierung, anhand derer auch eine Prognoseabschätzung erfolgt (Tab. 1.2). Eine weitere Einteilung, die sich ebenfalls am Ausmaß der dermalen Infiltration des Melanoms orientiert, ist die Einteilung nach Clark, die sich an der anatomischen Schichtung der Haut orientiert.

Tab. 2: Klinische Stadieneinteilung des malignen Melanoms und Prognosekorrelation (Garbe *et al.*, 2007).

| Stadium | Tumordicke (nach Breslow) | Metastasen | 5-Jahres-Überlebensrate |
|---------|---------------------------|--|-------------------------|
| I a | ≤ 0,75 mm | | > 95 % |
| I b | 0,76 – 1,5 mm | | ~ 90 % |
| II a | 1,51 – 4,0 mm | | ~ 70 % |
| II b | > 4,0 mm | | < 50 % |
| III a | | Satelliten- Metastase | |
| III b | | Lymphknoten- Metastasen (N1 oder N2) | |
| IV | | Organmetastasen | |

1.1.4. Therapie des malignen Melanoms

Etwa 90% aller Melanome werden als Primärtumor ohne Metastasen diagnostiziert. Die Therapie des malignen Melanoms im Stadium I ist primär operativ. Die Wahl des Sicherheitsabstandes (0,5 cm, 1 cm oder 2 cm) ist abhängig von der Tumordicke nach Breslow. Die Radikalität im Rahmen der Entfernung des Primärtumors hat besonders bei dicken Tumoren keinen Einfluss auf das Risiko der Fernmetastasierung. Ein zu kleiner Resektionsabstand scheint jedoch mit einem erhöhten Risiko lokaler Rezidive verbunden zu sein. Ab einer Tumordicke von 1 mm wird eine Wächterlymphknotenbiopsie, im Sinne eines pathologischen Stagings, empfohlen. Ist in den Wächterlymphknoten eine Mikrometastasierung nachgewiesen, erfolgt im Allgemeinen eine radikale Lymphadenektomie der regionären Lymphknotenstationen. Ein prognostischer Überlebensvorteil konnte in prospektiven Studien nicht gezeigt werden und dessen Indikation ist daher kritisch zu hinterfragen (Gebhardt und Näher, 2009). Werden Melanome nicht als Primärtumore diagnostiziert und der Tumor hat bereits metastasiert, so gestaltet sich die Therapie schwierig. Die Radiotherapie und die Chemotherapie verlängern die Überlebenszeit der Patienten, der Therapieansatz ist jedoch meist palliativ.

1.2. Molekulare Grundlagen der Melanomentstehung

In normaler Epidermis lokalisieren Melanozyten in den basalen Schichten, interagieren mit Keratinozyten und stehen mit diesen in einem festen Verhältnis. Ein Melanozyt kann über seine Dendriten mit bis zu 36 Keratinozyten assoziiert sein (Fitzpatrick und Breathnach, 1963; Jimbow *et al.*, 1976). Auch die Proliferation der Melanozyten wird durch die Keratinozyten kontrolliert und reguliert (Donatien *et al.*, 1993; Seiberg *et al.*, 2000). Die Melanomentstehung resultiert aus einer Vielzahl von Änderungen innerhalb zellulären Signalwegen (McGary *et al.*, 2002; Palmieri *et al.*, 2009; Uong und Zon, 2010) .

Einerseits kommt es zu einer Entkopplung der Melanozyten von den sie kontrollierenden Keratinozyten. Andererseits wird die Möglichkeit geschaffen, dass Melanomzellen sowohl mit anderen Zellen als auch anderen Melanomzellen interagieren können. Des Weiteren erlangen Melanomzellen die Fähigkeit sich von der Basalmembran zu lösen bzw. diese zu durchwandern (Haass *et al.*, 2005). Die hämatogene Metastasierung wird letztlich erreicht, wenn die Möglichkeit zur epithelialen-mesenchymalen Transition geschaffen ist (Qi *et al.*, 2005).

1.2.1 Zell-Zell-Adhäsion

Eine grundlegende Struktur in Geweben ist die Zell-Zell-Adhäsion. Einerseits wird so das Anheften der Zellen aneinander gewährleistet. Zum Anderen wird über die intrazellulären Verbindungen zum Zytoskelett die Stabilität der einzelnen Zelle im Zellverband bzw. Gewebe kontrolliert und koordiniert. Im Rahmen der Tumorentstehung im Allgemeinen und im Fall des Melanoms kommt der Loslösung einer Zelle aus einem Zellverband eine wesentliche Rolle zu.

Adhäsionsmoleküle werden in vier Proteinfamilien unterteilt: 1. die Immunglobuline, 2. die Integrine, 3. die Cadherine und 4. die Selektine. Die Familie der Cadherine selbst ist eine stetig wachsende Proteinfamilie (Nollet *et al.*, 2000), die in Vertebraten am Aufbau zweier verwandter klassischer Zell-Zell-Verbindungen beteiligt sind, den Adhärenzkontakten und den Desmosomen. Im Rahmen dieser Arbeit werden vor allem die klassischen Cadherine und deren Interaktionspartner untersucht werden, weshalb im Weiteren auf diese näher eingegangen wird.

1.2.2 Die Cadherine

Cadherine sind transmembranäre Proteine, die mittels der aminoterminalen extrazellulären Domäne calciumabhängig Zell-Zell-Verbindungen ausbilden (Blaschuk

et al., 1990; Takeichi, 1991; Pertz *et al.*, 1999). Die extrazellulären Domänen der klassischen Cadherine interagieren homophil und die intrazellulären Domänen sind am Aufbau des intrazellulären Plaques der Adhärenzkontakte beteiligt. Desmosomale Cadherine interagieren heterophil und sind ebenfalls am Aufbau des intrazellulären Plaque beteiligt. Die intrazellulären Domänen variieren zwischen den verschiedenen Cadherinen und fungieren als Adapter zum Zytoskelett.

Als klassische Cadherine werden E- (epitheliales) Cadherin, N- (neuronales) Cadherin und P- (plazentales) Cadherin bezeichnet (Gallin *et al.*, 1983; Nose und Takeichi, 1986; Schuh *et al.*, 1986; Miyatani *et al.*, 1989; Koch *et al.*, 1991). Zu den desmosomalen Cadherinen gehören die Desmocolline und die Desmogleine, die in den zelltyp- und differenzierungsspezifischen Isoformen, Desmocollin 1-3 und Desmoglein 1-4, exprimiert werden (Koch *et al.*, 1991; Mechanic *et al.*, 1991; Schafer *et al.*, 1994; Whittock und Bower, 2003). Intrazellulär interagieren die Cadherine nicht direkt mit dem Zytoskelett. Die Interaktion zum Zytoskelett und die Regulation der Cadherine werden durch die Catenine vermittelt. Die Catenine der Armadillo-Protein-Familie bilden hierbei die größte Gruppe. Sie verbinden die klassischen Cadherine mit dem Aktinzytoskelett und die desmosomalen Cadherine mit den Intermediärfilamenten. Im Folgenden wird hierauf noch detailliert eingegangen. In normaler Epidermis ist E-Cadherin das hauptsächlich exprimierte klassische Cadherin. Es ermöglicht die Interaktion zwischen den Keratinozyten (Carter *et al.*, 1990a; Carter *et al.*, 1990b; Symington *et al.*, 1993) und die Interaktion zwischen Keratinozyten und Melanozyten, wobei die Keratinozyten das Zellwachstum und die Ausbildung der melanozytären Dendriten kontrollieren (Tang *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 2000b). P-Cadherin wird nur in den basalen Schichten der Epidermis exprimiert (Hirai *et al.*, 1989; Shimoyama *et al.*, 1989). N-Cadherin wird in normaler Epidermis nicht exprimiert, seine Expression wird bei der Epithelial-mesenchymalen-Transition induziert. Die Menge der Adhärenzkontakte nimmt vom *Stratum basale* zum *Stratum corneum* hin ab. Bei den Desmosomen verhält es sich umgekehrt. Sie sind im *Stratum corneum* häufig und im *Stratum basale* dagegen nicht anzutreffen.

1.2.3 Die Familie der Armadillo-repeat Proteine

Die familiäre Charakteristik der *Armadillo-repeat* Proteine ist eine zentrale Domäne, die sich aus einer repetitiven Sequenz aus ~42 Aminosäuren, dem *Armadillo*-Motiv, zusammensetzt. Ursprünglich wurde das *Armadillo*-Motiv im *Drosophila melanogaster* Segmentpolaritätsgen *Armadillo* identifiziert (Wieschaus und Riggelman, 1987; Hirai *et al.*, 1989; Riggelman *et al.*, 1989). Anhand der Sequenzhomologien, der Anzahl und

1. Einleitung

der Organisation der *Armadillo*-Motive und anhand der subzellulären Lokalisation können die *Armadillo-repeat* Proteine in verschiedene Unterguppen gegliedert werden (Abb. 1.1 (Hatzfeld, 2005)).

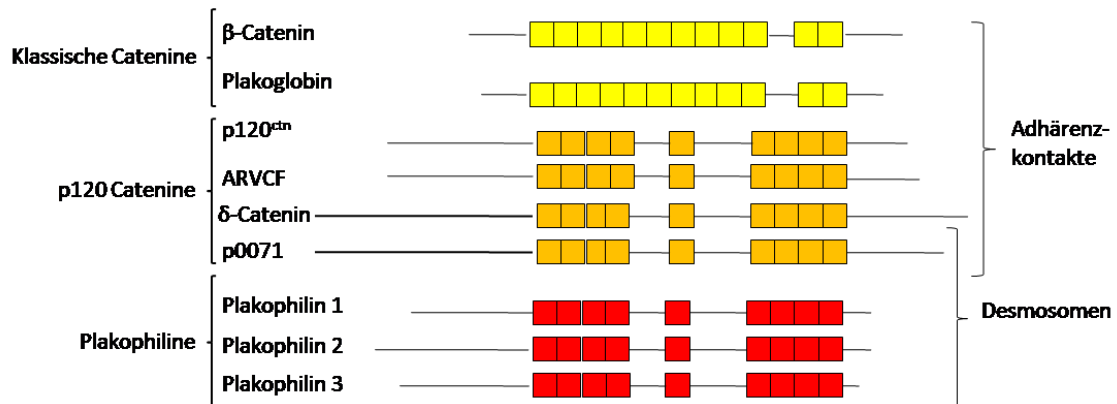


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Familie der *Armadillo-repeat* Proteine (nach Hatzfeld, 2005)

Die drei Unterguppen der *Armadillo-repeat* Proteinfamilie werden durch ihre unterschiedliche Anzahl und Organisation der *Armadillo*-Motive charakterisiert. Die Familie der klassischen Catenine (β -Catenin und Plakoglobin) und die Familie der p120^{ctn}-verwandten Proteine (p120^{ctn}, δ -Catenin, ARVCF und p0071) interagieren mit den klassischen Cadherinen in Adhärenzkontakten. p0071 interagiert mit klassischen und desmosomalen Cadherinen (Hatzfeld *et al.*, 2003). Die Plakophiline 1, 2 und 3 interagieren mit desmosomalen Cadherinen (Hatzfeld *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Bonne *et al.*, 2003).

Die klassischen Catenine β -Catenin und Plakoglobin (Synonym: γ -Catenin) sind durch 12 zentrale *Armadillo*-Motive charakterisiert. Die p120 Catenine (^{ctn})-verwandten Proteine sind charakterisiert durch 9 zentrale *Armadillo*-Motive und einen flexiblen Bereich zwischen dem fünften und sechsten *Armadillo*-Motiv. Dieser Sequenzbereich ist innerhalb der p120^{ctn} verwandten Proteine hoch konserviert (Choi und Weis, 2005). Die Untergruppe der p120^{ctn} verwandten Proteine wird weiter unterteilt in zwei Subfamilien. Die p120^{ctn} Subfamilie umfasst p120^{ctn} (Reynolds *et al.*, 1989a; Hatzfeld, 1999) und die Proteine ARVCF (*armadillo repeat gene deleted in velo cardio facial syndrom* (Sirotkin *et al.*, 1997)), NPRAP/ δ -catenin/Neurojungin (*neural plakophilin related Armadillo protein* (Paffenholz und Franke, 1997; Zhou *et al.*, 1997) und p0071 (Hatzfeld und Nachtsheim, 1996).

Die Plakophiline 1-3 bilden die zweite Subfamilie der p120^{ctn}-verwandten Proteine, sie interagieren über die N-terminale *Kopf* Domäne mit desmosomalen Cadherinen und

vermitteln gemeinsam mit Desmoplakin und Plakoglobin die Assoziation der desmosomalen Cadherine an die Intermediärfilamente (Bonne *et al.*, 1999; Kowalczyk *et al.*, 1999; Hatzfeld *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2000).

1.2.4 **p120^{ctn}**

p120^{ctn}, der Namensgeber der Proteinfamilie wurde erstmals 1989 als Substrat der Src-Kinase beschrieben (Reynolds *et al.*, 1989b; Reynolds *et al.*, 1992). Neben der regulatorischen und stabilisierenden Funktion auf die Cadherine (Ireton *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2003) hat p120^{ctn} einen modulatorischen Einfluss auf die Aktivität der Rho GTPasen (Anastasiadis *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001) und interagiert mit dem Transkriptionsfaktor *Kaiso* (Prokhortchouk *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005; Spring *et al.*, 2005). Eine Übersicht über intrazelluläre Assoziationen und Funktionen geben die Arbeiten von Anastasiadis, Hatzfeld und Reynolds (Anastasiadis und Reynolds, 2000; Hatzfeld, 2005; Reynolds, 2007). Die Modulation der Aktivität der Rho GTPasen wurde auch für andere Mitglieder der Familie der *Armadillo-repeat* Proteine beschrieben (Anastasiadis *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001).

1.2.5 **Die Plakophiline 1, 2, 3 und p0071**

Die in der Untergruppe der Plakophiline zusammengefassten Plakophiline 1, 2 und 3 finden sich vorwiegend in desmosomalen Zell-Zell-Verbindungen und interagieren hier direkt mit den desmosomalen Cadherinen (Hatzfeld und Burba, 1994; Heid *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 1996; Bonne *et al.*, 1999; Kowalczyk *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Bonne *et al.*, 2003). Neben der desmosomalen Lokalisation wurden für alle Plakophiline eine zytoplasmatische Lokalisation (Hofmann *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2010 a) und für die Plakophiline 1 und 2 eine Kernlokalisierung (Hatzfeld *et al.*, 2000) beschrieben.

In Keratinozyten stimuliert Plakophilin 1 die Rekrutierung desmosomaler Proteine an die Zellmembran und stabilisiert diese an der Zellmembran (Hatzfeld *et al.*, 2000; Bornslaeger *et al.*, 2001; South *et al.*, 2003). Physiologisch spiegelt sich dies in der Epidermis wieder, wo in den mechanisch am stärksten belasteten, suprabasalen Schichten deutlich mehr Plakophilin 1 exprimiert wird als in den basalen Schichten (Moll *et al.*, 1997). Die Lokalisation von Plakophilin 1 an Desmosomen wird durch die N-terminale Kopf Domäne vermittelt, die auch für die Kernlokalisierung verantwortlich ist (Hatzfeld *et al.*, 2000). Plakophilin 1 kommt in zwei verschiedenen Splicevarianten vor,

1. Einleitung

die sich strukturell durch ein 21 Aminosäuren großes Insert im vierten *Armadillo*-Motiv unterscheiden. Beide Plakophilin 1 Splicevarianten sind auch hinsichtlich ihrer intrazellulären Lokalisation unterschiedlich. Lokalisiert die kürzere Variante (Plakophilin 1a) vorwiegend an Desmosomen, jedoch auch zytoplasmatisch und nukleär, zeigt die längere Plakophilin 1b Variante eine ausschließlich nukleäre Lokalisation (Schmidt *et al.*, 1997). Die wichtige Funktion von Plakophilin 1 in der Zell-Adhäsion zeigt sich anhand einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung der Haut, dem *skin fragility ectodermal dysplasia syndrom*, bei dem der Verlust von Plakophilin 1 zu einer Blasenbildung und Verkrustung der Epidermis führt. Zusätzlich kommt es zu einem Verlust der Haare und einer Reduktion der Schweißdrüsen (McGrath *et al.*, 1997; Whittock *et al.*, 2000; Hamada *et al.*, 2002).

Plakophilin 2 ist das am weitesten verbreitete Plakophilin und kommt ebenfalls in zwei Splicevarianten vor, Plakophilin 2a und 2b. Beide unterscheiden sich nicht hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation und der zellspezifischen Verteilung. Gemeinsam ist beiden Splicevarianten eine duale Lokalisation, in Desmosomen und im Zellkern. Der Unterschied zwischen beiden Splicevarianten ist ein 44 Aminosäuren großes Insert im dritten *Armadillo*-Motiv (Mertens *et al.*, 1996). Plakophilin 2 wird in Geweben mit hoher mechanischer Belastung und in proliferativen Geweben exprimiert (Mertens *et al.*, 1999). An Desmosomen interagiert Plakophilin 2 mit Desmoplakin, Desmoglein 1 und Desmocollin 1 a (Chen *et al.*, 2002) und im Zellkern mit der größten Untereinheit der RNA-Polymerase III (Mertens *et al.*, 2001). Aus einer schwächeren Interaktion von Plakophilin 2 mit Desmoplakin kann gefolgert werden, dass sich die desmosomalen Funktionen der Plakophiline 1 und 2 unterscheiden. Chen und Kollegen beschrieben auch eine mögliche regulatorische Funktion von Plakophilin 2 im β -Catenin/TCF Signalweg (Chen *et al.*, 2002). Die Regulation von β -Catenin obliegt dem Wnt-Signalweg, dem eine besondere Funktion während der embryonalen Entwicklung und bei der Tumorprogression zukommt. Bindet ein Wnt-Ligand an den frizzled-Rezeptor, wird zytoplasmatisches β -Catenin stabilisiert und kann in den Zellkern translozieren. Im Zellkern interagiert β -Catenin mit den Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie und beeinflusst so die Genexpression von Zielgenen, die an der Kontrolle der Zellproliferation, -motilität und Apoptose beteiligt sind (Behrens *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1996; Molenaar *et al.*, 1996). Chen und Kollegen zeigten, dass Plakophilin 2 mit nicht E-Cadherin gebundenem β -Catenin interagiert. Im Luciferase-Assay zeigten sie, dass eine Überexpression von Plakophilin 2 zu einer Steigerung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie führt (Chen *et al.*, 2002). Die klinische Bedeutung von Plakophilin 2 zeigt sich in der arrhythmogenen rechtsventrikulären

Kardiomyopathie (ARVC), die durch Mutationen in Plakophilin 2 entsteht (Gerull et al., 2004). Studien zur Herzentwicklung am Mausmodell zeigten, dass die Unterdrückung der Expression von Plakophilin 2 wegen einer insuffizienten Entwicklung und einer reduzierten Stabilität des Herzens zu embryonaler Lethalität am 10,5. Tag führt (Grossmann et al., 2004).

Plakophilin 3 wird nicht wie die Plakophiline 1 und 2 in zwei Spleißvarianten exprimiert. Auch Plakophilin 3 lokalisiert an den Desmosomen, führt aber ähnlich wie Plakophilin 2 nach Überexpression nicht zu einer Steigerung der Größe der Desmosomen oder deren Anzahl. Mit der Ausnahme von Hepatozyten wird Plakophilin 3 in allen Epithelien exprimiert (Bonne et al., 1999; Schmidt et al., 1999; Bonne et al., 2003). Verglichen mit den Plakophilinen 1 und 2 wurde für Plakophilin 3 das größte Repertoire an desmosomalen Interaktionspartnern gezeigt (Bonne et al., 2003).

p0071 (Synonym Plakophilin 4) gehört zur p120^{ctn} Subfamilie und lokalisiert ebenfalls an Zell-Zell-Kontakten. Hier interagiert p0071 sowohl mit klassischen Cadherinen als auch mit desmosomalen Cadherinen (Hatzfeld und Nachtsheim, 1996; Calkins et al., 2003; Hatzfeld et al., 2003). *In vivo* führt die Überexpression von p0071 zur Stabilisierung der klassischen Cadherinen an der Membran und zu einer Reduktion der Desmosomen. p0071 kommt somit eine Funktion im *crosstalk* zwischen Adhärenzkontakten und Desmosomen zu (Hatzfeld et al., 2003). Neben der demonstrierten regulatorischen Funktion in der Zelladhäsion konnte gezeigt werden, dass p0071 den Rho-Signalweg während der Zytokinese reguliert (Wolf et al., 2006; Keil et al., 2009).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Allgemein bei der Tumorentstehung und im Speziellen bei der Melanomentstehung spielt der Verlust der E-Cadherin Expression eine zentrale Rolle (Sanders et al., 1999). Anstelle des E-Cadherins kommt es zu einer gesteigerten Expression von N-Cadherin, was eine Vielzahl neuer Interaktionsmöglichkeiten und die epitheliale-mesenchymale Transition ermöglicht (Li et al., 2001; Qi et al., 2005). Anastasiadis und Kollegen schlussfolgerten, dass p120^{ctn} durch seine Fähigkeit epitheliales und mesenchymales Cadherin zu binden die Motilität beeinflusst (Anastasiadis, 2007). Auch für die anderen Mitglieder der Familie der Armadillo-repeat Proteine werden, neben der Funktion im intrazellulären Plaue, zunehmend Funktionen innerhalb der Signaltransduktion beschrieben (siehe 1.2.3). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem ersten Schritt zu untersuchen, ob die Plakophiline und p0071 in Melanomzellen exprimiert werden

1. Einleitung

und ob sich diese Expression von der in Melanozyten unterscheidet. Wegen der in zwei Melanomzelllinien detektierten Expression von Plakophilin 2, das in den Melanozyten nicht nachzuweisen war, wurde weiter untersucht, welchen Einfluss Plakophilin 2 auf die Morphologie und die Invasivität von Melanomzellen hat.

2. Material und Methoden

2.1 Zellbiologisches Arbeiten

2.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 2.1 aufgelisteten humanen Melanomzelllinien untersucht. Alle Melanomzelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med J. C. Simon, Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Leipzig, zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle wurden normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) der Firma Promocell (Katalognummer: C-10451) und die Zelllinie HaCat (Boukamp *et al.*, 1988) genutzt.

2.1.2 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einem konstanten CO₂ Gehalt von 5 % kultiviert.

Als Kulturmedium für die Melanomzelllinien diente RPMI 1640 (PAA), das mit 10% FCS (PAA), 1% Natrium Pyruvat (1 mM) (PAA) und 1% Penicillin/Streptomycin (100mg/ml) (PAA) versetzt wurde. Die humanen Melanozyten (NHEM) wurden in speziellem Melanozytenwachstumsmedium der Firma Promocell kultiviert.

Die Zelllinie HaCat wurde in DMEM Kulturmedium (PAA), versetzt mit 10% FCS, 1% Natrium Pyruvat und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Tab. 3: Zelllinien

| Zelllinie | Zelltyp | Literatur |
|-----------|---|--|
| MV3 | malignes Melanom (Metastase) | (van Muijen <i>et al.</i> , 1991b) |
| MM1 | malignes Melanom (primär Tumor) | (Hassane M. Zarour <i>et al.</i> , 1999) |
| SB3 | malignes Melanom (primär Tumor) | (Verschraegen <i>et al.</i> , 1991) |
| HT144 | malignes Melanom (subkutane Metastase) | (Fogh <i>et al.</i> , 1977) |
| SB1 | malignes Melanom (primär Tumor) | (Verschraegen <i>et al.</i> , 1991) |
| 1F6 | malignes Melanom (Metastase) | (Van Muijen <i>et al.</i> , 1991a) |
| Mewo | malignes Melanom (Lymphknotenmetastase) | (Fogh <i>et al.</i> , 1977) |
| Bro | malignes Melanom (primär Tumor) | (Lockshin <i>et al.</i> , 1985) |

| Zelllinie | Zelltyp | Literatur/ Firma |
|-----------|-------------|-------------------------------------|
| NHEM | Melanozyt | Promocell Katalognummer: C-10451 |
| HaCat | Keratinozyt | (Boukamp <i>et al.</i> , 1988) |

Die dauerhafte Lagerung aller Zellen erfolgte in FCS (PAA) versetzt mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff. Die Zugabe von DMSO (Sigma) verhinderte die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens. Zur Kultivierung wurde das gefrorene Zellpellet im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in auf 37°C vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen. Die erhaltene Suspension wurde anschließend für drei Minuten bei 370 g zentrifugiert. Das nach Abnehmen des Überstands verbliebene Zellpellet wurde in einem definierten Volumen des jeweiligen Kulturmediums resuspendiert und anschließend auf Kulturschalen ausplattiert. Der beschriebene Ablauf diente dem Auswaschen des DMSO. Erreichte die Zelldichte einer Kulturschale das Stadium der Subkonfluenz, wurden die Zellen passagiert. Zum Ablösen der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBSE gewaschen. Letztlich wurden die Zellen mit Trypsin (PAA) von der Kulturschale gelöst, wobei die Protease Trypsin regioselektiv Peptidbindungen spaltet. Bei einer kurzen Kontaktzeit mit den Zellen werden ausschließlich extrazelluläre Proteine gespalten und die Zellen werden nicht geschädigt. Nach dem Ablösen wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen, und für drei Minuten bei 1500 Upm (370 g) abzentrifugiert. Der Überstand aus Kulturmedium und Trypsin wurde verworfen, und das Zellpellet wurde im Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf zwei oder mehr Kulturschalen aufgeteilt und weiter kultiviert.

