

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Charakterisierung humaner Merkelzellkarzinom- Zelllinien unter besonderer Berücksichtigung der Expression von Tight Junction-Proteinen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)
im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

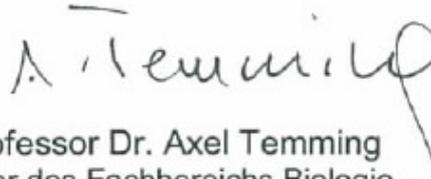
vorgelegt von

Franca Fuchs

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. J. BRANDNER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Prof. Dr. S. DOBLER
Tag der Disputation: 08. April 2011

Hamburg, den 17. März 2011



Handwritten signature of Axel Temming in black ink, consisting of a stylized 'A' followed by 'Temming' and a long vertical flourish.

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Haut.....	1
1.1.1 Merkelzellen	2
1.2 Das Merkelzellkarzinom	5
1.2.1 Klinische Manifestation und Prognose	5
1.2.2 Pathologie und Diagnose.....	6
1.2.3 Das Merkelzellpolyomavirus (MCPyV)	8
1.2.4 Klassifizierung von Merkelzellkarzinom Zelllinien	10
1.3 Zell-Zellverbindungen	12
1.3.1 Tight Junctions und TJ-Proteine.....	12
1.3.2 Adhärenzverbindungen.....	14
1.3.3 Regulation des Aufbaus von TJs.....	15
1.3.4 TJs und TJ-Proteine im MCC und anderen Tumoren	16
1.3.5 AJs und AJ-Proteine im MCC und anderen Tumoren.....	18
1.4 Ziel der Arbeit	20
2 Material	22
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	22
2.2 Chemikalien	24
2.3 Zellkulturmaterialien.....	25
2.4 Kits.....	26
2.5 Primer.....	27
2.6 Antikörper	28
2.7 Kulturzellen.....	30
2.7.1 Humane Fibroblasten und Keratinozyten	30
2.7.2 Merkelzellkarzinom Zelllinien.....	30
2.8 Software	31
2.9 Statistische Auswertungen.....	31
3 Methoden	32
3.1 Zellkultur	32
3.1.1 Anlegen und Kultivieren von humanen Fibroblasten	32
3.1.2 Bestrahlung von Fibroblasten.....	33
3.1.3 Kultivierung von Merkelzellkarzinom-Zelllinien (MCCL).....	33

3.1.4 <i>In vitro</i> Barriere-Assays – Biotinylierung von Sphäroiden und Behandlung mit EDTA und <i>Clostridium Perfringens</i> Enterotoxin.....	34
3.1.5 Einfrieren von Sphäroiden.....	35
3.1.6 Invasionsexperiment.....	36
3.1.7 Zellzählung.....	36
3.1.8 WST-1 Assay.....	37
3.1.9 BrdU-Elisa.....	38
3.2 Immunhistologische Methoden.....	38
3.2.1 Kryoschnitte.....	38
3.2.2 Cytospin.....	39
3.2.3 Immunfluoreszenz.....	39
3.2.4 Bestimmung der Menge apoptotischer Zellen in MCCL.....	40
3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	41
3.3.1 Proteinisolation aus Zellen.....	41
3.3.2 Proteinbestimmung (nach Bradford).....	41
3.3.3 Proteinfällung.....	42
3.3.4 Westernblot.....	42
3.4 Molekularbiologische Methoden.....	44
3.4.1 RNA-Isolation.....	44
3.4.2 Synthese komplementärer DNA mit Hilfe der reversen Transkription.....	44
3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	45
3.4.4 Agarose Gelelektrophorese.....	46
3.4.5 quantitative Polymerase Kettenreaktion.....	47
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Charakterisierung humaner Zelllinien des MCC.....	49
4.1.1 Klassifizierung von Merkelzellkarzinom-Zelllinien.....	50
4.1.2 Morphologische Charakterisierung der MCCL.....	52
4.1.3 Untersuchung der MCCL auf MCPyV-DNA und virale Proteine.....	62
4.1.4 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von MCCL.....	65
4.1.5 Untersuchung der Invasivität von Zellen der MCCL.....	68
4.2 Untersuchung von TJ-Proteinen in MCCL.....	69
4.2.1 Claudine in MCCL.....	69
4.2.2 Occludin in MCCL.....	77
4.2.3 JAM-A in MCCL.....	81
4.2.4 Zonula Occludens (ZO-) Proteine in MCCL.....	84