2.1.3 Zellauszählung

Zur Auszählung wurden die Zellen in 10 cm Schalen kultiviert, bis ein zu 60–80% dichter Zelllayer gewachsen war. Die Zellen wurden mit PBSE gewaschen und anschließend mit Trypsin von der Kulturschale gelöst. Die Zell-Trypsin-Suspension wurde in einem 1 ml Kulturmedium aufgenommen.

10 µl der Suspension wurden blasenfrei in eine Neubauer Zählkammer überführt. Ein Eckquadrat der Zählkammer und das ihm gegenüberliegende Eckquadrat wurden ausgezählt und der Mittelwert wurde berechnet. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter errechnete sich nach der folgenden Formel:

$$n \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = y \text{ } 10^4/\text{ml}$$

n = Anzahl der ausgezählten Zellen

y = Anzahl der Zellen /ml

2.1.4 Transfektion

Die Melanomzellen 1F6 wurden nach dem jetPEI™ Protokoll (biomol) transfiziert und die Melanomzellen Mewo nach dem Lipofectamine™ 2000 Protokoll (Invitrogen).

jetPEI™ ist ein synthetisches Polyethylenimin, das positiv geladene und mit DNA beladene Partikel bildet. Durch die positive Ladung besitzen die Partikel die Fähigkeit mit den anionischen Proteoglykanen der Zellmembran zu interagieren und so per Endozytose in die Zelle aufgenommen zu werden. Intraendosomal puffert jetPEI™ den endosomalen pH-Wert und bewahrt so die DNA vor der Degradierung. Zudem führt der stetige Protonen-Einstrom zu einer osmotischen Anschwellung und schließlich zur Ruptur des Endosoms, was eine Freisetzung der DNA ins Zytoplasma zur Folge hat (Boussif *et al.*, 1995). Die Transfektionseffizienz wird vom Verhältnis der Stickstoffreste im jetPEI™ zu den Phosphatgruppen der DNA beeinflusst (N/P Ratio). Für die Zelllinie 1F6 wurde eine N/P Ratio von 5 genutzt. 24 Stunden vor der Transfektion wurden $0,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in 500µl antibiotikafreiem RPMI 1640 Kulturmedium in 24 Well Platten ausplattiert und kultiviert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt. 1µg DNA und 2µl jetPEI™ wurden jeweils in 50µl steriler 150mM NaCl Lösung verdünnt, vorsichtig gevortext und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde die jetPEI™ Verdünnung zu der DNA Verdünnung gegeben, vorsichtig gevortext und kurz abzentrifugiert. Das Transfektionsreagenz wurde dann für 30 min bei RT inkubiert. 100µl der Transfektionslösung wurden tropfenweise zum Kulturmedium gegeben und mit diesem vermischt. 24 Stunden nach DNA-Zugabe wurde das Kulturmedium gewechselt. Die Auswertung erfolgte frühestens 24 Stunden nach Beginn der Transfektion.

Lipofectamin besteht aus dem polykationischen Lipid DOPSA und dem Helferlipid DOPE. Die kationischen Lipide bilden künstliche Membranvesikel, Liposomen, die spontan die negativ geladenen Nukleinsäuren binden. Die entstehenden kationischen Komplexe binden an die negativ geladenen Zellmembranen und fusionieren mit ihnen. 24 h vor der Transfektion wurden 1×10^5 Zellen je Well in 500µl antibiotikafreiem Medium in 24 Well Platten ausplattiert. Zur Herstellung des Transfektionsreagenz wurden 0,8µg DNA und 2 µl Lipofectamine™ 2000 jeweils in 50 µl serumfreiem DMEM Medium verdünnt und für 5 min inkubiert. Nach der ersten Inkubation wurden die DNA-Verdünnung und die Lipofectamine™ 2000-Verdünnung vorsichtig gemischt und für weitere 20 min inkubiert. Zu jedem Well wurden 100µl des Transfektionsreagenz gegeben und vorsichtig mit dem Kulturmedium vermischt. 5 h nach der Transfektion

wurde das Medium gewechselt. Die transfizierte Zellen wurden für mindesten 19 h weiter inkubiert, bevor eine Auswertung erfolgte.

2.1.5 Cell Invasion Assay

Das Invasionsverhalten der Melanomzellen wurde mit Hilfe des *Cell Invasion Assay Kits* der Firma Callbiochem getestet. Der Test zeigt, inwieweit Zellen fähig sind die Basalmembran zu durchwandern. Die Invasionskammern, in denen der Test durchgeführt wurde, sind durch eine Polycarbonatmembran an der Unterseite verschlossen. Die Polycarbonatmembran enthält Poren mit einer definierten Größe von 8µm, die von einer Basalmembranmatrix bedeckt wird. Die Basalmembranmatrix bildet eine Barriere für alle Zellen, die nicht die Fähigkeit zur Degradierung von Basalmembranproteinen besitzen. Invasiv wachsende Zellen besitzen die Fähigkeit zur Degradierung extrazellulärer Proteine und können die Basalmembran so passieren. Sie heften sich an der Unterseite der Polycarbonatmembran an. Die invasiv gewachsenen Zellen werden anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und von der Polycarbonatmembran abgelöst. Die Auswertung erfolgt in einem Fluorometer (Thermo Scientific), wobei die fluoreszenzmarkierten Zellen mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt wurden und die Emission bei 520 nm gemessen wurde.

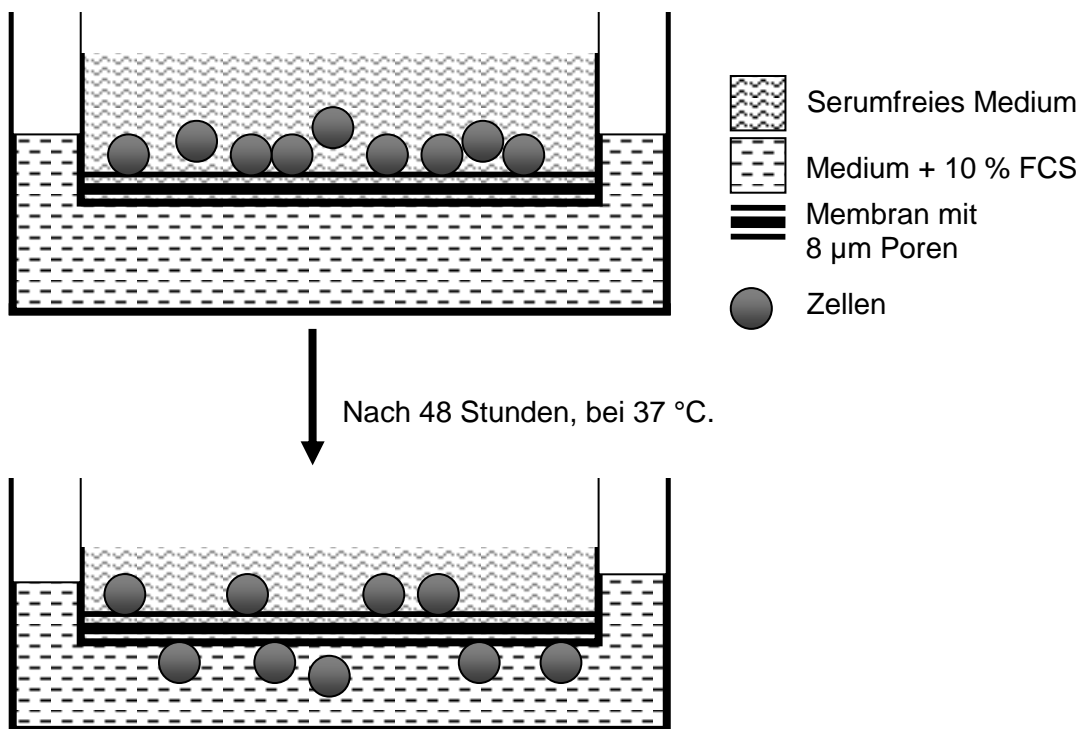


Abb. 2.1: Aufbau des *Cell Invasion Assay*

Die Invasionskammern wurden auf RT aufgewärmt. Anschließend wurde die Basalmembranmatrix mit serumfreiem Kulturmedium bei RT rehydriert. Nach 45 min wurde das serumfreie Kulturmedium abgenommen. $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml wurden in serumfreiem Kulturmedium aufgenommen. Die Wells der 24 Wellplatte wurden mit 500 μ l Kulturmedium, versetzt mit 10% FCS, befüllt und die Invasionskammern wurden eingesetzt. 350 μ l der Zellsuspension in serumfreiem Medium wurden in die Invasionskammer gegeben und für 48h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Detektion der invasiv gewachsenen Zellen wurde nach den Herstellerangaben eine 1:300 Verdünnung der mitgelieferten Calcein-AM Lösung in Zelldetektionspuffer hergestellt. Jedes benötigte Well einer 24 Wellplatte wurde mit 500 μ l der Zelldetektionslösung befüllt. Die Zellinvasionskammern wurden mit einer Pinzette in die Detektionslösung gestellt und die Zellen durch vorsichtiges Aufklopfen von der Polycarbonatmembran gelöst. Die Invasionskammern verblieben in der Detektionslösung und alles wurde für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Invasionskammern entfernt und die Zellen in der Detektionslösung für weitere 30 min inkubiert. 200 μ l der Zellsuspension wurden in 96 Wellplatten (schwarz) überführt und die emittierte Fluoreszenz im Fluorometer gemessen. Anhand einer zuvor erstellten Standardkurve für jede Zelllinie konnten die bei der Messung erhaltenen relativen Fluoreszenzeinheiten einer Zellzahl zugeordnet werden. Hierzu wurde eine definierte Anzahl Zellen in 90 μ l Zelldetektionspuffer aufgenommen, und in die Wells einer 96 Wellplatte (schwarz) gegeben. Zu jedem Well wurden anschließend 10 μ l einer 1:30 Verdünnung Calcein-AM Lösung in Zelldetektionspuffer gegeben. Als Nullwert diente reiner Zelldetektionspuffer versetzt mit 1:30 verdünntem Calcein-AM. Alle Proben und der Nullwert wurden für 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die emittierte Fluoreszenz wurde im Fluorometer bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen.

2.1.6 Ermittlung der Überlebensraten nach Transfektion

Weiter wurde untersucht, inwiefern ein frühzeitiges Absterben der transfizierten Zellen nach der Transfektion die Ergebnisse der Migrationassays beeinflusst. Hierzu wurden 1F6 Zellen mit PKP2wtpEGFP und mit pEGFP transfiziert. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte 1F6 Zellen. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24, 48 und 72 h kultiviert. Das Medium wurde nicht gewechselt. Anschließend wurde ausgezählt, wieviele Zellen nach der jeweiligen Kultivierungsdauer abgestorben waren. Tote Zellen wurden durch Zugabe von Methylblau markiert und anschließend unter dem

Lichtmikroskop ausgezählt. Um die abgestorbenen und noch adhärenen Zellen und die abgestorbenen schon abgelösten Zellen in der Auszählung unterscheiden zu können, wurde das Medium gesondert ausgezählt. Anschließend wurden die adhärenen Zellen mit Trypsin abgelöst und ebenfalls ausgezählt. Im Rahmen der Auswertung wurden die Überlebensraten berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit einer Bonferroni-Korrektur berechnet.

2.2 *Proteinbiologisches Arbeiten*

2.2.1 *Proteinextraktion*

Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Lysepuffer (10mM Tris pH 7,5 +1% SDS) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mechanisch von der Kulturschale gelöst und die erhaltene Suspension wurde homogenisiert. Das Homogenisieren erfolgte mittels zweier Kanülen mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm und 0,4 mm, durch die die Suspension mehrmals gezogen wurde. Das homogenisierte Zelllysate wurde anschließend entweder zur Proteinbestimmung genutzt oder *aliquotiert* und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.2 *Proteinbestimmung*

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem *MicroBC Assay Kit* (Uptima), das nach dem Prinzip der Biuret-Reaktion funktioniert (Kaushal und Barnes, 1986). Nach dem Prinzip des *Micro BC Assay* bilden Proteine, beziehungsweise deren Peptidbindungen Komplexe mit Cu^{2+} und reduzieren Cu^{2+} zu Cu^{+} . *BicConinic acid* (BC) bildet mit Cu^{+} violette Chelatkomplexe. Die Auswertung erfolgte mit einem Spektrophotometer (Biotech), bei 562 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardkurve berechnet, deren Grundlage die Standardverdünnungsreihe (Tab. 2.2) darstellte.

Tab. 4: Pipettierschema der Standardverdünnungsreihe

| Standard | BSA Standard 2 mg/ml | Wasser | Konzentration |
|----------|-------------------------|--------|---------------|
| A | 50 µl | 950 µl | 100 µg/ml |
| B | 500 µl Standard A | 500 µl | 50 µg/ml |
| C | 500 µl Standard B | 500 µl | 25 µg/ml |
| D | 500 µl Standard C | 500 µl | 12,5 µg/ml |

2. Material und Methoden

| | | | |
|---|-------------------|--------|------------|
| E | 500 µl Standard D | 500 µl | 6,25 µg/ml |
|---|-------------------|--------|------------|

Die Proben, die wie unter 2.2.1 angegeben präpariert wurden, sind 1:250 in Wasser verdünnt worden. Die Standards, die Proben und die Referenz (H₂O) wurden im Verhältnis 1:1 mit *BC assay Reagenz* gemischt und anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Standards, Proben und die Referenz auf RT abgekühlt. Die Messung der Absorption der Standards und der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm. Mit *BC-Reagenz* versetztes Wasser diente als Nullwert. Die Absorptionswerte der Standards wurden gegen deren jeweilige Konzentration in einem Graphen aufgetragen und mittels linearer Regression wurde eine Standardkurve berechnet. Anhand der Standardkurve konnten aus den Absorptionswerten der Proben die Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Alle Standards und Proben wurden doppelt angefertigt und die Mittelwerte der gemessenen Absorption zur Bestimmung der Standardkurve wie auch zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen herangezogen.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Elektrophoresegele besteht aus einem Sammelgel und dem Trenngel. Bei der Elektrophorese nach Laemmli (1970) wandern negativ geladene SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode und werden dabei durch die Polyacrylamidmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Verwendet wurden 7,5 %ige Acrylamidgele (Tab. 2.3), um eine optimale Proteinauftrennung im Bereich um 100 kDa zu erreichen. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte anhand des Längenmarkers 6H (Sigma).

Tab. 5: Herstellung der 7,5 %igen Elektrophoresegele

| | Trenngel | Sammelgel |
|------------------|----------|-----------|
| H ₂ O | 14,8 ml | 6,2 ml |
| 30% Acrylamid | 7,5 ml | 1,3 ml |
| Trenngelpuffer | 7,5 ml | ----- |
| Sammelgelpuffer | ----- | 2,5 ml |
| 10% SDS | 300 µl | 100 µl |
| TEMED | 10 µl | 10 µl |
| 10% APS | 200 µl | 200 µl |

2. Material und Methoden

Pro Ladetasche wurden 50 µg Gesamtprotein einer Zelllinie aufgetrennt. Hierzu wurden 50 µg Gesamtprotein mit Probenpuffer versetzt und mit Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 25 µl eingestellt. Die Proteinlösungen wurden anschließend im Heizblock bei 100°C für 5 min denaturiert. Beim Beladen der Gele wurde die erste Kammer mit dem Längenmarker 6H befüllt. Die anderen Kammern wurden mit 25 µl der wie oben angegeben vorbereiteten Proteinlösung beladen. Wenn eine Tasche nicht mit Proteinlösung beladen wurde, so wurde sie mit 10 µl Probenpuffer befüllt, um ein gleichmäßiges Laufen der Proteinbande während der Elektrophorese zu gewährleisten. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst für 40 min bei 10 mA und anschließend für ca. 90 min bei 15 mA je Gel.

2.2.4 Western-Blot

Beim Western-Blot werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulose bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen und macht sie für eine Antikörperdetektion zugänglich (Towbin *et al.*, 1979). Als Blotkammer diente eine Halbtrockenzelle mit zwei Kohle-Elektroden. Abbildung 2.2 zeigt, wie die in den Blot-Puffern 1, 2 und 3 getränkten Watmann Papiere, die Nitrozellulosemembran und das Elektrophoresegel aufgeschichtet wurden. Der Proteintransfer erfolgte bei 1mA / cm² für 1 Stunde. Während des Blotens wurde die Blotkammer gekühlt.

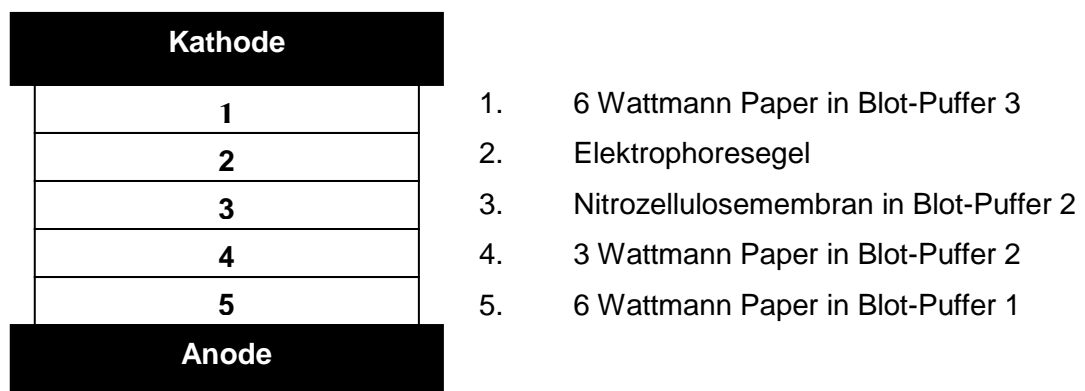


Abb. 2.2: Aufbau des Western-Blot

2.2.5 Ponceau S-Färbung

Die Färbung mit Ponceau S-Lösung (1:10) ermöglicht eine schnelle Kontrolle des Proteintransfers. Sie ist vollständig reversibel und hat keinen Einfluss auf die

Antikörperdetektion. Die Nitrozellulose wurde für eine Minute mit Ponceau S-Lösung (1:10) gefärbt und anschließend mit TBST gewaschen. Das Proteinbandenmuster wurde dokumentiert.

2.2.6 Immundetektion

Abbildung 2.3 zeigt die einzelnen Schritte der Immundetektion. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit 1% BSA/TBST geblockt. Hierzu wurde die Nitrozellulose für wenigstens 30 Min in 1% BSA/TBST bei RT inkubiert. Die zur Immundetektion genutzten primären Antikörper wurden in 1% BSA/TBST verdünnt (Tabelle 2.5). Die zuvor geblottete Nitrozellulosemembran (siehe 2.2.4) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Ungebundener primär Antikörper wurde durch Waschen in TBST entfernt. Anschließend wurde der an Meerrettichperoxidase gekoppelte sekundäre Antikörper (Tabelle 2.6) in 1% BSA/TBST verdünnt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen in TBST entfernt.

2.2.7 Dokumentation der Immundetektion mittels Chemilumineszens

Die spezifische Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) (Amersham Biosciences). Hierbei katalysiert die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase die Oxidation von Luminol. Die hierbei entstehenden Photonen wurden dann auf Chemilumineszenzfilmen detektiert (siehe Abb. 2.3). Die ECL Lösung wurde wie vom Hersteller angegeben gemischt und die Nitrozellulosemembran wurde mit der Lösung überschichtet. Nach einer Minute wurde die ECL Lösung entfernt und die Nitrozellulose wurde zwischen zwei Folien platziert. Sofort im Anschluss wurde ein Chemielumineszenzfilm mit der Nitrozellulosemembran exponiert. Die Belichtungszeit war abhängig von der Intensität der jeweiligen Chemilumineszenz.

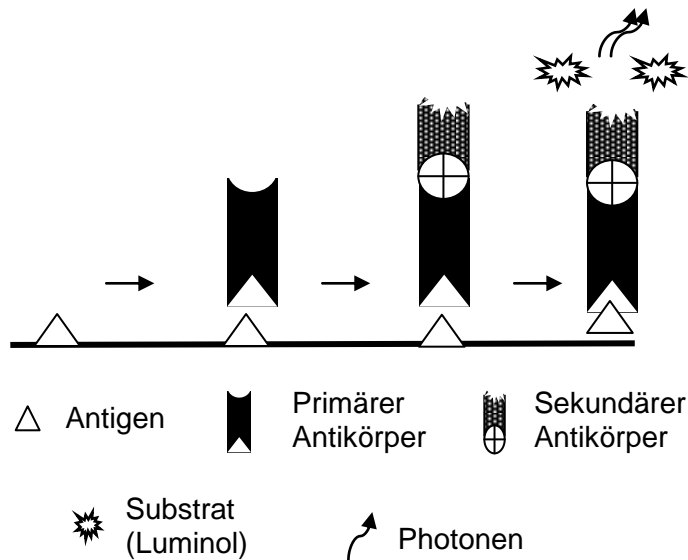


Abb. 2.3: Schema zur Immundetektion

Die Auswertung der Western-Blots erfolgte mit ImageJ[®], wobei die Intensitäten der Proteinbanden gemessen wurden. Die Messwerte wurden mit Excel[®] ausgewertet und graphisch dargestellt.

2.3 Molekularbiologisches Arbeiten

2.3.1 Plasmid DNA

Tab. 6: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Klonierungsenzyme | Selektion |
|-------------------|-------------------|-----------|
| PKP2-wt-pEGFP-C2 | EcoR I / Sal I | Kanamycin |
| PKP2-wt-pDsRed-N1 | EcoR I / Sal I | Kanamycin |

2.3.2 Transformation von *E. coli* mit der Plasmid DNA

100 µl kompetenter *E. coli* Bakterien wurden mit einem DNA Mix (7,5 µl H₂O, 10 µl KCM, 0,5 ng DNA) für 20 min auf Eis und 10 min bei RT inkubiert. Die Inkubation wurde in 1 ml LB Medium im *Thermocycler* bei 37°C für 1 h fortgesetzt. Die Suspension wurde für 1 min bei 4190 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in ca. 100 µl LB Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie auf LB Agar Platten, die das Antibiotikum Kanamycin (50 mg/ml) enthielten, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Isolierung der DNA wurde mit dem Maxi Präp Kit jet Star (Genomed) durchgeführt.

2.4 Immunfluoreszenz

Zur qualitativen Proteinanalyse wurden die direkte und indirekte Immunfluoreszenzdetektion genutzt. Zunächst wurden die Proteine der Cadherin Familie und die Proteine der *Armadillo-repeat* Familie mit spezifischen *monoklonalen* Antikörpern detektiert (Tabelle 2.5). Ein sekundärer Fluoreszenzfarbstoff, der speziesspezifisch die Fab-Fragmente der primären Antikörper erkennt, visualisierte das getestete Protein. Dapi (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) bindet selektiv an DNA (Tanious *et al.*, 1992). Phalloidin, ein Gift des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, bindet spezifisch an F-Aktin. Der an Phalloidin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Isothiocyant (TRITC) oder Fluoreszin (FITC) ermöglicht die Visualisierung.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen in 24 Wellplatten ausplattiert und in 500 µl Kulturmedium je Well im Brutschrank kultiviert. Je nach Zelllinie und der gewünschten Zelldichte wurde das Kulturmedium nach 24 bis 48 h abgenommen und die Deckgläschen, auf denen die Zellen gewachsen waren, wurden in PBS gewaschen. Abhängig vom verwendeten Antikörper (Tabelle 2.5) wurden die Zellen entweder für 15 min bei -20°C in MeOH fixiert und anschließend getrocknet oder für 15 min bei RT in 3,7 % FA fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Nach der Fixierung wurden alle Zellen für 15 min bei RT in MT-Puffer permeabilisiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des primären Antikörpers wurden die Zellen für 30 min in 1 % Milchpulver/PBS abgesättigt. Die primären Antikörper wurden, wie in Tabelle 2.5 angegeben, in 1 % Milchpulver/PBS verdünnt. Die Deckgläschen wurden mit verdünntem Antikörper bedeckt und in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation des primären Antikörpers wurden die Deckgläschen in PBS gewaschen und anschließend nochmals für 5 min mit 1 % Milchpulver/PBS abgesättigt. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in 1 % Milchpulver/PBS verdünnt (Tabelle 2.6) und in einer feuchten Kammer bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Dapi wurde 1:5000 in 1 % Milchpulver/PBS verdünnt und zusammen mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper und Dapi wurden die Deckgläschen in PBS gewaschen. Vor der Einbettung in Mowiol wurden die Deckgläschen erst in destilliertem Wasser und anschließend in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Zum Aushärten des Mowioles wurden die Deckgläschen im Kühlschrank bei 4°C über Nacht gelagert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Nikon) und mit der Auswertungssoftware Lucia.

2.5 Materialien

2.5.1 Antikörper

Tab. 7: Verdünnungen primärer Antikörper

| Antikörper | Hersteller | Spezies | Verdünnung | Fixierung |
|--|--------------------------|----------------------|------------------------|-----------|
| anti PKP1 | Progen | Maus | 1:100 IF, 1:500 WB | MeOH |
| anti PKP2 | Progen | Maus | 1:5 IF, 1:200 WB | MeOH |
| anti PKP3 | Progen | Maus | 1:200 IF, 1:500 WB | MeOH |
| anti p0071 | Hatzfeld et al., 1996 | Kaninchen | 1:1000 IF | MeOH |
| anti p0071 Kopf #10 | | Meer- schweinchen | 1:2000 WB | - |
| anti E- Cadherin | Transduktion | Maus | 1:50 IF, 1:1000 WB | MeOH |
| anti N- Cadherin | Transduktion | Maus | 1:500 IF, 1:2500 WB | MeOH |
| anti P- Cadherin | Transduktion | Maus | 1:50 IF, 1:1000 WB | MeOH |
| anti p120 ^{ctn} | Transduktion | Maus | 1:400 IF, 1:1000 WB | MeOH |
| anti α Tubulin (DM1 α) | Sigma-Aldrich | Maus | 1:750 IF, 1:4000 WB | |

(IF: Immunfluoreszenz, WB: Western-Blot, MeOH: Methanol)

Tab. 8: Verdünnung der Fluoreszenzfarbstoffe

| Phaloidine | Hersteller | Spezies | Verdünnung | Fixierung |
|------------|------------|---------|------------|-----------|
| TRICT | Invitrogen | - | 1:10000 IF | FA 3,7 % |
| FITC | Invitrogen | - | 1:1000 IF | FA 3,7 % |
| | | | | |
| Dapi | Sigma | - | 1:5000 IF | |

(IF: Immunfluoreszenz, FA: Formaldehyd)

Tab. 9: Verdünnung sekundärer Antikörper

| Antikörper | Hersteller | Verdünnung |
|------------|------------|------------|
|------------|------------|------------|

2. Material und Methoden

| | | |
|---------------------------|-------------------|--------------|
| Alexa 488 anti Maus | Molecular Probes | 1:400 IF |
| Alexa 488 anti Rabbit | Molecular Probes | 1:400 IF |
| Cy 3 anti Maus | Jackson / Dianova | 1:500 IF |
| Cy 3 anti Rabbit | Jackson / Dianova | 1:500 IF |
| HRPO anti Maus | Jackson / Dianova | 1: 50.000 WB |
| HRPO anti Rabbit | Jackson / Dianova | 1:10.000 WB |
| HRPO anti Meerschweinchen | Jackson / Dianova | 1:10.000 WB |

(IF: Immunfluoreszenz, WB: Western-Blot)

2.5.2 Puffer und Lösungen

Alle aufgeführten Chemikalien wurden, wenn nicht anders bezeichnet, von Sigma Aldrich bezogen.

PBS (10x): 8 % NaCl; 0,2 % KCl; 0,01 M KH_2PO_4 ; 0,1 M Na_2HPO_4 ; pH 7,2

TBS (10x): 10 mM Tris; 1 M NaCl; pH 7,6

TBST (10x): 10 mM Tris; 1 M NaCl; 1 % Tween – 20; pH 7,6

PBSE: 1xPBS + 0,5 mM EDTA

Blott Puffer 1: 0,3 M Tris; 20 % (v/v) MeOH; pH 10,4

Blott Puffer 2: 25 mM Tris; 20 % (v/v) MeOH; pH 10,4

Blott Puffer 3: 25 mM Tris HCl; 40 mM ϵ -Aminocapronsäure; 20 % (v/v) MeOH; pH 9,4

Ponceau Lösung (10x): 2 % Ponceau S; 30 % TCA; 30 % Sulfosalizylsäure

Ponceau S: 3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalenedisulfonic acid sodium salt

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 132mM Glycin; 0,1 % SDS; pH = 8,8

Probenpuffer: 50 mM Tris, PH 6,8; 5 % SDS; 10 % β -Mercaptoethanol; 10 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau

Mowiol: 5 % Mowiol; 30 % Glycerol; 0,25 % DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2)Octane)

MT-Puffer: 10 mM PIPES, pH 6,9; 2 mM EDTA ; 1 mM EGTA ; 4M Glycerin ; 0,5 % (v/v) Triton X-100 ; pH 6,9

Lysepuffer: 10mM Tris pH 7,5 ; 1% SDS

5x KCM : 0,5 M KCl ; 0,15 M CaCl_2 ; 0,25 M MgCl_2

LB Medium : 10 g NaCl ; 10 g Tryptone ; 5 g Yeast Extrakt ; ad 1 l H_2O ; pH 7,0

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris ; pH 6,8

2. Material und Methoden

Trenngelbuffer: 1,5 M Tris ; pH 8,8

2.5.3 Geräte

| | |
|--|---------------------------------|
| Blotkammer | peqLab |
| Elektrophoresekammer | Bio Rad |
| Fluoreszenzmikroskop | Nikon |
| Mikroplattenreader | Thermo Scientific |
| Fotokassette | BioTech |
| Glasplatten und Spacer | Bio Rad |
| Inkubator | Thermo |
| Neubauerzählkammer | Marienfeld Germany |
| Spannungserzeuger, EC 250-9 | E-C Apparatures- Corporation |
| Spektrofotometer, Ultrospec 200 | Pharmacia Biotech |
| Sterilbank | Kendro |
| Sterile Kanülen (Innendurchmesser 0,8 mm und 0,4 mm) | Braun |
| Thermomixer | Eppendorf |

2.5.4 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|-----------|
| 24 Well Platten | TPP |
| 30% Acrylamid + 0,8% Bis-acrylamid | Serva |
| Agar | Roth |
| BSA (Bovines Serum Albumin) | Sigma |
| Blotmembranen | Whatmann |
| Chemilumineszenzfilm | Roche |
| DMEM | PAA |
| DMSO | Sigma |
| Eppendorfröhrchen 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml | Eppendorf |
| Ethanol | PAA |
| FCS | PAA |
| Fixierer | Kodak |
| Kanamycin | Kodak |
| Kryoröhrchen | Sarstedt |
| Kulturschalen 10 cm Durchmesser | TPP |
| Kulturschalen 6 cm Durchmesser | TPP |
| MeOH | PAA |

2. Material und Methoden

| | |
|--------------------------|-------|
| Penicilin / Streptomycin | PAA |
| FA | Sigma |
| RPMI 1640 | PAA |
| SDS | Serva |
| Sodium Pyruvate | PAA |
| Tris | Roth |
| Trypsin | PAA |
| Tryptone | Roth |
| Yeast Extract | Roth |

2.5.5 Kits

| | |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Melanozyte growth media</i> | Promocell |
| <i>Cell Invasion Assay Kit</i> | Callbiochem® |
| ECL Lösungen | Amersham Biosciences |
| jetPEI™ | biomol |
| Lipofectamine™ 2000 | Invitogen |
| Maxi Präp, jet Star | Genomed |
| <i>Micro BC Assay Kit</i> | Uptima |

2.5.6 Software

| | |
|-------------|-----------|
| Excel | Microsoft |
| Word | Microsoft |
| Power Point | Microsoft |
| Image J | NIH |
| Photoshop | Adobe |
| SPSS | IBM |

3. Ergebnisse

Es ist bekannt, dass die E-Cadherin und die P-Cadherin Expression in malignen Melanomen vermindert (Hsu *et al.*, 1996; Seline *et al.*, 1996) und die N-Cadherin Expression gesteigert sind (Hsu *et al.*, 1996). Als Grundlage der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Expression und die Lokalisation der klassischen Cadherine, E-, N- und P-Cadherin, in verschiedenen Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten untersucht. Im Weiteren wurde die Expression der *Armadillo-repeat* Proteine p120^{ctn}, Plakophilin 1, Plakophilin 2, Plakophilin 3 und p0071 näher charakterisiert. Da es nicht möglich war, die humanen Melanomzellen bis zum Stadium der Konfluenz zu kultivieren, wurden zur besseren Vergleichbarkeit auch die Melanomzellen nur bis zu einem subkonfluenten Stadium kultiviert.

3.1 Expression der klassischen Cadherine in Melanomzellen und Melanozyten

3.1.1 Epitheliales Cadherin (E-Cadherin)

In normaler Haut exprimieren Melanozyten und die umliegenden Keratinozyten E- und P-Cadherin. E-Cadherin stellt hierbei das hauptsächlich heterotypische Adhäsionsprotein zwischen Keratinozyten und Melanozyten dar (Tang *et al.*, 1994). In Melanomzellen wurde eine Reduktion bzw. ein vollständiger Verlust an E- und P-Cadherin gezeigt (Hsu *et al.*, 1996; Seline *et al.*, 1996). E-Cadherin als charakteristisches Protein der Adhärenzkontakte zwischen Melanozyten und Keratinozyten (Tang *et al.*, 1994) war in den Melanozyten nachweisbar (Abbildung 3.1). Die Melanomzelllinien MM1 und HT144 exprimierten ebenfalls E-Cadherin (Abbildung 3.1), jedoch deutlich geringer als die Melanozyten, während in den übrigen Melanomzellen kein E-Cadherin detektiert werden konnte. In den Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigte E-Cadherin sowohl in den Melanozyten als auch in den Melanomzelllinien MM1 und HT144 eine diffus zytoplasmatische Lokalisation und eine membranständige Lokalisation im Zellkontaktbereich (Abbildung 3.1 B).

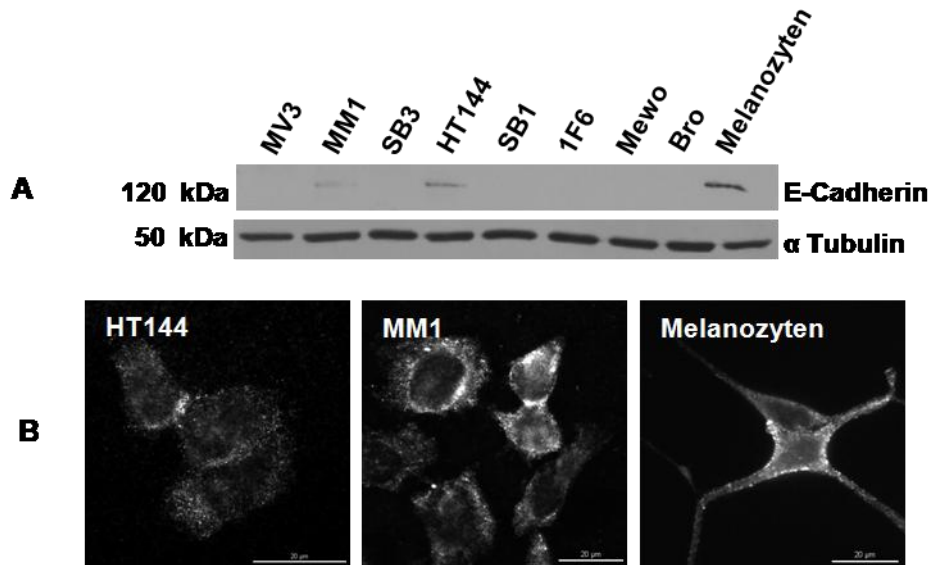


Abb. 3.1: E-Cadherin Expression in Melanomzellen und Melanozyten

A: Im Western-Blot wurde E-Cadherin in den Melanozyten und in den Melanomzelllinien MM1 und HT144 detektiert. α Tubulin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. **B:** E-Cadherin zeigt in den Melanomzelllinien HT144, MM1 und in Melanozyten eine diffus zytoplasmatische und eine membranständige Lokalisation im Zellkontaktbereich. [Maßstab: 20 μ m].

3.1.2 Plazentäres Cadherin (P-Cadherin)

P-Cadherin, das zweite untersuchte Mitglied der Familie der klassischen Cadherine, wurde im Western-Blot in den Melanozyten und in den Melanomzelllinien MM1 und HT144 detektiert (Abbildung 3.2), wobei die Expression in den beiden Melanomzelllinien, die auch E-Cadherin exprimieren, leicht stärker war als die in den Melanozyten. Die Regulation der Expression von E- und P-Cadherin sind jedoch gegensätzlich. In beiden Melanomzelllinien HT144 und MM1 und in den Melanozyten lokalisiert P-Cadherin membranständig und im Bereich der Zellkontaktregionen (Abbildung 3.2).

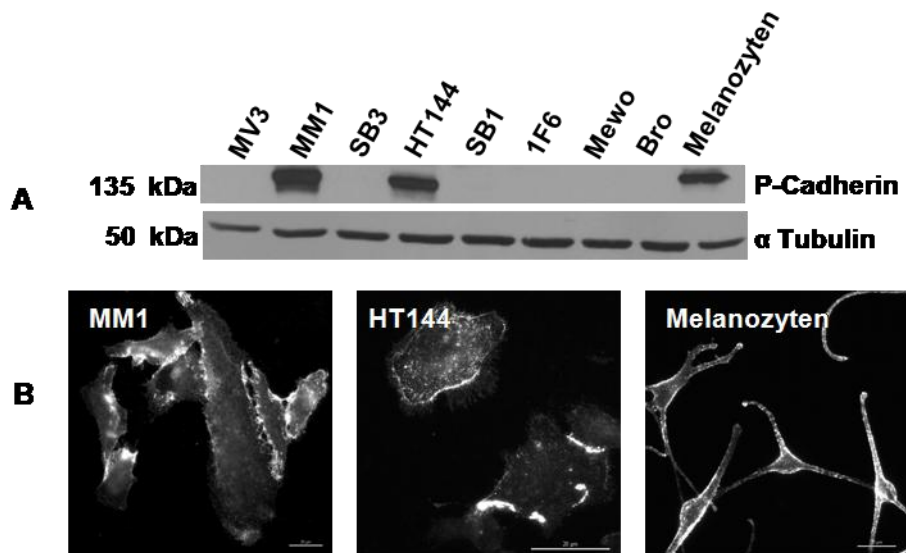


Abb. 3.2: P-Cadherin Expression in Melanomzellen und Melanozyten

A: Im Western-Blot war P-Cadherin in den Melanomzelllinien MM1 und HT 144 und in den Melanozyten nachweisbar. α Tubulin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. **B:** Die Immunfluoreszenzfärbungen von P-Cadherin zeigten in den Melanomzelllinien MM1, HT144 und den Melanozyten eine vorwiegend membranständige Lokalisation mit einer Akkumulation im Bereich der Zellkontaktregionen. [Maßstab: 20 μ m]

3.1.3 Neuronales Cadherin (N-Cadherin)

Die N-Cadherin Expression ist charakteristisch für invasive Karzinome und ermöglicht Melanomzellen die Interaktion mit dermalen Fibroblasten und Endothelzellen (Hsu *et al.*, 2000a). Sechs der acht Melanomzelllinien (MM1, SB3, HT144, SB1, 1F6 und Mewo) exprimierten N-Cadherin auf unterschiedlich hohem Niveau. In den beiden Melanomzelllinien 1F6 und Mewo konnte N-Cadherin nur schwach beziehungsweise mäßig detektiert werden, wohingegen die übrigen vier Melanomzelllinien eine starke N-Cadherin Expression zeigten. In den Melanozyten wurde kein N-Cadherin detektiert (Abbildung 3.3). Die Melanomzelllinien MV3 und Bro exprimierten keines der untersuchten Cadherine. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, dass N-Cadherin in den analysierten Melanomzelllinien vorwiegend membranständig und im Bereich der Zellkontaktregionen lokalisierte (Abbildung 3.3).

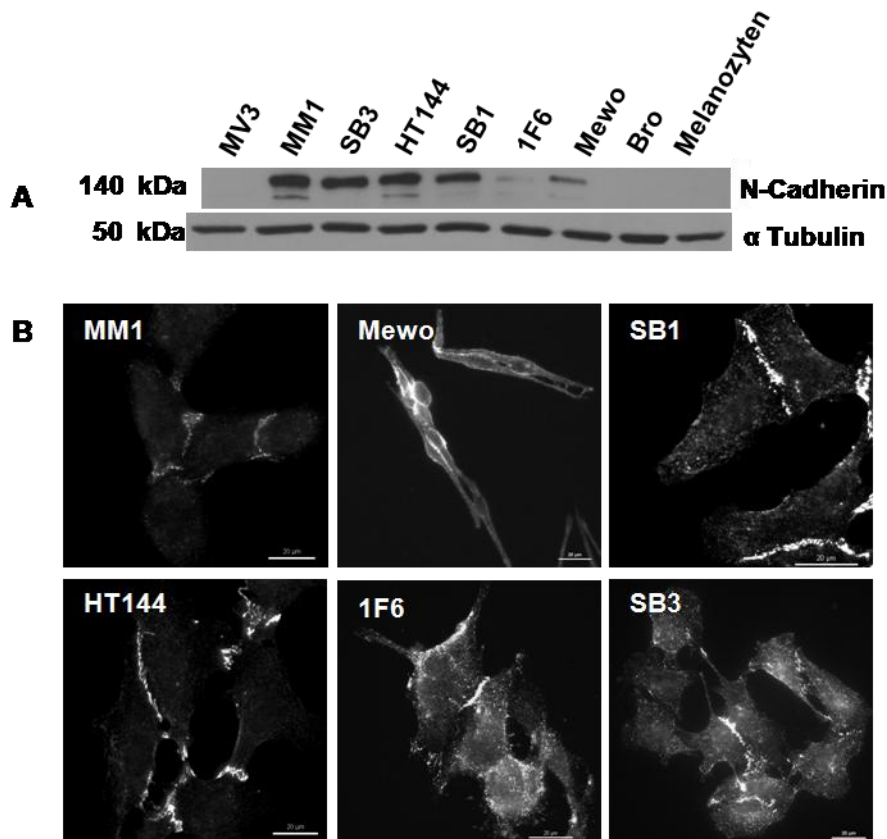


Abb. 3.3: N-Cadherin Expression in Melanomzellen und Melanozyten

A: Im Western-Blot war N-Cadherin in sechs der Melanomzelllinien nachweisbar. α -Tubulin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. **B:** Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten eine vorwiegend membranständige Lokalisation von N-Cadherin, mit einer Akkumulation im Bereich der Zellkontaktregionen. [Maßstab: 20 μ m]

3.2 Expression der Armadillo-repeat Proteine in Melanomzellen und Melanozyten

3.2.1 p120^{ctn}

Das Protein wird in vier verschiedenen Isoformen exprimiert, die sich durch die Verwendung alternativer Startcodons unterscheiden (Aho *et al.*, 2002). Die Isoform 1A mit einem Molekulargewicht von 104 kDa wurde in den Melanomzelllinien MM1, SB3, HT144 und SB1 stärker exprimiert als in den Melanozyten. Die Melanomzelllinien MV3, 1F6, Mewo und Bro zeigten eine reduzierte Expression der Isoform 1A, bezogen auf die Expression der Melanozyten. Die Expression der p120^{ctn} Isoform 3A war in den Melanomzelllinien MV3, MM1, SB3, HT144, SB1, Mewo und Bro bis auf das Fünffache des Expressionsniveaus der Melanozyten gesteigert. Die hohen Proteinexpressionen in den Zelllinien MM1, SB3, HT144 und SB1 korrelierten mit den hohen N-Cadherinleveln in diesen Zellen. Einzig die Melanomzelllinie 1F6 zeigte eine geringere Expression. Die Isoform 4A war nur in den Melanomzelllinien MM1, SB3, HT144 und SB1 nachweisbar, wobei hier nicht auszuschließen ist, dass es sich um Abbauprodukte handelt (Abbildung 3.4). Um die Lokalisation von endogenem p120^{ctn} in den verschiedenen Melanomzellen und den Melanozyten zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzstudien angefertigt. Hierbei zeigte sich, dass p120^{ctn} sowohl in Melanozyten als auch in den Melanomzelllinien zytoplasmatisch und an der Zellmembran lokalisiert. Einzig die Zelllinie MV3 zeigte eine vorwiegend zytoplasmatische p120^{ctn} Lokalisation. Ein Kernsignal ist in keiner der Zellen zu sehen (Abbildung 3.4). Die Zellen HT144 und MM1 zeigten eine deutlich stärkere Plasmamembran-Assoziation. Dies korreliert mit der E-Cadherin Expression in diesen Zellen.

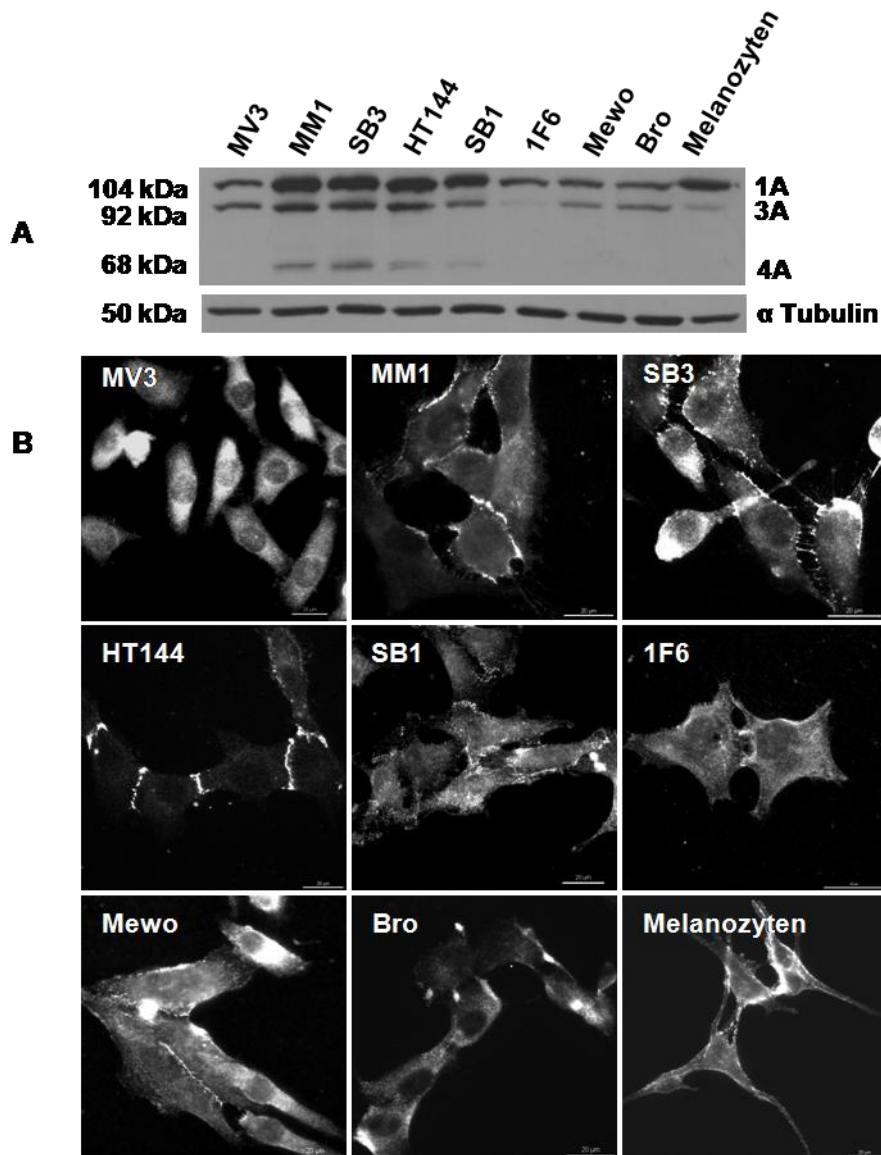


Abb. 3.4: Expression von p120^{ctn} in Melanomzellen und Melanozyten

A: Der Western-Blot zur quantitativen Analyse der p120^{ctn} Expression zeigt, dass die Isoformen 1A und 2A in allen Melanomzellen und in Melanozyten detektierbar waren. In den Melanomzellen MM1, SB3, HT144 und SB1 konnte zudem die Isoform 4A detektiert werden. α Tubulin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

B: In den Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigte sich für die Melanomzelllinie MV3 eine ausschließlich diffus zytoplasmatische Lokalisation. In den übrigen Melanomzellen lokalisiert p120^{ctn} membrangebunden und diffus zytoplasmatisch. [Maßstab: 20 μ m]

3.2.2 p0071

p0071 (Hatzfeld und Nachtsheim, 1996) wurde von den Melanozyten und allen Melanomzelllinien exprimiert (Abbildung 3.5). Das Expressionsniveau innerhalb der Melanomzelllinien zeigte deutliche Unterschiede. Die Melanomzellen MM1, SB3, HT144 und SB1 exprimierten ähnliche Mengen an p0071 wie die Melanozyten. Die Proteinexpression war in den Melanomzelllinien 1F6 und Mewo leicht geringer. Bro und MV3 zeigten eine deutlich reduzierte p0071 Expression (Abbildung 3.5). Die Expression von p0071 korreliert mit der Expression der Cadherine. MV3 und Bro, die keine Cadherinexpression zeigten, exprimierten am wenigsten p0071. Die Analyse der Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigte, dass p0071 in den Melanozyten und in allen Melanomzelllinien vorwiegend diffus zytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 3.5). Eine Lokalisation von p0071 im Bereich der Zellkontaktregionen war nicht sicher nachweisbar. p0071 Fluoreszenzsignale entlang der Zellmembran im Bereich von Zellkontaktregionen der Melanomzellen HT144 und SB1 ließen jedoch eine solche vermuten (Pfeile in Abbildung 3.5).

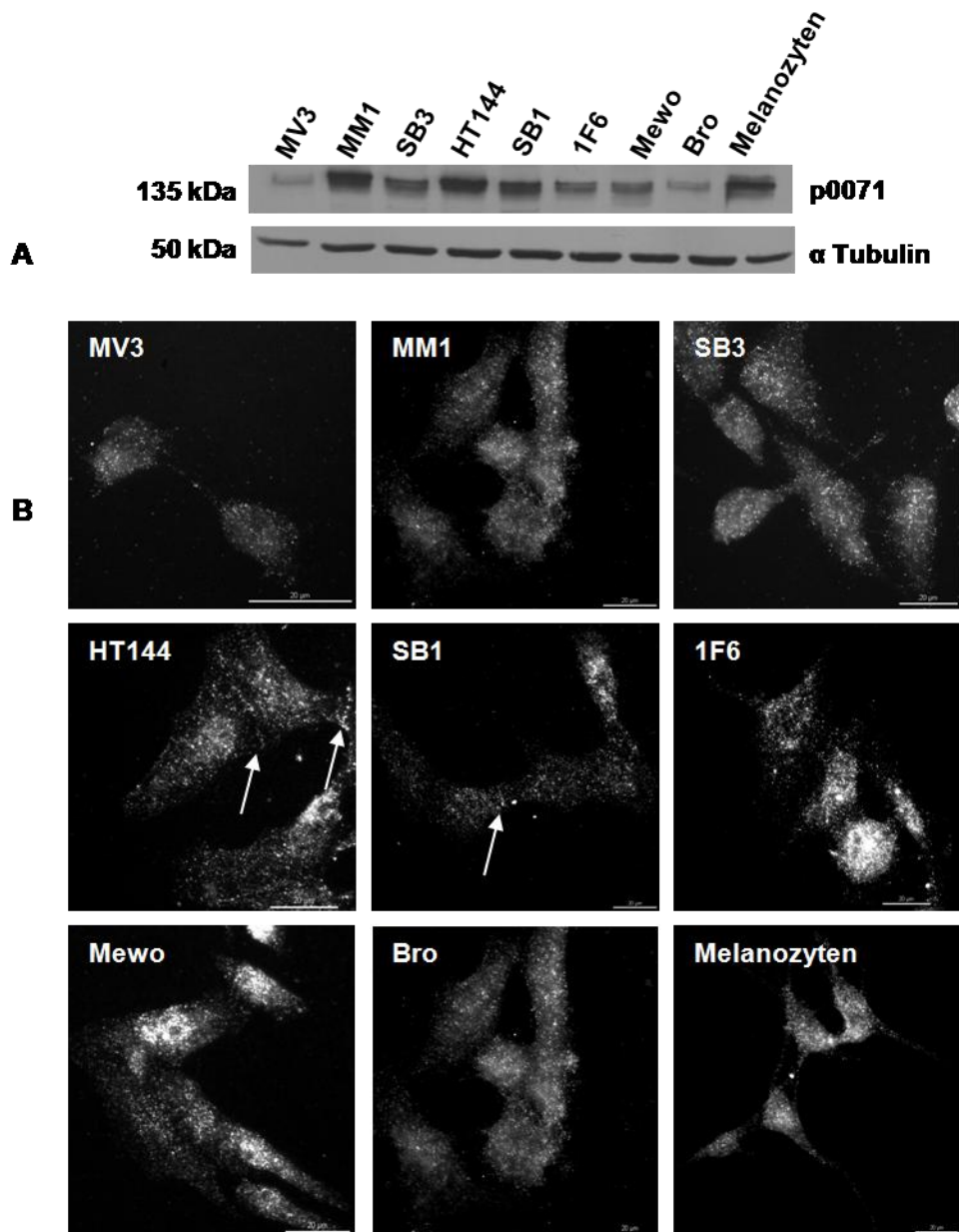


Abb. 3.5: p0071 Expression in Melanomzellen und Melanozyten

A: HT144 und MM1 zeigten eine ähnlich starke p0071 Expression wie die Melanozyten. Die übrigen Melanomzellen zeigten eine reduzierte Plakophilin 3 Expression. α Tubulin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. **B:** Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, dass p0071 in allen Melanomzelllinien zytoplasmatisch lokalisiert. In den Melanomzelllinien HT144 und SB1 ist zudem eine Lokalisation an Zellkontaktregionen zu erkennen (Pfeile). [Maßstab: 20 μ m].

3.2.3 Plakophilin 1

Plakophilin 1 wurde weder von den untersuchten Melanomzellen noch von Melanozyten exprimiert. Als Referenz dienten HaCat Zellen, die endogenes Plakophilin 1 auf hohem Niveau exprimieren (Hatzfeld *et al.*, 2000).

3.2.4 Plakophilin 2

Plakophilin 2 existiert in zwei *Splicevarianten* (97 kDa und 92 kDa) (Mertens *et al.*, 1996). In den im Zuge meiner Arbeit untersuchten normalen humanen Melanozyten konnte Plakophilin 2 nicht detektiert werden. Die beiden Melanomzelllinien MM1 und HT144 zeigten hingegen eine deutliche Plakophilin 2 Expression (Abbildung 3.6). Die Plakophilin 2 Expression korreliert mit der Expression von E- und P- Cadherin, obwohl Plakophilin 2 in normalen humanen Melanozyten nicht nachgewiesen detektiert werden konnte. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, dass Plakophilin 2 ubiquitär im Zytoplasma der Melanomzelllinien MM1 und HT144 lokalisierte und kaum eine Assoziation zu Zellkontaktregionen zeigte. Nach Darstellung des Akinnetzwerks konnten in beiden Melanomzelllinien zahlreiche Lamellipodien und Filopodien nachgewiesen werden. Plakophilin 2 lokalisierte in beiden Zelllinien häufig an den Lamellipodien und Filopodien (Abbildung 3.6). Eine Akkumulation von Plakophilin 2 im Zellkern (Abbildung 3.6) (Mertens *et al.*, 1996) war nicht in allen Plakophilin 2 exprimierenden Zellen nachweisbar.

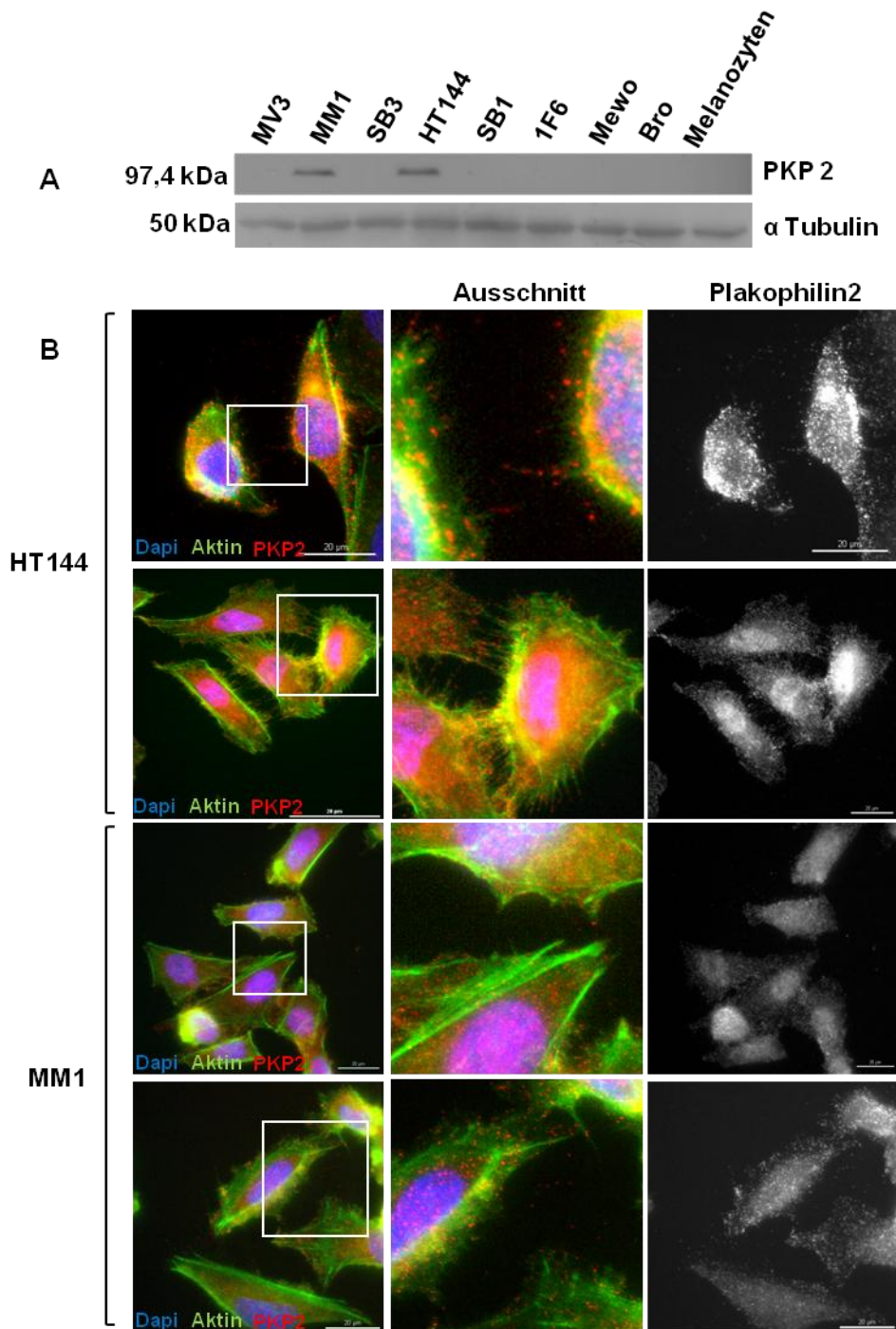


Abb. 3.6: Plakophilin 2 Expression in Melanomzellen und Melanozyten

A: Plakophilin 2 war im Western-Blot einzig in den Melanomzelllinien MM1 und HT 144 nachweisbar. α Tubulin zeigte, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

B: Die Immunfluoreszenzuntersuchungen der Melanomzelllinien MM1 und HT 144 zeigten, dass Plakophilin 2 in beiden Melanomzelllinien an den Lamellipodien und Filopodien lokalisiert. Eine Lokalisation von Plakophilin 2 im Zellkern konnte nicht durchgehend gezeigt werden. [Maßstab: 20 μ m]

3.2.5 Plakophilin 3

Plakophilin 3 hat eine Größe von 87 kDa und wurde von den Melanozyten nicht exprimiert. Die Melanomzelllinien MV3, MM1, SB3, HT144, SB1 und Bro exprimierten Plakophilin 3 auf unterschiedlich hohem Niveau. Die stärkste Expression wurde in der Melanomzelllinie Bro detektiert (Abbildung 3.7). In den Melanomzelllinien 1F6 und Mewo war, wie auch in den Melanozyten, kein Plakophilin 3 nachweisbar. Bei der Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des endogenen Plakophilin 3 (Abbildung 3.7) zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Melanomzelllinien. In den Melanomzelllinien MM1, SB3, HT144, und SB1 lokalisierte Plakophilin 3 an der Zellmembran, beziehungsweise im Bereich vermutlicher Zellkontaktregionen und diffus zytoplasmatisch. Die genannten Melanomzelllinien exprimierten alle N-Cadherin auf hohem Niveau. Die Melanomzelllinien MV3 und Bro zeigten eher keine Membranlokalisation von Plakophilin 3. Hier dominierte die diffus zytoplasmatische Plakophilin 3 Lokalisation. Verglichen mit den anderen Melanomzelllinien exprimierten diese beiden keine Cadherine.

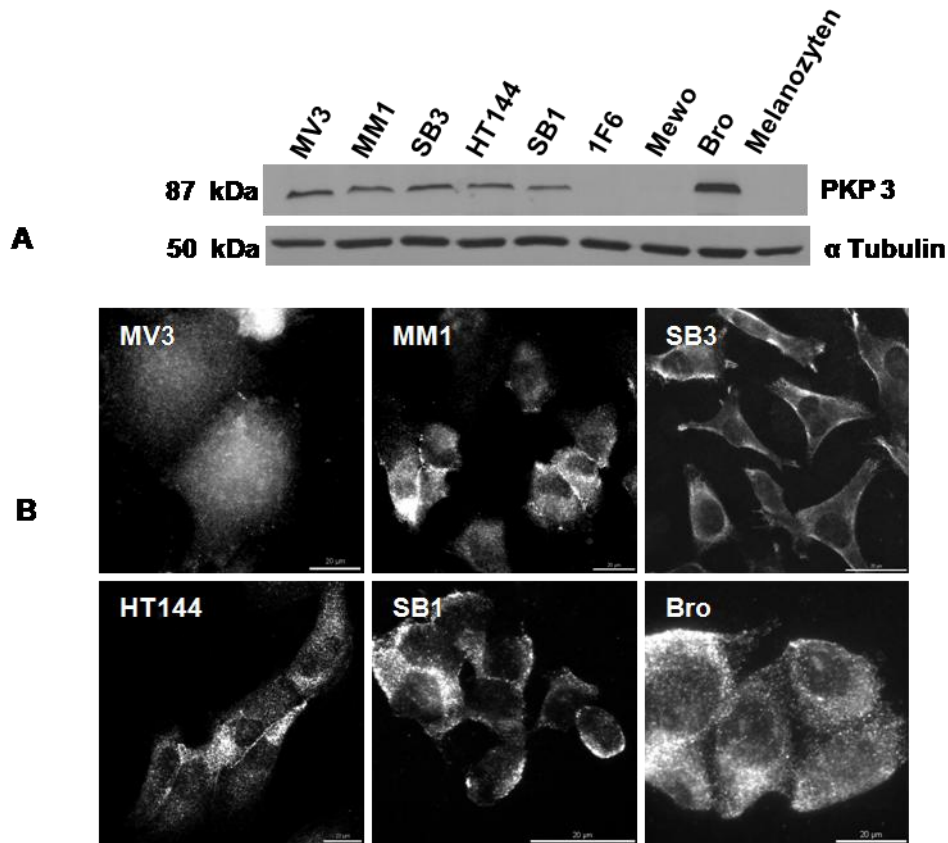


Abb. 3.7: Plakophilin 3 Expression in Melanomzellen und Melanozyten

A: Im Western-Blot wurde gezeigt, dass Plakophilin 3 in den Melanozyten und den Melanomzelllinien Mewo und 1F6 nicht exprimiert wird. Hingegen zeigten die Melanomzelllinien Bro, MV3, MM1, SB3, HT 144 und SB1 eine deutliche Plakophilin 3 Expression. α Tubulin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

B: Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von endogenem PKP 3 zeigten, dass in den Melanomzellen MV3 und Bro eine diffus zytoplasmatische Lokalisation von Plakophilin 3 dominiert. Die Melanomzellen MM1, HT144, SB1 und SB3 wiesen hingegen eine membranständige und eine diffus zytoplasmatische Lokalisation von Plakophilin 3 auf. [Maßstab: 20 μm].

Ich konnte zeigen, dass im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten die Expression der *Armadillo-repeat* Proteine und die der klassischen Cadherine in Melanomzellen verändert war. Insbesondere fiel eine Expression der Plakophilin 2 und 3 in Melanomzellen auf, wobei beide Proteine in normalen humanen Melanozyten nicht nachweisbar waren. Beide Proteine lokalisieren ansonsten ganz überwiegend an der Zellmembran, in den Melanomzellen MM1 und HT144 zeigte sich jedoch eine zytoplasmatische Lokalisation. Im Weiteren sollte untersucht werden, welche Effekte Plakophilin 2 hat, wenn es nicht in den Zellkontakten lokalisiert.

Tab. 10: Übersicht der Proteinexpression

| | MV3 | MM1 | SB3 | HT144 | SB1 | 1F6 | Mewo | Bro | NHEM |
|-----------------|------------|------------|------------|--------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | ME | P | P | subk.ME | P | ME | LK-ME | P | N |
| E- Cad | - | + | - | + | - | - | - | - | ++ |
| P-Cad | - | ++ | - | ++ | - | - | - | - | + |
| N-Cad | - | ++ | ++ | ++ | ++ | (+) | + | - | - |
| p120- 1A | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | ++ |
| p120- 3A | + | ++ | ++ | ++ | + | (+) | + | + | (+) |
| PKP2 | - | + | - | + | - | - | - | - | - |
| PKP3 | + | + | + | + | + | - | - | ++ | - |
| PKP4 | (+) | ++ | + | ++ | ++ | + | + | (+) | ++ |
| PKP1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

ME:Metastase, P: Primärtumor, subk.ME: subkutane Metastase,
LK-ME: Lymphknotenmetastase, N: normal

3.3 Einfluss von Plakophilin 2 auf die Zellmorphologie und das Invasionsverhalten

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von exogenem Plakophilin 2 auf die Zellmorphologie und das Migrationsverhalten der Melanomzellen 1F6 und Mewo untersucht. Hierzu wurde Plakophilin 2 als EGFP-PKP2-wt und PKP2-wt-DsRed Fusionsproteine transient in den Melanomzelllinien 1F6 und Mewo exprimiert. Das Generieren stabiler Zellen, die exogenes Plakophilin 2 dauerhaft exprimierten, ist nicht gelungen. Ähnliche Probleme wurden auch für das Generieren stabiler p120^{ctn} exprimierender Zellen beschrieben (Reynolds *et al.*, 1996). Zur immunfluoreszenzgestützten Auswertung zellmorphologischer Veränderungen wurde das Aktinnetzwerk mit Tritc oder Fitc markiertem Phalloidin detektiert.

3.3.1 Morphologie der Melanomzellen 1F6 und Mewo

Die Melanomzelllinie 1F6 stellte sich nativ als runde Zelle, mit eher epithelialem Erscheinungsbild dar. Sie zeigte wenige, nicht verzweigte, kurze Zellausläufer und gut ausgebildete, zirkuläre Stressfasern (Abbildung 3.8). Die Melanomzellen Mewo zeigten nativ eine Fibroblasten ähnliche Morphologie mit einem vorwiegend longitudinal verlaufendem Aktinnetzwerk und einer langgestreckten Zellform (Abbildung 3.8).

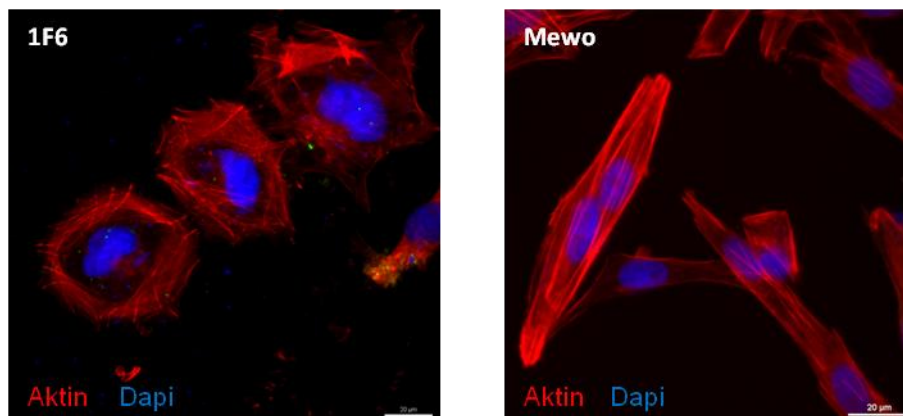


Abb. 3.8: Morphologie der nativen Melanomzellen 1F6 und Mewo

1F6 Zellen wiesen eine polygonale Morphologie und gut ausgebildete Stressfasern auf. Mewo Zellen zeigten eine spindelförmige Morphologie und ein vorwiegend longitudinales Aktinnetzwerk. [Maßstab: 20µm].

3.3.2 ***Einfluss von exogenem Plakophilin 2 auf die Zellmorphologie***

Um den Einfluss von exogenem Plakophilin 2 auf die Zellmorphologie zu untersuchen, wurden die Melanomzelllinien 1F6 und Mewo mit dem Plasmid EGFP-PKP2-wt transfiziert. Mittels des fluoreszierenden EGFP konnte anschließend die Proteinexpression fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden.

In beiden Melanomzelllinien wurden nach der Expression von exogenem Plakophilin 2 Veränderungen des Phänotyps beobachtet. Diese Veränderungen waren in beiden Melanomzelllinien charakterisiert durch die Ausbildung vieler, langer und verzweigter Zellausläufer (*Branches*), an denen selbst wiederum Filopodien zu detektieren waren. Plakophilin 2 lokalisierte ubiquitär zytoplasmatisch und im Bereich der Zellmembran. An der Zellmembran zeigte auch exogenes Plakophilin 2 eine Lokalisation an der Spitze der Zellausläufer und Filopodien (Abbildung 3.9), was auch für endogenes Plakophilin 2 nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 3.2.3). Die gleichen morphologischen Veränderungen wurden auch nach Transfektion mit PKP2-wt-DsRed beobachtet.

Die gezeigten phänotypischen Veränderungen traten bei etwa 50% der untersuchten Melanomzellen auf, die exogenes Plakophilin exprimierten (Abbildung 3.12). Reynolds beschrieb ähnliche phänotypische Veränderungen nach Expression von exogenem p120^{ctn} und bezeichnete den resultierenden Phänotyp als *branching Phänotyp* (Reynolds *et al.*, 1996). Eine Kernlokalisierung von exogenem Plakophilin 2 konnte nicht detektiert werden.

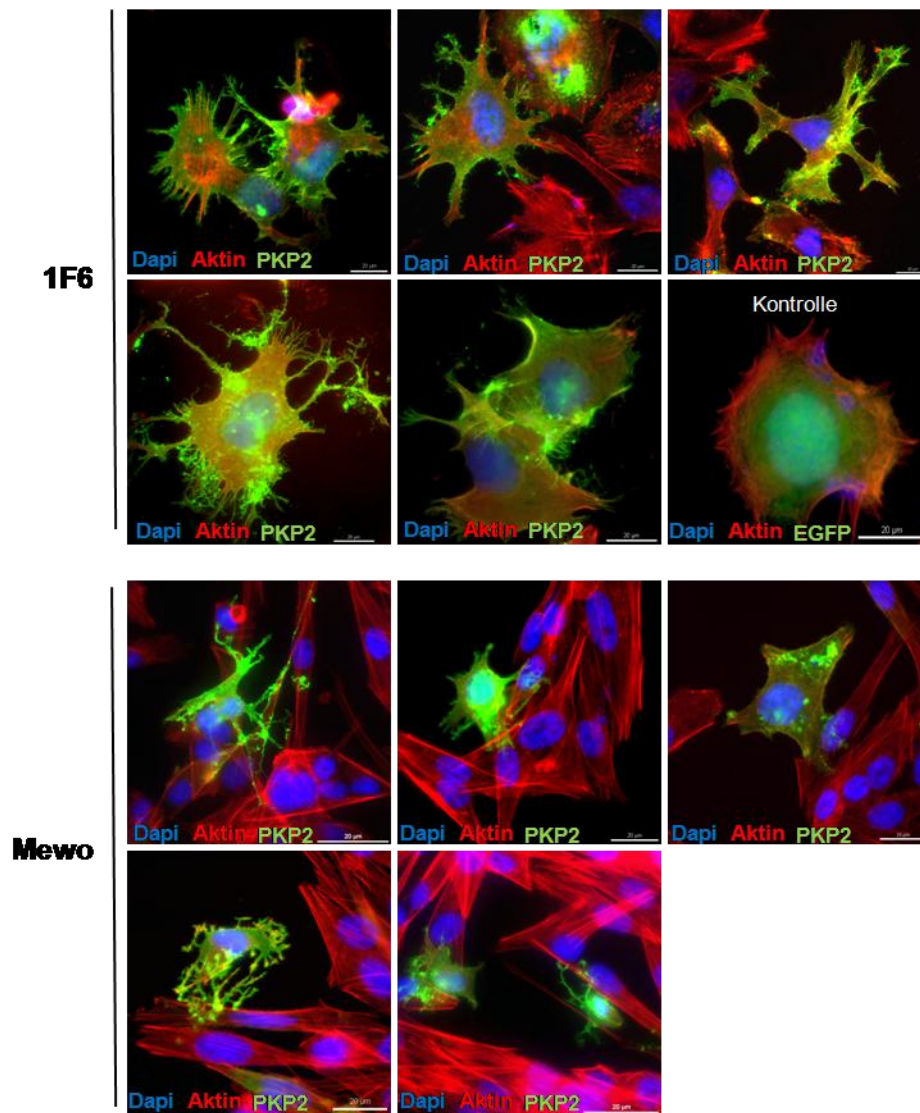


Abb. 3.9: Phänotypische Veränderungen nach Expression von exogenem Plakophilin 2 Bei beiden Melanomzelllinien kam es nach Überexpression von exogenem Plakophilin 2 zur Ausbildung langer und verzweigter Zellausläufer. Das grün fluoreszierende Plakophilin 2 lokalisierte ubiquitär zytoplasmatisch. Im Bereich der Zellausläufer war eine Akkumulation festzustellen. Eine Kernlokalisierung von exogenem Plakophilin 2 war nicht nachweisbar. Nach der Überexpression von EGFP in 1F6 Zellen traten keine morphologischen Veränderungen auf. [Maßstab: 20µm].

Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt durch den verwendeten Vektor ausgelöst war, wurden beide Melanomzelllinien mit den entsprechenden Leervektoren pEGFP und pDsRed transfiziert. Hierbei traten die für die Expression von exogenem Plakophilin 2 gezeigten, phänotypischen Veränderungen nicht auf.

3.3.3 Einfluss von exogenem Plakophilin 2 auf das Aktinnetzwerk

Neben den gezeigten morphologischen Veränderungen wurden nach der Überexpression von exogenem Plakophilin 2 auch Veränderungen am Zytoskelett beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass nach Überexpression von Plakophilin 2 in 1F6 Melanomzellen die Fluoreszenzintensität des F-Aktin reduziert war. Zudem fiel hier eine Desorganisation innerhalb des Aktinnetzwerkes auf (Abbildung 3.10).

Im Vergleich zu nicht transfizierten 1F6 Zellen fiel eine geringere bzw. fehlende Ausbildung von Stressfasern auf. Anstelle der Stressfasern wurde in den Plakophilin 2 transfizierten Zellen eine eher diffuse, nicht gut organisierte Aktinanfärbung detektiert. Ein Einfluss von exogenem Plakophilin 2 auf das Aktinnetzwerk konnte auch in den Melanomzellen Mewo beobachtet werden (Abbildung 3.9).

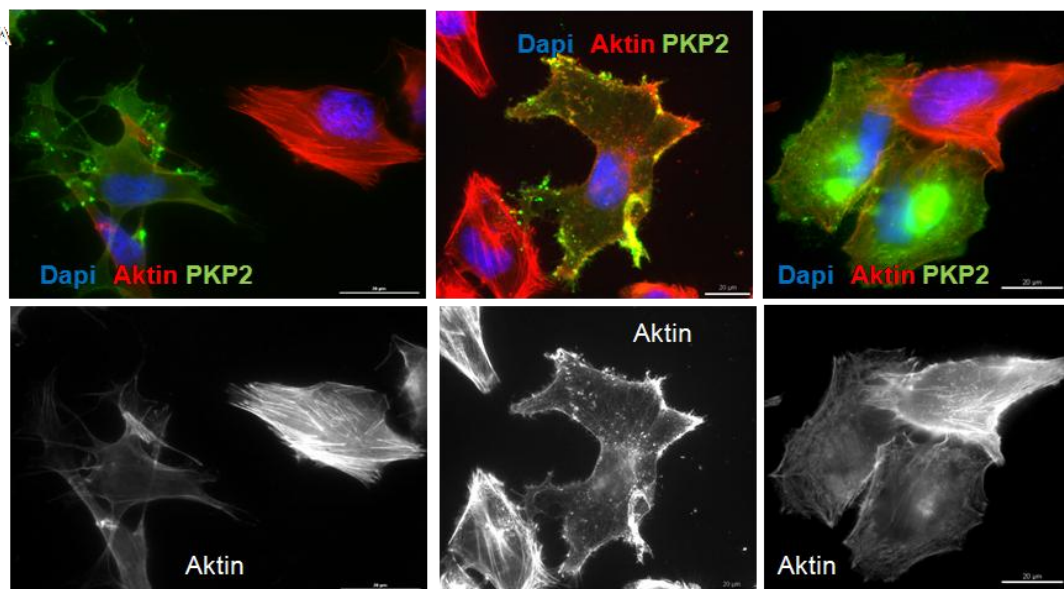


Abb. 3.10: Änderungen des Aktinnetzwerkes nach Transfektion mit Plakophilin 2
Gezeigt sind 1F6 Melanomzellen nach transienter Transfektion mit PKP2-wt-pEGFP. Das grün fluoreszierende EGFP zeigt die Plakophilin 2 exprimierenden Melanomzellen, in denen eine schwächere Intensität des F-Aktin (rot) zu detektieren war, verglichen mit den nicht transfizierten Zellen. [Maßstab 20: µm]

3.3.4 **Stabilität der phänotypischen Veränderungen nach Expression von exogenem Plakophilin 2**

Da Plakophilin 2 die Zellmorphologie beeinflusst, sollte in einem nächsten Schritt die Frage beantwortet werden, ob das Auftreten des *branching Phänotyp* zeitabhängig war. Hierzu wurden die Melanomzelllinien 1F6 und Mewo mit PKP2-wt-pEGFP transfiziert. Die Zellen wurden dann für 24h, 48h und 72h kultiviert und nach der jeweiligen Kultivierungsdauer nach dem Protokoll für Immunfluoreszenzen gefärbt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde dann ausgewertet, wieviele der transfizierten Zellen den *branching Phänotyp* zeigten. Hierzu wurden in drei unabhängigen Bereichen 100 transfizierte Zellen ausgezählt. Die graphische Auswertung (Abbildung 3.11) zeigte, dass in beiden Melanomzelllinien (1F6 und Mewo) der *branching Phänotyp* nach 24 h am ausgeprägtesten war (1F6: 50 % und Mewo: 39 %). Im Zeitverlauf nahm dessen Anteil sukzessive ab.

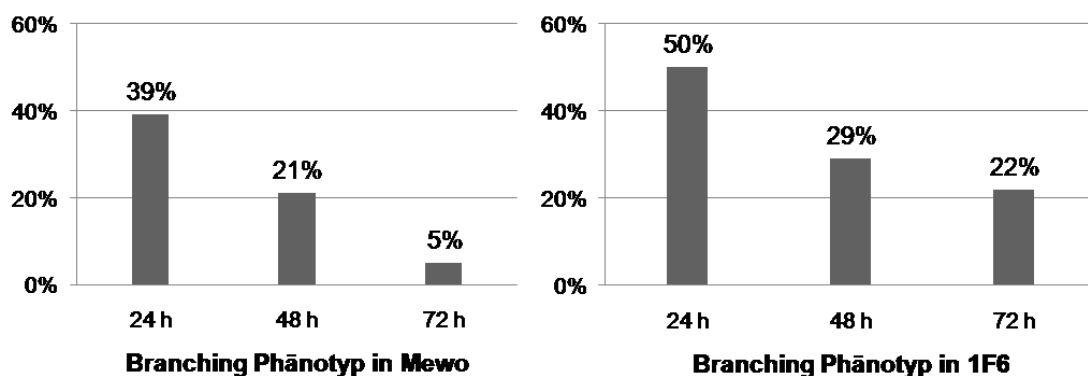


Abb. 3.12: Relativer Anteil des *branching Phänotyps* im Zeitverlauf

In beiden Zelllinien zeigte sich im Verlauf eine Abnahme des relativen Anteils der Zellen, die den *branching Phänotyp* ausbildeten.

Wegen der relativen Abnahme der Zellen, die den *branching Phänotyp* aufwiesen, ergab sich die Frage, warum dieser Phänotyp im Zeitverlauf anscheinend weniger stabil war. Möglich waren sowohl eine vermehrte Apoptose, ausgelöst durch das überexprimierte Plakophilin 2, als auch ein vermehrtes Ablösen der Zellen, die den *branching Phänotyp* exprimierten. Um dies zu untersuchen, analysierte ich die posttransfektionellen Überlebensraten der Melanomzellen 1F6 und Mewo.

3.3.5 *Posttransfektionelle Überlebensraten nach Expression von exogenem Plakophilin 2*

Bei der Untersuchung der posttransfektionellen Überlebensraten stand die Frage im Mittelpunkt, ob ein Überlebensunterschied zwischen Plakophilin 2 transfizierten, Leervektor transfizierten und nicht transfizierten 1F6 Zellen bestand. Der Überstand des Kulturmediums, die darin enthaltenen Zellen und die adhärennten Zellen wurden getrennt ausgezählt. Abbildung 3.13 zeigt den relativen Anteil toter Zellen. Im Zeitverlauf zeigt sich, dass allein durch die Transfektion ein vermehrtes Absterben der Zellen auftritt. Der relative Anteil toter Zellen zeigt zu allen Zeitpunkten keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Plakophilin 2 transfizierten Zellen und den mit dem Leervektor transfizierten Zellen. Auch zeigte sich im Zeitverlauf ein vermehrtes, vektorunabhängiges Ablösen der transfizierten Zellen von der Unterlage (Daten nicht gezeigt).

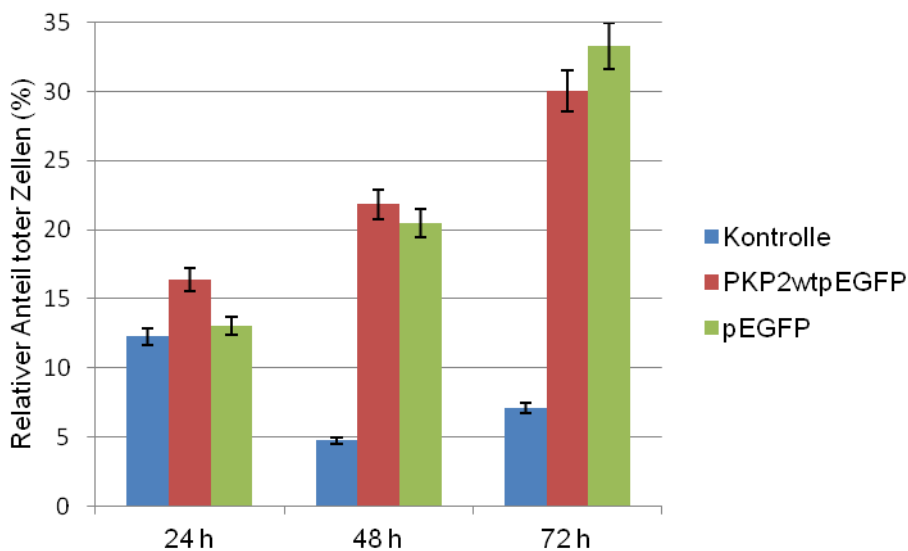


Abb. 3.13: Posttransfektioneller Anteil toter Zellen

Es zeigt sich, dass im Vergleich zu den nicht transfizierten Kontrollen nach der Transfektion mehr Zellen absterben. Die Differenz des Anteils toter Zellen zwischen den Transfektionen mit Plakophilin 2 und dem Leervektor ist zu allen Zeitpunkten kleiner als 5 %.

3. Ergebnisse

Zur statistischen Auswertung wurden die Überlebensraten nach Transfektion mit Plakophilin 2 und dem Leervektor bestimmt und in Abbildung 3.14 gegeneinander abgetragen. Die Auswertung ergab zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Transfektion mit Plakophilin 2 und EGFP (Abbildung 3.14). Die statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney U Test untersucht.

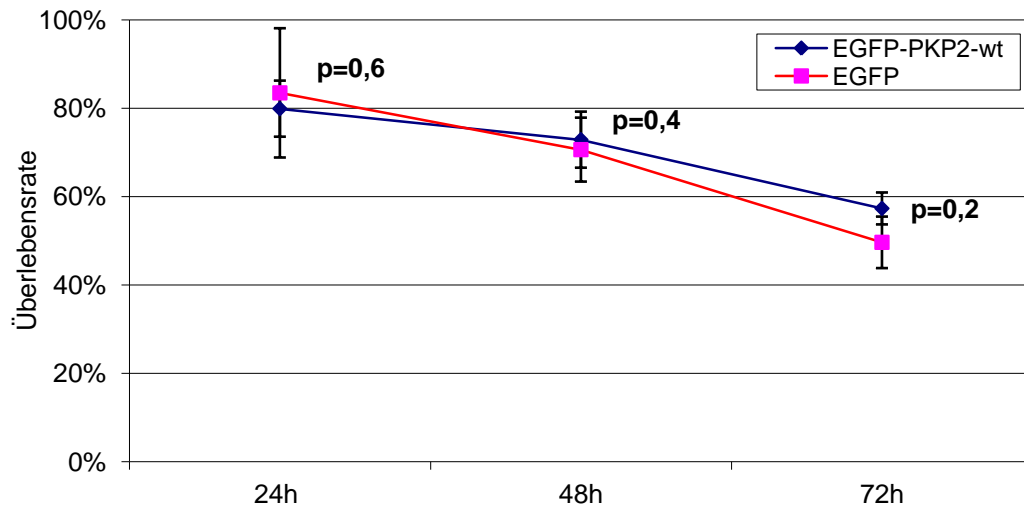


Abb. 3.14: Überlebensraten nach Transfektion mit Plakophilin 2 und dem entsprechenden Leervektor

Vergleich der Überlebensraten mit Darstellung der Standardabweichungen, nach Transfektion mit EGFP-PKP2-wt und EGFP in 1F6 Zellen. Die angegebenen p-Werte zeigen, dass zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied zwischen den Plakophilin 2 transfizierten Zellen und den Leervektor transfizierten Zellen besteht.

3.3.6 Vergleich des invasiven Wachstums der Melanomzellen 1F6 und Mewo nach Überexpression von Plakophilin 2 und dem entsprechenden Leervektor

Der Einfluss von Plakophilin 2 auf die Zellmorphologie und auf das Aktin-Zytoskelett warfen die Frage auf, ob Plakophilin 2 das Migrationsverhalten und somit die Invasivität der untersuchten Melanomzellen beeinflusst.

Die Fragestellung wurde mit Hilfe des *Invasion Assay* (Callbiochem) untersucht. Die Melanomzelllinien 1F6 und Mewo wurden mit den Plasmiden EGFP-PKP2-wt, PKP2-wt-DsRed und den Kontrollen EGFP, DsRed transfiziert. Nicht transfizierte Zellen wurden nicht zum Vergleich herangezogen, da sich deren posttransfektionelle Überlebensrate deutlich von der transfizierter Zellen unterschied (Abbildung 3.13). Es wurde das Invasionsverhalten zwischen den Plakophilin 2 transfizierten und den EGFP beziehungsweise DsRed transfizierten Zellen verglichen. 24 h nach der Transfektion

3. Ergebnisse

wurden die Zellen in die Invasionskammern ausplattiert. Nach weiteren 48 h wurde der Invasions Assay ausgewertet.

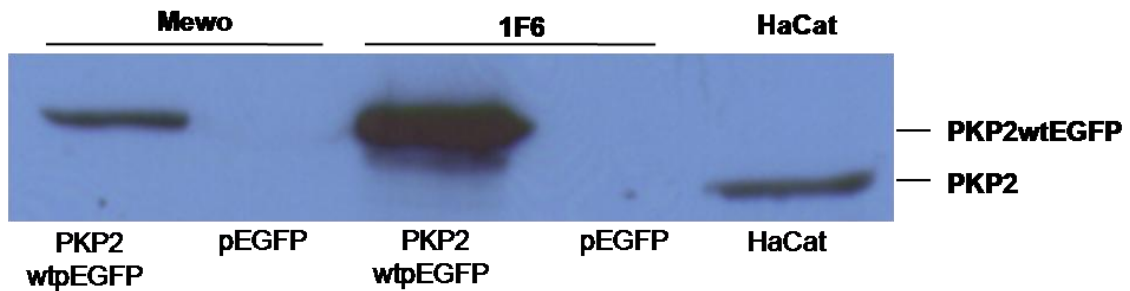


Abb. 3.15: Western-Blot der Überexpression von PKP2-wt-pEGFP und pEGFP in 1F6 und Mewo Melanomzellen

Der Western-Blot zeigt, dass in den Melanomzellen Mewo und 1F6 Plakophilin 2 nach Transfektion detektiert werden konnte. Die pEGFP transfizierten Kontrollen zeigen keine Plakophilin 2 Expression. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie HaCat, die Plakophilin 2 endogen exprimiert. Die unterschiedlichen Molekulargewichte sind bedingt durch den zusätzlichen EGFP-Tag.

Der in Abbildung 3.15 gezeigte Western-Blot zeigt die Expressionskontrolle von PKP2-wt-pEGFP in beiden Melanomzelllinien. Die detektierten Proteinbanden entsprechen dem Molekulargewicht von Plakophilin 2 und dem zusätzlichen EGFP. HaCat diente als Positivkontrolle für den mAk gegen Plakophilin 2. Weiterhin wurde die Transfektionseffizienz für PKP2-wt-DsRed mittels Immunfluoreszenz kontrolliert. Insgesamt zeigte sich, dass mit dem Plasmid EGFP die beste Transfektionseffizienz (50 %) erzielt werden konnte. Die Transfektionseffizienz der Plasmids DsRed lag bei 30 – 40 % (Daten nicht gezeigt).

1F6 Zellen, die mit PKP2-wt-pEGFP transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu den leervektortransfizierten 1F6 Zellen ein um 27 % geringeres invasives Wachstumsverhalten ($p=0,01$). Die mit EGFP-PKP2-wt transfizierten Mewo Zellen wiesen ein um 43 % geringeres invasives Wachstum im Vergleich zu den Leervektor transfizierten Mewo Zellen auf ($p=0,001$) (Abbildung 3.15).

3. Ergebnisse

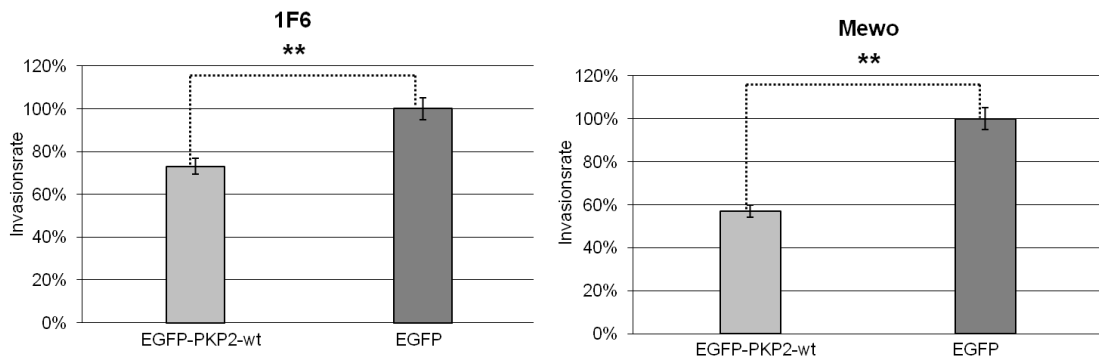


Abb. 3.16: Auswertung des *Invasionassay* nach Transfektion mit EGFP-PKP2-wt und EGFP

Die Abbildung zeigt, dass sich die Invasionsraten der EGFP-PKP2-wt transfizierten Melanomzellen und die Invasionsraten der Leervektor transfizierten Zellen signifikant unterscheiden. Die einfaktorische ANOVA ergab für 1F6 eine Signifikanz von $p = 0,01$ und für Mewo eine Signifikanz von $p = 0,001$.

Da das zur Auswertung verwendete Reagenz in einer ähnlichen Wellenlänge angeregt wurde und emittierte wie das Fluoreszenzprotein EGFP, war eine Interferenz beider nicht auszuschließen. Auf Grund dessen erfolgten Wiederholungen des Versuches mit dem in einer anderen Wellenlänge anzuregenden und emittierenden Fluoreszenzprotein *DsRed*.

Auch nach Transfektion der mit *DsRed* fusionierten Proteine zeigte sich für die Melanomzelllinie 1F6 eine signifikante Reduktion des invasiven Wachstums der Plakophilin 2 transfizierten Zellen gegenüber den Leervektor transfizierten Zellen (Abbildung 3.16). Die PKP2-wt-*DsRed* transfizierten Zellen wuchsen um 25% weniger invasiv als die Kontrollen. Für Mewo Melanomzellen war kein signifikanter Invasionsunterschied festzustellen.

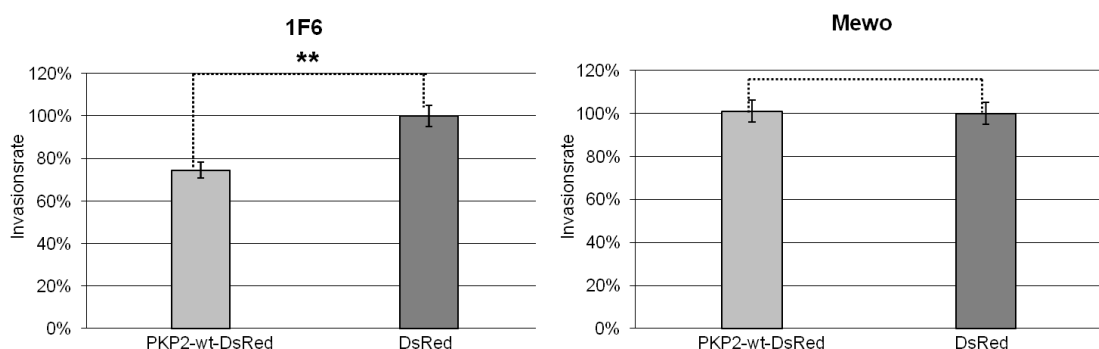


Abb. 3.17: Auswertung des *Invasionassay* nach Transfektion mit PKP2-wt-*DsRed* und *DsRed*

Die Abbildung zeigt einen signifikanten Unterschied der Invasionsraten der Melanomzellen 1F6 transfiziert mit PKP2-wt-*DsRed* und *DsRed* ($p = 0,00462$). Der Unterschied der Invasionsraten nach Transfektion mit PKP2-wt-*DsRed* oder *DsRed* für Mewo ist nicht signifikant ($p = 0,13$).

3. Ergebnisse

Ich konnte zeigen, dass die Überexpression von Plakophilin 2 in den Melanomzellen 1F6 und Mewo zu dramatischen Veränderungen der Zellmorphologie führt. Diese veränderte Morphologie geht einher mit Veränderungen des Aktinnetzwerkes und der Ausbildung von Zellausläufern und Filopodien. Trotz dieser Veränderungen war keine gerichtete Migration beziehungsweise eine Migration durch die Basalmembran nachweisbar.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Expression von Zell-Zell-Kontaktproteinen in Melanomzellen näher untersucht. Bei der Pathogenese maligner Melanome haben Störungen der Zell-Zell-Kontakte eine große Bedeutung. Den Cadherinen kommt hier eine zentrale Rolle zu. Neben der Expressionsanalyse der wichtigsten Cadherine wurde auch die Expression verschiedener *Armadillo-repeat*-Proteine in Melanomen untersucht. Dabei wurde die de novo Expression von Plakophilin 2 und Plakophilin 3 in einigen Melanomzellen gefunden, während p0071 teilweise weniger exprimiert war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die de novo Expression von Plakophilin 2 einen Einfluss auf die Zellmorphologie und das Aktinzytoskelett hat und damit das Tumorwachstum beziehungsweise die Tumorinvasivität beeinflussen könnte. Fluoreszenzanalysen zeigten, dass überexprimiertes Plakophilin 2 in den Melanomzellen Mewo und 1F6 einen *branching Phänotyp* induziert, ähnlich wie nach der Überexpression von p120ctn in NIH3T3 Zellen beschrieben wurde (Reynolds *et al.*, 1996). Abschließend wurde untersucht, ob der durch Plakophilin 2 induzierte *branching Phänotyp* mit einem veränderten Migrationsverhalten der Melanomzellen Mewo und 1F6 einhergeht.

4.1 Expression der Cadherine in Melanomzellen

E-Cadherin und P-Cadherin sind die zentralen Zell-Zell-Kontaktproteine zwischen Keratinozyten und Melanozyten (Tang *et al.*, 1994; Nishimura *et al.*, 1999). Während der Melanomentstehung kommt es zu einer Reduktion bzw. zu einem völligen Fehlen der E-Cadherin Expression (Sanders *et al.*, 1999), was ein unkontrolliertes Zellwachstum ermöglicht (Hsu *et al.*, 1996; Poser *et al.*, 2001). Der Verlust von E-Cadherin im Rahmen der Tumorgenese konnte unter anderem auf die vermehrte Expression seines Repressors *snail* zurückgeführt werden (Poser *et al.*, 2001). Reexpressionsexperimente zeigten, dass die Expression von E-Cadherin in Melanomzellen die Wachstumskontrolle durch die Keratinozyten reaktiviert und die Expression invasionsassoziiierter Adhäsionsrezeptoren abnimmt, weswegen E-Cadherin eine Tumorsupressorfunktion zugesprochen wurde (Hsu *et al.*, 2000b). Durch das Fehlen von E-Cadherin können sich die Melanozyten der Kontrolle durch die Keratinozyten entziehen (Tang *et al.*, 1994). An Stelle von E-Cadherin wird N-Cadherin exprimiert, was der Melanomzelle neue Interaktionsmöglichkeiten mit Fibroblasten und

Endothelzellen eröffnet und so die epitheliale-mesenchymale Transition ermöglicht (Li *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2005). Die Kohortenstudien von G.M. Kreizenbeck und Kollegen, in der die Expression der klassischen Cadherine und die der intrazellulären Adapterproteine α -Catenin, β -Catenin und p120^{ctn} in 475 primären und metastasierten Melanomen untersucht und ausgewertet wurde, zeigte, dass der E-Cadherin Verlust mit einer schlechten Prognose einhergeht. Für N-Cadherin hingegen zeigten die Autoren, dass dessen Überexpression einerseits für eine erfolgreiche epitheliale-mesenchymale Transition spricht oder aber hinweisend auf einen gut differenzierten Tumor der Neuralleiste sein kann (Kreizenbeck *et al.*, 2008).

Die von mir untersuchten Melanomzellen zeigten keine einheitliche Expression der klassischen Cadherine. Die Melanomzelllinien HT144 und MM1, Metastase eines malignen Melanoms und Primärtumor, exprimierten N-Cadherin auf einem hohen Niveau. Die Zelllinien MV3 und Bro, ebenfalls Metastase eines malignen Melanoms bzw. Primärtumor, zeigten keine N-Cadherin Expression. Hsu *et al.* (1996) beschrieben das Fehlen von E-Cadherin in 15 der 16 getesteten Zelllinien und die fehlende Expression von P-Cadherin in allen untersuchten Melanomzelllinien. Seline und Norris beobachteten ebenfalls den Verlust von E- und P-Cadherin in Melanomzellen und korrelierten diesen mit einem fortschreitenden Krankheitsstadium (Seline *et al.*, 1996). Bestätigt wurde dies durch die Ergebnisse von Van Marck *et al.* (2005), die zeigten, dass die De novo Expression von P-Cadherin in den Melanomzelllinien BLM und HMB2 einen ausgeprägt antiinvasiven Effekt hat.

Neben der Expression von N-Cadherin konnten in beiden Melanomzelllinien HT144 und MM1 auch E-Cadherin und P-Cadherin detektiert werden (Abb. 3.1 und 3.2). Die Expression von E-Cadherin lag in den Melanomzellen deutlich unter der in den Melanozyten. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte jedoch gezeigt werden, dass auch in den Melanomzellen neben einer zytoplasmatischen Lokalisation von E-Cadherin eine Lokalisation im Bereich der Zell-Zell-Kontaktregion vorlag (Abb. 3.1C). P-Cadherin wurde von beiden Melanomzelllinien auf einem höheren Niveau exprimiert als in den untersuchten Melanozyten (Abb. 3.2A). In beiden Melanomzelllinien konnte eine membranassoziierte Lokalisation mit einer Anreicherung im Bereich der Zell-Zell-Kontaktregionen gezeigt werden (Abb. 3.3C).

Die gezeigte Expression von E- und P-Cadherin in den Melanomzelllinien HT144 und MM1 kann im Sinne der Ergebnisse von Hsu *et al.* (1996) als Hinweis auf eine Reduktion der Invasivität gewertet werden. Van Marck *et al.* zeigten jedoch, dass die Expression von P-Cadherin in Mewo Zellen nicht zu einer Reduktion der Invasivität führte und folgerten, dass andere Mechanismen den antiinvasiven Effekt von P-Cadherin aufhoben (Van Marck *et al.*, 2005). Zur detaillierten Untersuchung des

Effektes von endogenem E-Cadherin auf die Invasivität in den hier untersuchten Melanomzelllinien HT144 und MM1, muss die Invasivität nach Transfektion mit si-RNA gegen E-Cadherin untersucht werden.

Die von mir gezeigte heterogene Expression der Cadherine in den untersuchten Melanomzelllinien lässt den Schluss zu, dass der in der Literatur beschriebene *Cadherin-Switch* (Li *et al.*, 2001) im Rahmen der Melanomentstehung nicht obligat ist oder zumindest nicht unidirektional. Gestützt wird diese These von immunhistochemischen Untersuchungen, die zeigten, dass auch in primären Melanomen und in Metastasen von Melanomen E-Cadherin exprimiert wurde, wohingegen wenig oder gar kein N-Cadherin detektiert werden konnte (Danen *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1996; Silye *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 1999).

Die Koexpression aller drei klassischen Cadherine in den Melanomzelllinien HT144 und MM1 und die mit Hilfe der Immunfluoreszenzuntersuchungen gezeigte Lokalisation der klassischen Cadherine an der Zellmembran und im Bereich der Zell-Zell-Kontaktregionen führten zu der Frage, ob neben den homophilen Cadherin-Cadherin Interaktionen auch andere Interaktionen der Cadherine möglich sind. Die Koexpressionen aller drei klassischen Cadherine wurden auch für die Melanomzelllinie WM35 (primäres Melanom der Haut) beschrieben (Schmitt *et al.*, 2007). Mittels Immunoblot Analysen zeigten Schmitt und Kollegen für die Melanomzelllinien Malme-3M (Lungenmetastase) und SL-Mel-2 (Hautmetastase) die Koexpression von E- und P-Cadherin und für die Melanomzelllinie C32 (primäres amelanotisches Melanom der Haut) eine Koexpression von E- und N-Cadherin. Sie zeigten weiter, dass E- und P-Cadherin in Lysaten der Melanomzelllinie WM 35 coimmunopräzipitierten und schlussfolgerten auf die Existenz heterotypischer E- und P-Cadherin Komplexe in der Melanomzelllinie WM35. Heterotypische E- und N-Cadherin Komplexe wurden von Omelchenko *et al.* (2001) und Volk *et al.* (1987) beschrieben, die Epithelzellen und Fibroblasten bzw. Linsen- und Leberzellen kokultivierten. Mit E- oder P-Cadherin transfizierte L-Zellen bildeten E-P-Heterocadherine Zellkontakte (Duguay *et al.*, 2003; Foty und Steinberg, 2005). E- und P-Cadherin cis-Heterodimere wurden in der Karzinomzelllinie A431 beschrieben. Das in der Literatur beschriebene Vorkommen heterocadheriner Zell-Zell-Kontakte konnte in der vorliegenden Arbeit letztlich nicht nachgewiesen werden. Die Detektion aller drei klassischen Cadherine an der Zellmembran mit einer Anreicherung im Bereich der Zell-Zell-Kontaktregionen kann jedoch als Hinweis auf das Vorliegen solcher Kontakte in Monokulturen der Melanomzelllinien MM1 und HT144 gewertet werden.

4.2 Expression der Armadillo-repeat Proteine in Melanomzellen

4.2.1 p120^{ctn} Expression in Melanomzellen

p120^{ctn} interagiert via seiner Armadillo-Domäne direkt mit der juxtamembranären Domäne der Cadherine (Reynolds *et al.*, 1994; Daniel und Reynolds, 1995; Shibamoto *et al.*, 1995; Staddon *et al.*, 1995) und steuert so das *Cadherin-Clustering* an der Membran und hierrüber die Stärke der Zell-Zell-Adhäsion (Calkins *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2003; Hatzfeld *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2004). Nicht Cadherin gebundenes p120^{ctn} interagiert mit den Rho GTPasen, die Funktionen in der Regulation des Aktinzytoskeletts haben (Anastasiadis *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001). Die Rho GTPasen RhoA, Rac 1 und cdc42 sind die am intensivsten untersuchten Mitglieder dieser Proteinfamilie. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von RhoA zu einer vermehrten Bildung kontraktile Aktinfasern führt. In der Zelle werden diese dann als Stressfasern oder kontraktile Ring beschrieben (Ridley und Hall, 1992; Glotzer, 2005). Aktiviertes Rac 1 führt zur Ausbildung von Lamellipodien (Ridley *et al.*, 1992). Cdc42 induziert die Ausbildung von Filopodien (Kozma *et al.*, 1995; Nobes und Hall, 1995).

Reynolds und Kollegen zeigten 1996, dass die Überexpression von p120^{ctn} in Fibroblasten, vermittelt durch die Inhibition von RhoA, den sogenannten *branching Phänotyp* induziert. Der *branching Phänotyp* ist charakterisiert durch die Ausbildung langer Zellausläufer, die an Filopodien und Dendriten erinnern (Reynolds *et al.*, 1996). Wegen mehrerer translationsinitiation-Codons und des alternativen Splicings existieren verschiedene p120^{ctn} Isoformen (Mo und Reynolds, 1996; Keirsebilck *et al.*, 1998). Aho und Kollegen zeigten, dass die lange Isoform 1A vorwiegend in Melanozyten und Melanomen detektiert werden kann. Keratinozyten hingegen exprimieren vermehrt die Isoform 3A. Die Isoform 4A konnte in normalen Keratinozyten und Melanozyten detektiert werden, wurde jedoch in Plattenepithelkarzinomen und Melanomen nicht exprimiert (Aho *et al.*, 2002). Die von mir untersuchten Melanomzellen exprimierten die p120^{ctn} Isoformen 1A und 3A, genau wie die Melanozyten (Abb. 3.4). Spezifische Funktionen konnten den Isoformen nicht zugeordnet werden. Es zeigte sich jedoch, dass nur die Isoformen 1A, 2A und 3A die Fähigkeit besitzen, den *branching Phänotyp* auszulösen. Die Isoform 4A kann den *branching Phänotyp* nicht auslösen (Aho *et al.*, 2002). Liu und Kollegen zeigten einen unterschiedlichen Effekt der p120^{ctn} Isoformen 1A und 3A auf die Regulation der Adhäsion, Proliferation und Invasivität (Liu *et al.*, 2009).

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten neben einer membrangebundenen auch eine zytoplasmatische Lokalisation von p120^{ctn}, wobei insbesondere für die Melanomzellen MM1 und HT144 auffiel, dass die Zell-Zell-Kontakt assoziierte Membranlokalisation mit einer reduzierten zytoplasmatischen Lokalisation einherging (Abb. 3.4B). In Kolonkarzinomzellen, die mit TGF- β und TNF- α behandelt waren, konnte gezeigt werden, dass die Induktion der epithelialen-mesenchymalen Transition mit einer gesteigerten p120^{ctn} Lokalisation im Zytoplasma, der gesteigerten Bildung von p120^{ctn}/Rho A Komplexen und mit einer Reduktion der Rho A Aktivität einhergeht (Bellocin *et al.*, 2005). Ausgehend von dem Modell einer regulatorischen Interaktion zwischen p120^{ctn} und den klassischen Cadherinen und zwischen p120^{ctn} und den Rho GTPasen (Noren *et al.*, 2000), kann für die Melanomzellen MM1 und HT144 gefolgert werden, dass die Expression aller drei klassischen Cadherine mit einer Rekrutierung von p120^{ctn} an die Zellmembran einhergeht. Die Frage nach einer Steigerung oder Reduktion der Motilität kann jedoch nicht abschließend geklärt werden, denn Yanagisawa und Kollegen zeigten, dass die Bindung von p120^{ctn} an mesenchymale Cadherine zu einer Aktivierung von Rac1 und cdc42 und hierdurch zu einer Steigerung der Motilität führt (Yanagisawa und Anastasiadis, 2006).

Die Plakophiline 1, 2 und 3 wurden initial als desmosomale Proteine beschrieben mit einer stabilisierenden Funktion im desmosomalen Plaques (Hatzfeld *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 1996; Bonne *et al.*, 1999; Hatzfeld, 1999; Kowalczyk *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Bonne *et al.*, 2003). Für die Plakophiline 1 und 2 wurden außerdem eine zytoplasmatische Lokalisation und eine Kernlokalisation beschrieben (Mertens *et al.*, 1996). Für Plakophilin 3 konnte bisher keine Kernlokalisation gezeigt werden. Die detaillierten Kernfunktionen sind bis heute weitgehend unklar und bedürfen weiterer Untersuchungen. Aufgrund der Lokalisation der Plakophiline 1 und 2 im Zellkern, der direkten Assoziation mit dem Initiationsfaktor eIF4A (Wolf *et al.*, 2010 a; Wolf und Hatzfeld, 2010 b), der Interaktion von Plakophilin 2 mit β -Catenin (Chen *et al.*, 2002) und der RNA-Polymerase III Untereinheit (Mertens *et al.*, 2001) und der Interaktion von Plakophilin 3 mit den RNA Bindeproteinen PABPC1, G3BP und FXR1 (Hofmann *et al.*, 2006) musste eine regulatorische Funktion im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion, der Transkription oder der Translation angenommen werden (Wolf *et al.*, 2010 a; Wolf und Hatzfeld, 2010 b). Neben der Möglichkeit einer Einflussnahme der Plakophilin Expression auf die Motilität (Schwarz *et al.*, 2006; Schmitt *et al.*, 2007; Kundu *et al.*, 2008) ergibt sich also eine weitere, weitgehend unklare Einflussnahme mittels der

Funktionen im Rahmen der Translation bzw. Transkription (Wolf *et al.*, 2010 a; Wolf und Hatzfeld, 2010 b) oder über die Rho-GTPasen.

4.2.2 Plakophilin 1

Plakophilin 1 wurde in einer 2010 von Wolf und Kollegen veröffentlichten Arbeit als Bestandteil des mRNA *Cap*-bindenden Translationsinitiationskomplexes beschrieben. Sie zeigten eine direkte Interaktion mit eIF4A1, wobei Plakophilin 1 nicht nur dessen Rekrutierung an den Komplex, sondern auch die Helikaseaktivität stimuliert (Wolf und Hatzfeld, 2010 b). Sobolik-Delmaire und Kollegen zeigten in ihrer 2010 veröffentlichten Arbeit, dass Plakophilin 1 im Zellkern lokalisiert und hier mit einzelsträngiger DNA interagiert. Weiter zeigten sie, dass Plakophilin 1 nach Behandlung mit DNA schädigenden Substanzen im Nukleolus akkumuliert und schlossen auf eine mögliche Funktion nach DNA Schädigungen (Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010). Üblicherweise wird Plakophilin 1 in den Keratinozyten suprabasaler Schichten exprimiert (Hatzfeld *et al.*, 2000). Die Intensität der Plakophilin 1 Expression korreliert hier mit der Anzahl und Größe der Desmosomen, weswegen in diesem Fall auf eine regulatorische Beeinflussung der Größe und Funktionalität der Desmosomen geschlossen werden kann (Hatzfeld, 2007). Melanozyten lokalisieren in den basalen Schichten der Epidermis und interagieren mit den Keratinozyten. In der vorliegenden Arbeit konnte Plakophilin 1 weder in den untersuchten Melanozyten noch in den Melanomzellen nachgewiesen werden. Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Melanomzelllinien lassen also den Schluss zu, dass Plakophilin 1 im Rahmen der Melanomentstehung keine Rolle spielt, weder als Tumorsuppressor, noch als Onkogen. Letztlich müssen jedoch immunhistochemische Untersuchungen diese These untermauern. Besondere Aufmerksamkeit gilt hierbei der Präparation (Permeabilisierung und Fixierung), um das zytoplasmatische und das im Zellkern befindliche Plakophilin detektieren zu können.

4.2.3 Plakophilin 2

Plakophilin 2, das in den untersuchten normalen humanen Melanozyten nicht detektiert werden konnte, wurde von den Melanomzellen HT144 und MM1 exprimiert. Bereits eine frühere Arbeit von Schmidt und Kollegen zeigte eine Plakophilin 2 Expression in der Melanomzelllinie WM-115 (Schmitt *et al.*, 2007). Meine qualitative Analyse der endogenen Plakophilin 2 Expression zeigte weiter, dass Plakophilin 2 in den Melanomzellen MM1 und HT144 diffus zytoplasmatisch und im Zellkern lokalisierte (Abb.: 3.5), was den bereits von Mertens für andere Zellen beschriebenen Lokalisationen entspricht (Mertens *et al.*, 1996; Mertens *et al.*, 1999). Neben den genannten Lokalisationen konnte Plakophilin 2 auch an der Spitze von Lamellipodien und Filopodien (Abb. 3.5) detektiert werden, was die Frage aufwarf, ob Plakophilin 2 in die lokale Adhäsion von Lamellipodien und Filopodien involviert ist und so das Invasionsverhalten beeinflusst. Eine Zellmembran assoziierte Plakophilin 2 Lokalisation und eine Lokalisation an Filopodien und Lamellipodien wurden bereits immunhistochemisch in Adenokarzinomen, duktalem Pankreaskarzinomen und Gallenblasenkarzinomen beschrieben (Mertens *et al.*, 1999). Für die Gliom Zelllinie U333 wurde elektronenmikroskopisch eine membrannahe Plakophilin 2 Lokalisation beschrieben (Boda-Heggemann, 2006). Eine immunhistochemische Untersuchung der Plakophilin 2 Lokalisation in Melanomen war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich und bedarf einer weiteren, detaillierten Untersuchung.

Wie eingangs beschrieben, wurden in den Melanomzellen MM1 und HT144 auch alle drei klassischen Cadherine im Bereich der Zellmembran detektiert. Typischerweise werden in Melanozyten keine Desmosomen nachgewiesen. Allenfalls werden in Melanomzellen einzelne desmosomale Proteine exprimiert. Eine Ausnahme stellt Plakoglobin dar, das regelmäßig in Melanomzellen detektiert wird (Daten nicht gezeigt) (Schmitt *et al.*, 2007). Neben seiner Interaktion mit Desmoglein 1 interagiert Plakoglobin auch mit den klassischen Cadherinen. Ihm kommt eine zentrale Funktion im *Cross-talk* zwischen Adhärenzkontakten und Desmosomen zu (Lewis *et al.*, 1997). In Anbetracht der zellmembranassoziierten Lokalisation von Plakophilin 2 in den Melanomzellen MM1 und HT144 stellte sich die Frage, ob Plakophilin 2 auch mit den klassischen Cadherinen interagiert. Diesbezüglich existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben. In einer Arbeit aus dem Jahr 2002 konnte in transient transfizierten COS Zellen keine Kopräzipitation von Plakophilin 2 und den Adhärenzverbindungskomponenten α -Catenin und E-Cadherin nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2002). Die in dieser Arbeit gezeigte direkte Interaktion von Plakophilin 2

mit β -Catenin und Plakoglobin eröffnete jedoch die Möglichkeit einer indirekten Interaktion von Plakophilin 2 mit Proteinen der Adhärenzverbindungen und somit eine mögliche Funktion im *Cross-talk* zwischen den Adhärenzkontakten und den Desmosomen (Chen *et al.*, 2002). Spätere Arbeiten zeigten eine direkte Interaktion von Plakophilin 2 mit Komponenten der Adhärenzkontakte. Immunfluoreszenzuntersuchungen der Meningeomzelllinie HBL-52 zeigten eine Kolokalisation von Plakophilin 2 mit E-Cadherin und N-Cadherin (Akat *et al.*, 2008; Rickelt *et al.*, 2009). In der Gliomzelllinie U333 wurde Plakophilin 2 nachgewiesen, ohne dass desmosomale Proteine nachgewiesen werden konnten. Zudem wurde gezeigt, dass Plakophilin 2 mit N-Cadherin und VE-Cadherin co-immunopräzipitiert (Boda-Heggemann, 2006). Akat und seine Kollegen schlussfolgerten, in der Meningeomzelle HBL-52 einen neuartigen Junctionstyp entdeckt zu haben, der sich aus E-Cadherin (gelegentlich N-Cadherin), α -Catenin, β -Catenin, Plakoglobin, p120^{ctn} und Plakophilin 2 zusammensetzt (Akat *et al.*, 2008). Rickelt und Kollegen zeigten, dass Plakophilin 2 in Adhärenzkontakten normaler mesenchymaler Zellen und in Tumorzellen nachweisbar war. Sie schlussfolgerten, dass Plakophilin 2 die Stabilität von Adhärenzkontakten positiv beeinflusst (Gerull *et al.*, 2004; Rickelt *et al.*, 2009). Die Koexpression von Plakophilin 2, E-, N- und P-Cadherin, Plakoglobin (Daten nicht gezeigt) und p120^{ctn} lässt die Annahme zu, dass auch in den Melanomzellen HT144 und MM1 ein Junctionstyp, ähnlich dem der Meningeomzelllinie HBL-52 (Akat *et al.*, 2008) vorliegen kann. Eine abschließende Klärung dieser Frage kann jedoch erst nach weiteren Untersuchungen erfolgen. Immunfluoreszenzuntersuchungen können Aufschluss geben, ob die koexprimierten Proteine auch kolokalisieren. Im Weiteren muss dann analysiert werden, ob eine direkte Interaktion zwischen Plakophilin 2 und den klassischen Cadherinen nachgewiesen werden kann.

Neben der zytoplasmatischen und der membranassoziierten Lokalisation konnte endogenes Plakophilin 2 auch im Zellkern der Melanomzellen MM1 und HT144 nachgewiesen werden (Abb.: 3.5). Überexprimiertes Plakophilin 2 wurde nicht sicher im Zellkern nachgewiesen (Abb. 3.9 und 3.10). In ihrer 2001 veröffentlichten Arbeit zeigten Mertens und Kollegen, dass Plakophilin 2 im Zellkern mit der größten Untereinheit der RNA Polymerase III (RPC155) kolokalisiert (Mertens *et al.*, 2001). Die Kernlokalisierung von Plakophilin 2 wird durch die Cdc42C assoziierte Kinase 1 (C-TAK 1) reguliert, wobei die Phosphorylierung von Plakophilin 2 die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen steigert, was eine Akkumulation im Zellkern verhindert (Müller *et al.*, 2003). Neben der Funktion von Plakophilin 2 im Zellkern, die in den nächsten Jahren sicherlich noch detailliert analysiert werden wird, kommt Plakophilin 2 eine Funktion im

Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion zu. Diese ist vermittelt durch die Interaktion von Plakophilin 2 mit β -Catenin, einem *Armadillo-repeat* Protein, das an die Catenin-Bindungs-Domäne von E-Cadherin bindet und dieses mit dem Aktinbindeprotein α -Catenin verbindet (Jou *et al.*, 1995), zudem aber auch ein Effektor im kanonischen Wnt-Signalweg ist (Willert und Nusse, 1998; Wodarz und Nusse, 1998). Plakophilin 2 konkurriert mit E-Cadherin um zytoplasmatisches β -Catenin und verstärkt den β -Catenin/TCF Signalweg (Chen *et al.*, 2002). Godsel und Kollegen zeigten 2010, dass Plakophilin 2 in verschiedenen Signalkaskaden (Rho A und PKC α), die zur Ausbildung von Desmosomen führen, eine regulatorische Funktion hat (Godsel *et al.*, 2010). Die nukleäre und membranassoziierte Expression von Plakophilin 2 in den Melanomzellen MM1 und HT144 lässt somit keinen Schluss auf die Funktion zu. Zusammengenommen sind die Möglichkeiten der Einflussnahme zu vielfältig, als dass alleine auf Grund der Expression oder der Lokalisation auf eine Funktion geschlossen werden kann. Auch gegensätzliche Funktionen, im Sinne eines Tumorsuppressors durch eine Steigerung der Adhäsion oder eines Tumorpromotors durch die Modulation intrazellulärer Signalkaskaden sind möglich.

4.2.4 Plakophilin 3

Wie die Plakophiline 1 und 2 lokalisiert auch Plakophilin 3 an Desmosomen. Für Plakophilin 3 konnte das größte Spektrum der möglichen desmosomalen Bindungspartner gezeigt werden. Der Verlust der Plakophilin 3 Expression geht mit einer Instabilität der Desmosomen und einer gesteigerten Migrationsfähigkeit einher (Bonne *et al.*, 1999; Bonne *et al.*, 2003; Kundu *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der Plakophilin 3 Expression das Metastasierungspotential steigert (Kundu *et al.*, 2008).

Plakophilin 3 wurde in sechs der in meiner Arbeit untersuchten Melanomzellen de novo synthetisiert und lokalisierte vorwiegend diffus zytoplasmatisch. Eine membranassoziierte Lokalisation war zum Teil im Bereich der Zell-Zell-Kontaktregionen zu beobachten (Abb. 3.6). In Anbetracht des physiologischen Fehlens von Desmosomen in Melanozyten stellte sich die Frage nach der Funktion von Plakophilin 3 in Melanomzellen und Metastasen von Melanomen. Furukawa und Kollegen beschrieben, dass Plakophilin 3 in der Mehrzahl der von ihnen untersuchten Lungenkarzinome (NSCLC) überexprimiert war (2005). Sie beschrieben weiter, dass eine Reduktion der Plakophilin 3 Expression mit Hilfe von siRNA das Zellwachstum signifikant reduzierte. In COS-7 Zellen führt die stabile Plakophilin 3 Überexpression zu einer gesteigerten Invasion im *Matrigel* Assay. Zudem zeigten diese Zellen einen durch

die Ausbildung vieler Membranausstülpungen charakterisierten Phänotyp. In den Enden dieser Membranausstülpungen kam es zu einer Akkumulation von Plakophilin 3 (Furukawa *et al.*, 2005). Schwarz und Kollegen zeigten immunhistochemisch eine gesteigerte Plakophilin 3 Expression in Adenokarzinomen des Kolon, Pankreas und der Prostata, wohingegen in oropharyngealen Tumoren die Abnahme der Plakophilin 3 Menge mit dem Grad der Dedifferenzierung einherging (Schwarz *et al.*, 2006). In der Literatur wurden sowohl die Steigerung (Furukawa *et al.*, 2005) als auch die Reduktion (South *et al.*, 2003; Kundu *et al.*, 2008) der Plakophilin 3 Expression mit einer erhöhten Invasivität assoziiert. Eine einheitliche Funktion von Plakophilin 3 im Rahmen der Tumorgenese lässt sich also nicht ableiten. Vielmehr muss angenommen werden, dass die Funktion von Plakophilin 3 Kontext abhängig ist. Es ist also zunächst zu klären, welche Rolle Plakophilin 3 im Rahmen der Regulation der intrazellulären Signalwege hat. Eine Funktion in der post-transkriptionellen Genregulation wird angenommen (Hofmann *et al.*, 2006). Wolf und Kollegen zeigten weiter, dass neben Plakophilin 1 auch Plakophilin 3 die Translation stimuliert (Wolf und Hatzfeld, 2010 b).

4.2.5 p0071

p0071 wurde in allen untersuchten Melanomzellen und in den Melanozyten detektiert. Die Melanomzelllinien MM1 und HT144 exprimierten p0071 entsprechend dem Niveau der Melanozyten, die übrigen Melanomzelllinien exprimierten zum Teil deutlich weniger p0071. Die intrazelluläre Lokalisation unterschied sich nicht. In allen Melanomzellen und in den Melanozyten konnte eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation gezeigt werden. Vereinzelt zeigte sich eine Akkumulation in Bereichen vermutlicher Zell-Zell-Kontakte.

Hatzfeld und Kollegen beschrieben 1996, dass p0071 zelltypenabhängig mit klassischen und desmosomalen Cadherinen interagieren kann (Hatzfeld und Nachtsheim, 1996). In einer späteren Arbeit konnte die Interaktion mit desmosomalen Cadherinen der N-Terminalen Kopfdomäne und die mit klassischen Cadherinen der *Armadillo-repeat* Domäne zugeordnet werden (Hatzfeld *et al.*, 2003). Eine Untersuchung des zytoplasmatischen p0071 zeigte eine Assoziation zu Rho A und eine Regulation von Rho A im Rahmen der Zytokinese. Die Überexpression und die Repression von p0071 verursachten jeweils einen Zytokinesedefekt, ausgehend von einer Vielkernigkeit der betroffenen Zellen (Wolf *et al.*, 2006; Keil *et al.*, 2007). Mehrkernige Zellen konnte ich unter den Melanomzellen nicht regelhaft beobachten. Vereinzelt fielen in den Zelllinien MV3 und Bro mehrkernige Zellen auf. Auch im Fall von p0071 stellt sich die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Expression bzw. Reexpression von E- und P-Cadherin und der hohen Expression von p0071 in den

Melanomzelllinien MM1 und HT144 besteht. Nur für die Melanomzelllinie HT144 konnte vereinzelt eine Akkumulation von p0071 im Bereich der Zell-Zell-Kontaktregionen gezeigt werden. In der Mehrzahl der Untersuchungen zeigte sich eine diffus zytoplasmatische Anfärbung des p0071. Eine Möglichkeit wäre, dass E- und P-Cadherin die Expression von p0071 anregen, mit dem Ziel der Adhäsionsverstärkung. Diese Vermutung bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, zumal die Funktion von p0071 innerhalb der intrazellulären Signalkaskaden weitgehend ungeklärt ist, mit Ausnahme der oben genannten Regulation von Rho A.

4.3 Zellmorphologische Veränderungen nach Expression von exogenem Plakophilin 2

Zur Untersuchung des Einflusses von Plakophilin 2 auf die Zellmorphologie wurden die Melanomzelllinien Mewo und 1F6 ausgewählt, da beide als einzige Melanomzelllinien weder Plakophilin 1 noch Plakophilin 3 exprimierten und somit der Effekt von Plakophilin 2 untersucht werden konnte. Beide Melanomzellen exprimierten zudem nur N-Cadherin und das auf niedrigen Niveau, was eine Untersuchung der zytoplasmatischen Funktion bzw. der Funktion im Rahmen der Signaltransduktion ermöglichte.

Ich konnte zeigen, dass die Expression von exogenem Plakophilin 2 in den Melanomzellen Mewo und 1F6 die Ausbildung des *branching Phänotyps* zur Folge hatte (Abbildung 3.9). Der *branching Phänotyp* wurde erstmals nach der Überexpression von p120^{ctn} in NIH3T3 und anderen fibroblastischen Zelllinien beschrieben (Reynolds *et al.*, 1996). In meiner Untersuchung trat der *branching Phänotyp* nicht in allen Plakophilin 2 transfizierten Zellen auf (Abbildung 3.12) und war in seiner Ausprägung abhängig von der Menge des exprimierten Plakophilin 2. Der Anteil der transfizierten Zellen, die den *branching Phänotyp* exprimierten, nahm mit der Zeit ab (Abb. 3.12), wobei die Transfektion zu einem vektorunabhängigen, vermehrten Ablösen der transfizierten Zellen führte. Auch nach der Überexpression von p120^{ctn} wurde die Ausbildung des *branching Phänotyps* als zeitabhängig beschrieben. Wobei hier weniger die Zeit bis zur Abnahme des Effekts, sondern vielmehr die Zeit bis zum Eintreten der vollen Ausprägung des *branching Phänotyp* von Interesse war (Aho *et al.*, 2002). Eine stabile Expression von exogenem Plakophilin 2 in den Melanomzellen 1F6 und Mewo ist im Rahmen der Arbeit nicht gelungen. Plakophilin 2 ist somit ein weiteres Mitglied der Familie der *Armadillo-repeat* Proteine mit der Fähigkeit den *branching Phänotyp* zu induzieren. Auch δ -Catenin, ebenfalls ein Mitglied der p120^{ctn} Superfamilie, induziert den *branching Phänotyp* in 3T3 Zellen und primären

hippocampalen Neuronen (Kim *et al.*, 2002). Martinez und Kollegen untersuchten die Expression von δ -Catenin in neuronalen Zellen weiter und zeigten, dass δ -Catenin in die Steuerung der Neuritenelongation und des Neuritenbranching involviert ist (Martinez *et al.*, 2003). Die Plakophiline 1 und 3 besitzen die Fähigkeit den *branching Phänotyp* auszulösen nicht. Die Überexpression der *Armadillo-repeat* Domäne von Plakophilin 1 in HaCat und HeLa Zellen induziert ebenfalls morphologische Veränderungen, die jedoch nicht mit den von Plakophilin 2 induzierten morphologischen Veränderungen zu vergleichen sind (persönliche Mitteilung von Frau Prof. Hatzfeld). Neben der Ausbildung des *branching Phänotyps*, dem die Inhibition von Rho A zugrunde liegt (Anastasiadis *et al.*, 2000), regulierte p120^{ctn} über die Rho-Kinasen die Zellmotilität (Grosheva *et al.*, 2001). Zusammengefasst sind die Rho-Kinasen Rho A, Rac 1 und Cdc42 die Schlüsselproteine zur Regulation von Adhäsion und Motilität. Die Aktivierung von Rac 1 und Cdc42 hat die Ausbildung von Lamellipodien bzw. Filopodien und eine gesteigerte Motilität zur Folge, wohingegen die Aktivierung von Rho A die Ausbildung von Stressfasern und fokaler Adhäsionskontakte zur Folge hat und somit die Motilität reduziert (Nobes und Hall, 1995). Die von mir beobachteten morphologischen Veränderungen wurden bereits in einer nicht veröffentlichten Arbeit von Chen und Hatzfeld beschrieben. Sie beobachteten nach Überexpression von Plakophilin 2 in COS Zellen eine „dramatische Veränderung der Zellgestalt“, die mit dem Zerreißen von Aktinfilamenten einhergeht, wohingegen das mikrotubuläre System unbeeinträchtigt bleibt. Der *branching Phänotyp*, dem die genannten Veränderungen der Zellgestalt entsprechen, konnte ihren Ergebnissen nach von keinem der anderen Plakophiline induziert werden. Entgegen den Beobachtungen von Anastasiadis und Kollegen, die den *branching Phänotyp* auf die Inhibition der Aktivität von Rho A durch p120^{ctn} zurückführten und zeigten, dass die Koexpression von dominant aktivem Rho A die Fähigkeit von p120^{ctn} den *branching Phänotyp* zu induzieren, verhindert (Anastasiadis *et al.*, 2000), erkannten Chen und Hatzfeld, dass der von p120^{ctn} und Plakophilin 2 induzierte *branching Phänotyp* in COS Zellen durch die Koexpression von Cdc42 und nicht Rho A inhibiert wurde. Daher schlossen sie auf eine Zelltyp spezifische Modulation der Rho-GTPasen. Welcher Mechanismus in den von mir untersuchten Melanomzellen zur Ausbildung des *branching Phänotyp* geführt hat, bleibt zunächst unklar und bedarf einer weiteren Klärung. Der *branching Phänotyp* selbst kann auch durch die Expression von Cadherinen unterdrückt werden, die dann zytoplasmatisches p120^{ctn} an die Membran rekrutieren (Anastasiadis *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001). Ob die Koexpression von Cadherinen den durch die Überexpression von Plakophilin 2 induzierten *branching Phänotyp* ebenfalls unterdrücken kann, ist letztlich nicht klar. Die endogenen Plakophilin 2 und alle

klassischen Cadherine exprimierenden Melanomzellen MM1 und HT144 zeigten nicht die morphologischen Veränderungen, die nach der Überexpression von Plakophilin 2 in den Melanomzellen 1F6 und Mewo auftraten, was unter anderem dem Expressionslevel von Plakophilin 2 zu schulden ist. Die qualitative Untersuchung der Plakophilin 2 Lokalisation in den Melanomzellen MM1 und HT144 zeigte lange Filopodien, an deren Spitze Plakophilin 2 lokalisierte (Abbildung 3.5). Die gezeigte, direkte Interaktion zwischen Plakophilin 2 und den klassischen Cadherinen (Gerull *et al.*, 2004; Boda-Heggemann, 2006; Rickelt *et al.*, 2009) erlaubt die Vermutung eines ähnlichen Effekts. Zur weiteren Klärung müsste in den endogen Plakophilin 2 exprimierenden Melanomzellen MM1 und HT144 die endogene Cadherinexpression (E-, N- und P-Cadherin) blockiert werden oder E-Cadherin und Plakophilin 2 müssten in den Melanomzellen 1F6 und Mewo koexprimiert werden.

4.4 Veränderungen des Aktinnetzwerks nach Expression von exogenem Plakophilin 2

Neben den phänotypischen Veränderungen zeigten transfizierte 1F6 Zellen auch strukturelle Veränderungen des Aktinnetzwerkes. Während native 1F6 Zellen ein gut strukturiertes Aktinnetzwerk (Stressfasern) zeigten (Abb. 3.8a), fiel in den Plakophilin 2 transfizierten Zellen eine Desorganisation des Aktinnetzwerkes auf. Die Fluoreszenzintensität des Aktinfarbstoffes Phalloidin in Plakophilin 2 transfizierten Zellen war schwächer als in den nicht transfizierten Kontrollen (Abb. 3.10.), was als Hinweis auf eine Reduktion der Stressfasern bzw. für eine nicht filamentäre Anordnung des Aktins spricht. Chen und Hatzfeld beschrieben nach der Überexpression von EGFP-PKP2-wt in BHK-21 Zellen die Ausbildung kurzer Membranausstülpungen und ein fast vollständiges Verschwinden der Stressfasern (Chen, Hatzfeld und Green unveröffentlicht). Der Einfluss von Plakophilin 2 auf das Aktinnetzwerk scheint eine Funktion zu sein, die andere Mitglieder der Familie der Armadillo-repeat Proteine teilen. So wurde auch nach der Überexpression von p120^{ctn} und δ -Catenin eine Reduktion der Stressfasern beobachtet. (Anastasiadis *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Boguslavsky *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu den beschriebenen globalen Aktinveränderungen konnte in den Lamellipodien der Plakophilin 2 transfizierten Zellen kortikal F-Aktin nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Innerhalb der Zellausläufer war Aktin diffus nachweisbar. Auch nach der Überexpression von δ -Catenin wurden in zellulären Ausstülpungen dünne Aktinfilamente nachgewiesen (Kim *et al.*, 2002). Insgesamt war in der vorliegenden Arbeit die hier beschriebene Desorganisation des Aktinnetzwerkes jedoch nicht in allen

exogen Plakophilin 2 exprimierenden Zellen nachweisbar. Ein Zusammenhang mit der Menge des exogenen Plakophilin 2 oder der Zeit nach der Transfektion war nicht sicher festzustellen. Godsel und Kollegen beschrieben, dass der *Knockdown* von Plakophilin 2 die subkortikale Bündelung von Aktin verhindert. Sie zeigten, dass im Rahmen der Ausbildung von Desmosomen Plakophilin 2 für die Rekrutierung von aktivem Rho A in den subkortikalen Bereich verantwortlich ist und dessen Fehlen eine abnormale subkortikale Aktinbündelung und eine vermehrte Stressfaserbildung zur Folge hat (Godsel *et al.*, 2010).

4.5 Einfluss von exogenem Plakophilin 2 auf die Migration

Die beobachteten phänotypischen Veränderungen der Plakophilin 2 transfizierten Melanomzellen führten zu der Frage, ob die Expression von Plakophilin 2 einen Einfluss auf die Zellmotilität bzw. auf das Migrationsverhalten der Zellen hat. Grosheva und Kollegen beschrieben, dass die Überexpression von p120^{ctn} nicht nur zu den beschriebenen phänotypischen Veränderungen führt, sondern auch die Motilität der transfizierten SV80 und NIH 3T3 Zellen steigert. Sie führten diesen Effekt auf eine Aktivierung der Rho GTPasen Rac und Cdc42 und eine Inhibierung von Rho A zurück (Grosheva *et al.*, 2001). Auch die Überexpression mesenchymaler Cadherine steigert die Migrationsfähigkeit (Nieman *et al.*, 1999; Hazan *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2004). Eine spätere Arbeit zeigte dann, dass p120^{ctn} zusammen mit den Cadherinen eine regulatorische Funktion im Rahmen der Zellmotilität zukommt. So senkt p120^{ctn}, das an E-Cadherin gebunden ist, die Invasivität der Zelle und die Menge an mesenchymalem Cadherin. Bindet p120^{ctn} an mesenchymale Cadherine, führt dies zu einer Steigerung der Aktivität von Rac 1 und p120^{ctn} hemmt unabhängig von der Cadherinbindung die Aktivität von Rho A (Yanagisawa und Anastasiadis, 2006). Mit Hilfe des *Migration Assays* (Callbiochem) wurde das Migrationsverhalten der mit Plakophilin 2 transfizierten Zellen 1F6 und Mewo untersucht. Ein Vergleich mit nicht transfizierten Zellen war nicht zweckmäßig, da die Transfektion selbst einen Einfluss auf das Absterben der Zellen und somit indirekt auf die Ergebnisse des *Migration Assay* hat. Als Referenz wurden daher EGFP und DsRed transfizierte 1F6 und Mewo Zellen genutzt. Ich konnte zeigen, dass Plakophilin 2 transfizierte Zellen eine signifikant geringere Migrationsrate haben. Eine Abhängigkeit des gezeigten Effekts vom verwendeten Vektor (EGFP, DsRed) konnte ausgeschlossen werden. Die gezeigte verminderte Migrationsfähigkeit der Plakophilin 2 transfizierten Zellen kann somit als Effekt der Plakophilin 2 Überexpression angenommen werden. Letztlich bleibt jedoch

die Frage, ob das gewählte Modell des *Migration-Assays* in Anbetracht des Ablösens von der Unterlage geeignet ist, eine abschließende Aussage zu treffen. Auch das Live-Cell-Imaging war wegen des Ablösens der Zellen von der Unterlage nicht geeignet. Vielmehr sollte der beobachtete Effekt in einem 3D-Modell bestätigt werden. Als weiteren Hinweis zur Erhärtung der These einer verminderten Migration nach Überexpression von Plakophilin 2 ist anzuführen, dass in *Scratch Assays* gezeigt werden konnte, dass während des Schließens einer Wunde in einer transient transfizierten Zellpopulation die nicht transfizierten Zellen rascher in die Wunde einwanderten als die Plakophilin 2 transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

4.6 Klinische Bedeutung der Expression der Plakophiline in Melanomzellen

Das maligne Melanom ist nach wie vor eine schwierig zu behandelnde Tumorerkrankung. Die Früherkennung und eine sich anschließende Therapie in einem frühen Stadium der Erkrankung bilden zusammen für den Patienten die beste Möglichkeit einer kurativen Therapie. Wird das maligne Melanom erst diagnostiziert, wenn Metastasen symptomatisch werden, so sinken die Aussichten auf eine langfristige Erholung dramatisch. In den letzten Dekaden wurden umfangreiche Untersuchungen unternommen, um die Pathomechanismen, die zur Malignisierung führen aufzudecken und hieraus Therapieoptionen abzuleiten. Maldonado und Kollegen zeigten, dass eine aktivierende Mutation im Gen BRAF bei 40-50% aller Melanome zu finden ist, vor allem wenn diese in Hautarealen auftreten, die einer intermittierenden Sonnenlichtexposition ausgesetzt sind (Maldonado *et al.*, 2003). Aktuelle Studien mit dem oral verfügbaren BRAF Inhibitor *Vemurafenib*, der spezifisch für die V600E Mutation in BRAF ist, zeigten gute Ansprechraten unter den Patienten, mit einem progressionsfreien Intervall von sechs bis sieben Monaten und einer Überlebenszeit von bis zu sechzehn Monaten (Flaherty *et al.*, 2010; Sosman *et al.*, 2012). Ist bei Patienten ein malignes Melanom diagnostiziert, so ist die Abschätzung der Prognose wichtig. Spatz und Kollegen beschrieben, dass die Tumordicke nach Breslow an prognostischer Bedeutung verliert. Vielmehr sind in den letzten Jahren Faktoren identifiziert worden, die eine Abschätzung der Prognose auf der Grundlage molekularer Mechanismen erlauben (Spatz *et al.*, 2010). Eine Bedeutung hat unter anderem der Verlust an E-Cadherin bzw. der *Cadherin-Switch* (Li *et al.*, 2002; Watson-Hurst und Becker, 2006; Wu *et al.*, 2008). Dieser Wechsel der Cadherin Expression ermöglicht die epitheliale-mesenchymale-Transition, was den Zellen die Möglichkeit zur Durchwanderung der Basalmembran und zur Metastasierung gibt. Epigenetische

Untersuchungen zeigten, dass im Rahmen der Melanomentstehung zahlreiche melanomassoziierte Gene an und aus geschaltet werden (Greenberg *et al.*, 2012; Hoshimoto *et al.*, 2012). Dies lässt wiederum den Schluss zu, dass die Melanomzelle ihre molekulare Ausstattung an das entsprechende Stroma anpasst.

Desweiteren muss beachtet werden, dass innerhalb eines Tumors die Proteinexpression stark variieren kann, insbesondere zwischen der migrierenden Front des Tumors und der Basis. Somit sind Befunde, die auch in Metastasen maligner Melanome eine (Re-) Expression von E-Cadherin beschrieben (Danen *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1996; Silye *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 1999) zu erklären. Bezüglich der prognostischen Relevanz kann jedoch gefolgert werden, dass die Expression eines einzelnen Proteins nicht zwingend eine Aussage zur Prognose erlaubt. Vielmehr muss die Expression eines Proteins im gesamten zellulären Kontext gesehen werden.

In der vorliegende Arbeit zeigte ich die de novo Expression der Plakophilin 2 und 3 in Melanomzellen. Für Plakophilin 2 zeigte ich weiter, dass die Überexpression in den Melanomzelllinien Mewo und 1F6 (für die jeweiligen Expressionsmuster siehe Tab. 10) mit einer verminderten Migration einher geht. Hieraus ist jedoch nicht abzuleiten, dass die Expression von Plakophilin 2 in Melanomen generell die Prognose positiv beeinflusst. Die invitro und in einer Monokultur gewonnenen Ergebnisse sind nicht unmittelbar auf die Prognose eines am malignen Melanom erkrankten Patienten zu übertragen. Vielmehr können aus den vorgelegten Daten Schlüsse auf die intrazelluläre Funktion gezogen werden. Wobei aktuelle Untersuchungen und die zitierten Arbeiten zur Plakophilin 3 Expression, die sowohl der Überexpression als auch der Expressionshemmung eine Tumorpromotorfunktion zusprechen, zeigen, dass die Expression eines Proteins stets im zellulären Kontext zu sehen ist (Bonne *et al.*, 1999; Bonne *et al.*, 2003; Furukawa *et al.*, 2005; Kundu *et al.*, 2008; Dusek und Attardi, 2011). Prinzipiell handelt es sich aber sowohl bei der Expression von Plakophilin 2 als auch bei der von Plakophilin 3, das in sechs der acht untersuchten Melanomzellen nachgewiesen werden konnte, um eine de novo Expression. Weitere Untersuchungen an Zelllinien aus malignen Melanomen müssen die Funktion der Plakophilin im Rahmen der Melanomentstehung weiter aufdecken. Wenn zudem immunhistochemisch eine de novo Expression der Plakophilin in malignen Melanomen gezeigt werden kann, dann kann begonnen werden, der Expression der Plakophilin eine prognostische Bedeutung zuzumessen.

5. Literatur

- (2007) The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer* 120 (5): 1116-1122.
- Aho S, Levansuo L, Montonen O, Kari C, Rodeck U und Uitto J (2002) Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. *J Cell Sci* 115 (Pt 7): 1391-1402.
- Akat K, Bleck CK, Lee YM, Haselmann-Weiss U und Kartenbeck J (2008) Characterization of a novel type of adherens junction in meningiomas and the derived cell line HBL-52. *Cell Tissue Res* 331 (2): 401-412.
- Anastasiadis PZ (2007) p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1773 (1): 34-46.
- Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y und Reynolds AB (2000) Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* 2 (9): 637-644.
- Anastasiadis PZ und Reynolds AB (2000) The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci* 113 (Pt 8): 1319-1334.
- Barnhill RL und Gupta K (2009) Unusual variants of malignant melanoma. *Clin Dermatol* 27 (6): 564-587.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R und Birchmeier W (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382 (6592): 638-642.
- Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL und Mercurio AM (2005) Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res* 65 (23): 10938-10945.
- Blaschuk OW, Sullivan R, David S und Pouliot Y (1990) Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* 139 (1): 227-229.
- Boda-Heggemann J (2006). Zell- und molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Zell-Zell-Verbindungsarten in Glioma-Zellen und mesenchymalen Stammzellen, Universität Heidelberg / Fakultät für Biowissenschaften L2 - <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/6127>. Letzter Zugriff: 27.06.2011
- Boguslavsky S, Grosheva I, Landau E, Shtutman M, Cohen M, Arnold K, Feinstein E, Geiger B und Bershadsky A (2007) p120 catenin regulates lamellipodial

- dynamics and cell adhesion in cooperation with cortactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (26): 10882-10887.
- Bonne S, Gilbert B, Hatzfeld M, Chen X, Green KJ und van Roy F (2003) Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol* 161 (2): 403-416.
- Bonne S, van Hengel J, Nollet F, Kools P und van Roy F (1999) Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 14): 2265-2276.
- Bornslaeger EA, Godsel LM, Corcoran CM, Park JK, Hatzfeld M, Kowalczyk AP und Green KJ (2001) Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *J Cell Sci* 114 (Pt 4): 727-738.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A und Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106 (3): 761-771.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B und Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (16): 7297-7301.
- Calkins CC, Hoepner BL, Law CM, Novak MR, Setzer SV, Hatzfeld M und Kowalczyk AP (2003) The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. *J Biol Chem* 278 (3): 1774-1783.
- Carter WG, Kaur P, Gil SG, Gahr PJ und Wayner EA (1990a) Distinct functions for integrins alpha 3 beta 1 in focal adhesions and alpha 6 beta 4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *J Cell Biol* 111 (6 Pt 2): 3141-3154.
- Carter WG, Wayner EA, Bouchard TS und Kaur P (1990b) The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J Cell Biol* 110 (4): 1387-1404.
- Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F und Green KJ (2002) Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J Biol Chem* 277 (12): 10512-10522.
- Choi HJ und Weis WI (2005) Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol* 346 (1): 367-376.
- Danen EH, de Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruiten DJ und van Muijen GN (1996) E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res* 6 (2): 127-131.

5. Literatur

- Daniel JM und Reynolds AB (1995) The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol Cell Biol* 15 (9): 4819-4824.
- Davis MA, Ireton RC und Reynolds AB (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 163 (3): 525-534.
- Donatien P, Surleve-Bazeille JE, Thody AJ und Taieb A (1993) Growth and differentiation of normal human melanocytes in a TPA-free, cholera toxin-free, low-serum medium and influence of keratinocytes. *Archives of dermatological research* 285 (7): 385-392.
- Duguay D, Foty RA und Steinberg MS (2003) Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev Biol* 253 (2): 309-323.
- Dusek RL und Attardi LD (2011) Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nature reviews* 11 (5): 317-323.
- Fitzpatrick TB und Breathnach AS (1963) The Epidermal Melanin Unit System. *Dermatol Wochenschr* 147: 481-489.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K und Chapman PB (2010) Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363 (9): 809-819.
- Fogh J, Fogh JM und Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59 (1): 221-226.
- Foty RA und Steinberg MS (2005) The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev Biol* 278 (1): 255-263.
- Furukawa C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Ito T, Tsuchiya E, Sone S und Nakamura Y (2005) Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 65 (16): 7102-7110.
- Gallin WJ, Edelman GM und Cunningham BA (1983) Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (4): 1038-1042.
- Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A und Kaufmann R (2005). *Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom. Interdisziplinäre Leitlinie zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren*. Stuttgart, New York., Georg Thieme Verlag: 23-55.

- Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A und Kaufmann R (2007) Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma. *Melanoma Res* 17 (6): 393-399.
- Gebhardt C und Näher H (2009) Standards und Trends bei der Behandlung des malignen Melanoms. *Onkopipeline Volume 2 (Number 3/ September 2009)*: 101-113.
- Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E und Thierfelder L (2004) Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 36 (11): 1162-1164.
- Glotzer M (2005) The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307 (5716): 1735-1739.
- Godsel LM, Dubash AD, Bass-Zubek AE, Amargo EV, Klessner JL, Hobbs RP, Chen X und Green KJ (2010) Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Mol Biol Cell* 21 (16): 2844-2859.
- Greenberg ES, Chong KK, Huynh KT, Tanaka R und Hoon DS (2012) Epigenetic biomarkers in skin cancer. *Cancer letters*.
- Greene MH, Clark WH, Jr., Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE und Fraser MC (1985) High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Annals of internal medicine* 102 (4): 458-465.
- Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M und Bershadsky AD (2001) p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* 114 (4): 695-707.
- Grossmann KS, Grund C, Huelsken J, Behrend M, Erdmann B, Franke WW und Birchmeier W (2004) Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol* 167 (1): 149-160.
- Haass NK, Smalley KS, Li L und Herlyn M (2005) Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 18 (3): 150-159.
- Hamada T, South AP, Mitsuhashi Y, Kinebuchi T, Bleck O, Ashton GH, Hozumi Y, Suzuki T, Hashimoto T, Eady RA und McGrath JA (2002) Genotype-phenotype

- correlation in skin fragility-ectodermal dysplasia syndrome resulting from mutations in plakophilin 1. *Exp Dermatol* 11 (2): 107-114.
- Hatzfeld M (1999) The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol* 186: 179-224.
- Hatzfeld M (2005) The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol* 84 (2-3): 205-214.
- Hatzfeld M (2007) Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta* 1773 (1): 69-77.
- Hatzfeld M und Burba M (1994) Function of type I and type II keratin head domains: their role in dimer, tetramer and filament formation. *J Cell Sci* 107 (7): 1959-1972.
- Hatzfeld M, Green KJ und Sauter H (2003) Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *J Cell Sci* 116 (Pt 7): 1219-1233.
- Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K und Vinzens U (2000) The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol* 149 (1): 209-222.
- Hatzfeld M, Kristjansson GI, Plessmann U und Weber K (1994) Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *J Cell Sci* 107 (Pt 8): 2259-2270.
- Hatzfeld M und Nachtsheim C (1996) Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *J Cell Sci* 109 (Pt 11): 2767-2778.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L und Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148 (4): 779-790.
- Heid HW, Schmidt A, Zimbelmann R, Schafer S, Winter-Simanowski S, Stumpp S, Keith M, Figge U, Schnolzer M und Franke WW (1994) Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation* 58 (2): 113-131.
- Hirai Y, Nose A, Kobayashi S und Takeichi M (1989) Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II. Skin morphogenesis. *Development* 105 (2): 271-277.
- Hofmann I, Casella M, Schnolzer M, Schlechter T, Spring H und Franke WW (2006) Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules. *Mol Biol Cell* 17 (3): 1388-1398.

- Hofmann I, Mertens C, Brettel M, Nimmrich V, Schnolzer M und Herrmann H (2000) Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci* 113 (13): 2471-2483.
- Hoshimoto S, Kuo CT, Chong KK, Takeshima TL, Takei Y, Li MW, Huang SK, Sim MS, Morton DL und Hoon DS (2012) AIM1 and LINE-1 epigenetic aberrations in tumor and serum relate to melanoma progression and disease outcome. *J Invest Dermatol* 132 (6): 1689-1697.
- Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL und Herlyn M (2000a) Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* 113 (9): 1535-1542.
- Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE und Herlyn M (2000b) E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 156 (5): 1515-1525.
- Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR und Herlyn M (1996) Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1 (2): 188-194.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG und Kemler R (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59 (1): 3-10.
- Iretton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F und Reynolds AB (2002) A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 159 (3): 465-476.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J und Thun MJ (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59 (4): 225-249.
- Jimbow K, Quevedo WC, Jr., Fitzpatrick TB und Szabo G (1976) Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J Invest Dermatol* 67 (1): 72-89.
- Johnson E, Theisen CS, Johnson KR und Wheelock MJ (2004) R-cadherin influences cell motility via Rho family GTPases. *J Biol Chem* 279 (30): 31041-31049.
- Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ und MARRS JA (1995) Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (11): 5067-5071.
- Kaushal V und Barnes LD (1986) Effect of zwitterionic buffers on measurement of small masses of protein with bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 157 (2): 291-294.

5. Literatur

- Keil R, Kiessling C und Hatzfeld M (2009) Targeting of p0071 to the midbody depends on KIF3. *J Cell Sci* 122 (Pt 8): 1174-1183.
- Keil R, Wolf A, Huttelmaier S und Hatzfeld M (2007) Beyond regulation of cell adhesion: local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071 catenin. *Cell Cycle* 6 (2): 122-127.
- Keirsebilck A, Bonne S, Staes K, van Hengel J, Nollet F, Reynolds A und van Roy F (1998) Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics* 50 (2): 129-146.
- Kim K, Sirota A, Chen Yh YH, Jones SB, Dudek R, Lanford GW, Thakore C und Lu Q (2002) Dendrite-like process formation and cytoskeletal remodeling regulated by delta-catenin expression. *Exp Cell Res* 275 (2): 171-184.
- Kim SW, Park JI, Spring CM, Sater AK, Ji H, Otchere AA, Daniel JM und McCrea PD (2004) Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat Cell Biol* 6 (12): 1212-1220.
- Koch PJ, Goldschmidt MD, Walsh MJ, Zimbelmann R und Franke WW (1991) Complete amino acid sequence of the epidermal desmoglein precursor polypeptide and identification of a second type of desmoglein gene. *Eur J Cell Biol* 55 (2): 200-208.
- Kowalczyk AP, Hatzfeld M, Bornslaeger EA, Kopp DS, Borgwardt JE, Corcoran CM, Settler A und Green KJ (1999) The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *J Biol Chem* 274 (26): 18145-18148.
- Kozma R, Ahmed S, Best A und Lim L (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15 (4): 1942-1952.
- Kreizenbeck GM, Berger AJ, Subtil A, Rimm DL und Gould Rothberg BE (2008) Prognostic significance of cadherin-based adhesion molecules in cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 (4): 949-958.
- Kundu ST, Gosavi P, Khapare N, Patel R, Hosing AS, Maru GB, Ingle A, Decaprio JA und Dalal SN (2008) Plakophilin3 downregulation leads to a decrease in cell adhesion and promotes metastasis. *Int J Cancer* 123 (10): 2303-2314.
- Lewis JE, Wahl JK, 3rd, Sass KM, Jensen PJ, Johnson KR und Wheelock MJ (1997) Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J Cell Biol* 136 (4): 919-934.
- Li G, Satyamoorthy K und Herlyn M (2002) Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (1): 62-70.

- Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K und Herlyn M (2001) Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20 (56): 8125-8135.
- Liu Y, Dong QZ, Zhao Y, Dong XJ, Miao Y, Dai SD, Yang ZQ, Zhang D, Wang Y, Li QC, Zhao C und Wang EH (2009) P120-catenin isoforms 1A and 3A differently affect invasion and proliferation of lung cancer cells. *Exp Cell Res* 315 (5): 890-898.
- Lockshin A, Giovanella BC, De Ipolyi PD, Williams LJ, Jr., Mendoza JT, Yim SO und Stehlin JS, Jr. (1985) Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma. *Cancer Res* 45 (1): 345-350.
- Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D und Bastian BC (2003) Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 95 (24): 1878-1890.
- Marcos-Gragera R, Vilar-Coromina N, Galceran J, Borrás J, Cleries R, Ribes J, Gispert R und Izquierdo A (2010) Rising trends in incidence of cutaneous malignant melanoma and their future projections in Catalonia, Spain: increasing impact or future epidemic? *J Eur Acad Dermatol Venereol*.
- Martinez MC, Ochiishi T, Majewski M und Kosik KS (2003) Dual regulation of neuronal morphogenesis by a delta-catenin-cortactin complex and Rho. *J Cell Biol* 162 (1): 99-111.
- McGary EC, Lev DC und Bar-Eli M (2002) Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol Ther* 1 (5): 459-465.
- McGrath JA, McMillan JR, Shemanko CS, Runswick SK, Leigh IM, Lane EB, Garrod DR und Eady RA (1997) Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Genet* 17 (2): 240-244.
- Mechanic S, Raynor K, Hill JE und Cowin P (1991) Desmocollins form a distinct subset of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (10): 4476-4480.
- Mertens C, Hofmann I, Wang Z, Teichmann M, Sepeshri Chong S, Schnolzer M und Franke WW (2001) Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (14): 7795-7800.
- Mertens C, Kuhn C und Franke WW (1996) Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol* 135 (4): 1009-1025.

- Mertens C, Kuhn C, Moll R, Schwetlick I und Franke WW (1999) Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and malignant tissues. *Differentiation* 64 (5): 277-290.
- Miyatani S, Shimamura K, Hatta M, Nagafuchi A, Nose A, Matsunaga M, Hatta K und Takeichi M (1989) Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion. *Science* 245 (4918): 631-635.
- Mo YY und Reynolds AB (1996) Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines. *Cancer Res* 56 (11): 2633-2640.
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O und Clevers H (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86 (3): 391-399.
- Moll I, Kurzen H, Langbein L und Franke WW (1997) The distribution of the desmosomal protein, plakophilin 1, in human skin and skin tumors. *J Invest Dermatol* 108 (2): 139-146.
- Müller J, Ritt DA, Copeland TD und Morrison DK (2003) Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *Embo J* 22 (17): 4431-4442.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR und Wheelock MJ (1999) N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 147 (3): 631-644.
- Nishimura EK, Yoshida H, Kunisada T und Nishikawa SI (1999) Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. *Dev Biol* 215 (2): 155-166.
- Nobes CD und Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81 (1): 53-62.
- Nollet F, Kools P und van Roy F (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 299 (3): 551-572.
- Noren NK, Liu BP, Burridge K und Kreft B (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* 150 (3): 567-580.
- Nose A und Takeichi M (1986) A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* 103 (6 Pt 2): 2649-2658.

- Paffenholz R und Franke WW (1997) Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation* 61 (5): 293-304.
- Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, Sini MC, Palla M, Mozzillo N und Ascierto PA (2009) Main roads to melanoma. *J Transl Med* 7: 86.
- Park JI, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, Cho K, Barton MC, Deroo T, Vleminckx K, Moon RT und McCrea PD (2005) Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell* 8 (6): 843-854.
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A und Engel J (1999) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J* 18 (7): 1738-1747.
- Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R und Bosserhoff AK (2001) Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 276 (27): 24661-24666.
- Prokhortchouk A, Hendrich B, Jorgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A und Prokhortchouk E (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* 15 (13): 1613-1618.
- Qi J, Chen N, Wang J und Siu CH (2005) Transendothelial Migration of Melanoma Cells Involves N-Cadherin-mediated Adhesion and Activation of the {beta}-Catenin Signaling Pathway. *Mol Biol Cell* 16 (9): 4386-4397.
- Reynolds AB (2007) p120-catenin: Past and present. *Biochim Biophys Acta* 1773 (1): 2-7.
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J und Zhang Z (1994) Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 14 (12): 8333-8342.
- Reynolds AB, Daniel JM, Mo YY, Wu J und Zhang Z (1996) The novel catenin p120cas binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* 225 (2): 328-337.
- Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST und Gaut JR (1992) p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene* 7 (12): 2439-2445.
- Reynolds AB, Kanner SB, Wang HC und Parsons JT (1989a) Stable association of activated pp60src with two tyrosine-phosphorylated cellular proteins. *Mol Cell Biol* 9 (9): 3951-3958.

- Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB und Parsons JT (1989b) Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol* 9 (2): 629-638.
- Rickelt S, Winter-Simanowski S, Noffz E, Kuhn C und Franke WW (2009) Upregulation of plakophilin-2 and its acquisition to adherens junctions identifies a novel molecular ensemble of cell-cell-attachment characteristic for transformed mesenchymal cells. *Int J Cancer*.
- Ridley AJ und Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70 (3): 389-399.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D und Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70 (3): 401-410.
- Riggleman B, Wieschaus E und Schedl P (1989) Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene. *Genes Dev* 3 (1): 96-113.
- Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR und Jankowski J (1999) Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol* 52 (3): 151-157.
- Schafer S, Koch PJ und Franke WW (1994) Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 211 (2): 391-399.
- Schmidt A, Langbein L, Pratzel S, Rode M, Rackwitz HR und Franke WW (1999) Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation* 64 (5): 291-306.
- Schmidt A, Langbein L, Rode M, Pratzel S, Zimbelmann R und Franke WW (1997) Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res* 290 (3): 481-499.
- Schmitt CJ, Franke WW, Goerdts S, Falkowska-Hansen B, Rickelt S und Peitsch WK (2007) Homo- and heterotypic cell contacts in malignant melanoma cells and desmoglein 2 as a novel solitary surface glycoprotein. *J Invest Dermatol* 127 (9): 2191-2206.
- Schuh R, Vestweber D, Riede I, Ringwald M, Rosenberg UB, Jackle H und Kemler R (1986) Molecular cloning of the mouse cell adhesion molecule uvomorulin:

- cDNA contains a B1-related sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (5): 1364-1368.
- Schwarz J, Ayim A, Schmidt A, Jager S, Koch S, Baumann R, Dunne AA und Moll R (2006) Differential expression of desmosomal plakophilins in various types of carcinomas: correlation with cell type and differentiation. *Hum Pathol* 37 (5): 613-622.
- Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M und Shapiro SS (2000) The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res* 254 (1): 25-32.
- Seline PC, Norris DA, Horikawa T, Fujita M, Middleton MH und Morelli JG (1996) Expression of E and P-cadherin by melanoma cells decreases in progressive melanomas and following ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 106 (6): 1320-1324.
- Setzer SV, Calkins CC, Garner J, Summers S, Green KJ und Kowalczyk AP (2004) Comparative analysis of armadillo family proteins in the regulation of a431 epithelial cell junction assembly, adhesion and migration. *J Invest Dermatol* 123 (3): 426-433.
- Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M und et al. (1995) Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* 128 (5): 949-957.
- Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M und Abe O (1989) Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 49 (8): 2128-2133.
- Silye R, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Poole S, van Noorden S, Batchelor W, Regele H, Sega W, Boesmueller H, Krausz T und Pignatelli M (1998) E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 186 (4): 350-355.
- Sobolik-Delmaire T, Reddy R, Pashaj A, Roberts BJ und Wahl JK, 3rd (2010) Plakophilin-1 localizes to the nucleus and interacts with single-stranded DNA. *J Invest Dermatol* 130 (11): 2638-2646.
- Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK und Ribas A (2012) Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *The New England journal of medicine* 366 (8): 707-714.

- South AP, Wan H, Stone MG, Dopping-Hepenstal PJ, Purkis PE, Marshall JF, Leigh IM, Eady RA, Hart IR und McGrath JA (2003) Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *J Cell Sci* 116 (Pt 16): 3303-3314.
- Spatz A, Stock N, Batist G und van Kempen LC (2010) The biology of melanoma prognostic factors. *Discovery medicine* 10 (50): 87-93.
- Spring CM, Kelly KF, O'Kelly I, Graham M, Crawford HC und Daniel JM (2005) The catenin p120^{ctn} inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin. *Exp Cell Res* 305 (2): 253-265.
- Staddon JM, Smales C, Schulze C, Esch FS und Rubin LL (1995) p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J Cell Biol* 130 (2): 369-381.
- Symington BE, Takada Y und Carter WG (1993) Interaction of integrins alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1: potential role in keratinocyte intercellular adhesion. *J Cell Biol* 120 (2): 523-535.
- Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251 (5000): 1451-1455.
- Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S und Gilchrist BA (1994) E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci* 107 (4): 983-992.
- Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS und Wilson WD (1992) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31 (12): 3103-3112.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (9): 4350-4354.
- Uong A und Zon LI (2010) Melanocytes in development and cancer. *J Cell Physiol* 222 (1): 38-41.
- Van Marck V, Stove C, Van Den Bossche K, Stove V, Paredes J, Vander Haeghen Y und Bracke M (2005) P-cadherin promotes cell-cell adhesion and counteracts invasion in human melanoma. *Cancer Res* 65 (19): 8774-8783.
- Van Muijen GN, Cornelissen LM, Jansen CF, Figdor CG, Johnson JP, Brocker EB und Ruiter DJ (1991a) Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice. *Clin Exp Metastasis* 9 (3): 259-272.

- van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL und Ruiter DJ (1991b) Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer* 48 (1): 85-91.
- Veierod MB, Weiderpass E, Thorn M, Hansson J, Lund E, Armstrong B und Adami HO (2003) A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. *J Natl Cancer Inst* 95 (20): 1530-1538.
- Verschraegen CF, Giovanella BC, Mendoza JT, Kozielski AJ und Stehlin JS, Jr. (1991) Specific organ metastases of human melanoma cells injected into the arterial circulation of nude mice. *Anticancer Res* 11 (2): 529-535.
- Watson-Hurst K und Becker D (2006) The role of N-cadherin, MCAM and beta3 integrin in melanoma progression, proliferation, migration and invasion. *Cancer Biol Ther* 5 (10): 1375-1382.
- Whiteman DC (1995) Melanoma and sun exposure. *Lancet* 346 (8984): 1224-1225.
- Whitlock NV und Bower C (2003) Targetting of desmoglein 1 in inherited and acquired skin diseases. *Clin Exp Dermatol* 28 (4): 410-415.
- Whitlock NV, Haftek M, Angoulvant N, Wolf F, Perrot H, Eady RA und McGrath JA (2000) Genomic amplification of the human plakophilin 1 gene and detection of a new mutation in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *J Invest Dermatol* 115 (3): 368-374.
- Wieschaus E und Riggleman R (1987) Autonomous requirements for the segment polarity gene armadillo during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* 49 (2): 177-184.
- Willert K und Nusse R (1998) Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current opinion in genetics & development* 8 (1): 95-102.
- Wodarz A und Nusse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology* 14: 59-88.
- Wolf A und Hatzfeld M (2010 b) A role of plakophilins in the regulation of translation. *Cell Cycle* 9 (15): 2973-2978.
- Wolf A, Keil R, Gotzl O, Mun A, Schwarze K, Lederer M, Huttelmaier S und Hatzfeld M (2006) The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol* 8 (12): 1432-1440.
- Wolf A, Krause-Gruszczynska M, Birkenmeier O, Ostareck-Lederer A, Huttelmaier S und Hatzfeld M (2010 a) Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *J Cell Biol* 188 (4): 463-471.
- Wu Y, Lin Y, Liu H und Li J (2008) Inhibition of invasion and up-regulation of E-cadherin expression in human malignant melanoma cell line A375 by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Journal of Huazhong University of Science and*

5. Literatur

Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying
De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao 28 (3): 356-359.

Yanagisawa M und Anastasiadis PZ (2006) p120 catenin is essential for mesenchymal
cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness. J Cell Biol 174
(7): 1087-1096.

Zhou J, Liyanage U, Medina M, Ho C, Simmons AD, Lovett M und Kosik KS (1997)
Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family.
Neuroreport 8 (8): 2085-2090.

6. Thesen

1. Normale humane epidermale Melanozyten haben keine Desmosomen und exprimieren dementsprechend die Plakophiline 1,2 und 3 nicht, aber sie exprimieren p0071 (Plakophilin 4) und p120^{ctn}.
2. Die Melanomzelllinien MM1 und HT144 zeigen eine de novo Expression von Plakophilin 2 und eine Koexpression der klassischen Cadherine E-, N- und P-Cadherin.
3. Plakophilin 3 wird in sechs der acht Melanomzellen de novo exprimiert.
4. Zwei der sechs Plakophilin 3 exprimierenden Zelllinien exprimieren keine Cadherine. Plakophilin 3 lokalisierte hier ausschließlich zytoplasmatisch.
5. Die Melanomzelllinien MM1 und HT144, die E-, N- und P-Cadherin exprimieren, exprimieren p0071 auf einem gleich hohen Niveau wie die Melanozyten. Die übrigen Melanomzellen zeigten eine zum Teil deutlich niedrigere Expression.
6. Die de novo Expression der Plakophilien 2 und 3 zeigt die mögliche Bedeutung als Tumormarker maligner Melanome.
7. Die Überexpression von Plakophilin 2 in den Melanomzellen 1F6 und Mewo führt zur Ausbildung des Branching Phenotyps, der durch die Ausbildung von zellulären Ausziehungen, Lamellipodien und Filopodien charakterisiert ist.
8. Die Überexpression von Plakophilin 2 führt in den Melanomzellen 1F6 und Mewo zu einer Reorganisation des Aktinnetzwerkes, mit einem Verlust der Stressfasern.
9. Die Überexpression von Plakophilin 2 führt in den Melanomzelllinien 1F6 und Mewo zu einer Reduktion der Invasivität.
10. Ob der Expression der Plakophiline 2 und 3 eine Funktion als Tumorsuppressor oder Tumorpromotor zukommt ist abhängig vom zellulären Kontext.

Lebenslauf

Name: Sebastian Simmermacher
Geburtsdatum: am 04.02.1981 in Darmstadt
Konfession: Evangelisch
Familienstand: Verheiratet mit Danaë Simmermacher, geb. Seeber.

Schule

08/1987- 06/1991 Grundschule Nieder-Ramstadt
08/1991- 05/2000 Georg-Christoph-Lichtenberg-Schule Ober-Ramstadt, mit
Abschluss Abitur (Note 1,7)

Zivildienst

09/2000- 08/2001 Zivildienst in der Krankenpflege am Klinikum Darmstadt

Hochschule

seit 10/2001 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
08/2003- 09/2003 Physikum (nach alter ÄAppO): Gesamtnote 2,66
04/2008- 06/2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung :Gesamtnote 2,5

Famulaturen

02/2004- 03/2004 Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
02/2005- 03/2005 Innere Medizin, Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara,
Halle
07/2005- 08/2005 Radiologie, Radiologische Gemeinschaftspraxis Niemeyerstraße,
Halle
09/2005- 10/2005 Urologie, Praxis Dr. Klaus-Thomas Moehlis, Darmstadt
02/2006- 03/2006 Universitätsklinik für Neurochirurgie, Medizinische Universität
Graz

Praktisches Jahr

02/2007- 06/2007 Innere Medizin, Carl-von-Basedow Klinikum Merseburg
06/2007- 09/2007 Chirurgie, Carl-von-Basedow Klinikum Merseburg
10/2007- 01/2008 Neurochirurgie, Universitätsklinikum Halle

Tätigkeiten während des Studiums

2001 – 2003 Während der vorlesungsfreien Zeit Tätigkeit in der Pflege auf der
anästhesiologischen Intensivstation des Klinikums Darmstadt
11/2003- 02/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft im Kurs für makroskopische
Anatomie, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Halle
2005 – 2007 Mitarbeit im Fachschaftsrat der Medizinischen Fakultät
2006 – 2007 Studentisches Mitglied des Fakultätsrats der Medizinischen
Fakultät der Universität Halle-Wittenberg

2006 – 2007 Mitarbeit im Ausschuss für Studium und Lehre, sowie im Ausschuss PJ der Medizinischen Fakultät

Berufliche Laufbahn

seit 07/2008 Assistenzarzt in der Klinik für Neurochirurgie am Universitätskrankenhaus Halle

Qualifikationen

11/2010 GLP Kurs am TRM Leipzig

Sprachen Englisch (fließend in Wort und Schrift),
Französisch (Grundkenntnisse)

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Danksagungen

Ich danke Frau Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld für die Betreuung und die konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Dissertation. Annika Wolf und Rene Keil danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, die kritischen Diskussionen während der Anfertigung der Arbeit und die Korrekturen. Kathrin Schwarze danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur. Stefan Ramp danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Meiner lieben Frau Danaë danke ich für die tägliche und liebevolle Unterstützung. Ich danke meinen Eltern für das Ermöglichen dieser Dissertation. Jens Abendroth danke ich für die vielen geselligen Abende, die stets eine willkommene Abwechslung waren.