4.2.5 Korreliert die Expression von TJ-Proteinen mit dem Wachstumsverhalten der Zelllinien?	89
4.2.6 Par-Polaritätskomplexproteine Par3 und aPKC in MCCL	91
4.3 Adhärenzverbindungsproteine in MCCL	92
4.4 TJs in MCCL Sphäroiden	96
4.4.1 Die Typ I MCCL zeigen im elektronenmikroskopischen Gefrierbruch typische TJ ..	96
Stränge	96
4.4.2 TJ-Barrierefunktion in MCCL-Sphäroiden.....	97
4.4.3 Calcium ist essentiell für die Barrierefunktion in MCCL.....	99
4.4.4 Cldn-4 ist nicht an der Barrierebildung für niedermolekulare Moleküle beteiligt	100
4.5 Andere mögliche Funktionen von TJ-Proteinen	103
5 Diskussion	105
5.1 Allgemeine Charakterisierung humaner Zelllinien des MCC.....	105
5.1.1 Klassifizierung der MCCL	105
5.1.2 MCPyV in MCCL.....	107
5.1.3 Wachstumsgeschwindigkeiten der MCCL	110
5.2 Charakterisierung der MCCL bezüglich TJs und TJ-Proteinen	113
5.2.1 Funktionelle TJs in MCCL	114
5.2.2 Welche Moleküle sind für die Ausbildung von funktionellen TJs verantwortlich ..	117
5.3 Korrelation der Expression von TJ-Proteinen mit Eigenschaften der MCCL.....	122
5.3.1 Korrelation der TJ-Proteine mit der Morphologie	122
5.3.2 Korrelation der TJ-Proteine mit Proliferation und Invasion	122
5.3.3 Korrelation zwischen MCPyV-Infektion und TJ-Protein Expressionen	124
Zusammenfassung	126
Literaturverzeichnis	128
Abkürzungen	144

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und lässt sich grob in Epidermis, Dermis und subkutanes Fettgewebe gliedern (Abbildung 1.1). Die Hauptfunktion der Haut ist der Schutz gegenüber Umwelteinflüssen, die Thermo- und Osmoregulation sowie die Sinneswahrnehmung.

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, dessen größte Zellpopulation die Keratinozyten sind. Ihre Differenzierung nimmt, ausgehend vom *stratum basale* (Basalzellschicht), über das *stratum spinosum* (Stachelzellschicht) bis hin zum *stratum granulosum* (Granularzellschicht) zu. Die oberste Schicht der Epidermis wird vom *stratum corneum* (Hornschicht) gebildet, das aus abgestorbenen Keratinozyten besteht. Diese sogenannten Korneozyten weisen eine abgeflachte Form auf und besitzen anstelle einer Zellmembran eine Hornhülle (*cornified envelope*).

Weiterhin findet man in der Epidermis melaninsynthetisierende Melanozyten, dendritische Immunzellen (Langerhanszellen) sowie neuroendokrine Merkelzellen. Als semipermeable Barriere dient die Epidermis in erster Linie zum Schutz vor epidermale Wasserverlust und vor äußeren Umwelteinflüssen. Die Barriere wird durch die verhornten Korneozyten des *stratum corneum* und zusätzlich durch Tight Junctions der lebenden Keratinozyten gebildet (Kirschner *et al.* 2010) (Abb. 1.1).

Das unter der Epidermis gelegene Bindegewebe wird Dermis genannt. Die größte Zellpopulation dieser Schicht sind die Fibroblasten. Fibroblasten synthetisieren und exozytieren extrazelluläre dermale Matrixproteine, überwiegend Kollagen- und Elastin-Fasern sowie Proteoglykane. Man findet in der Dermis viele Nervenfasern sowie ein ausgedehntes System an Blut- und Lymphgefäßen (Jung 1995). Weitere Funktionen der Haut neben der Barrierebildung sind u.a. die Temperaturwahrnehmung und der Schmerz- und Tastsinn.

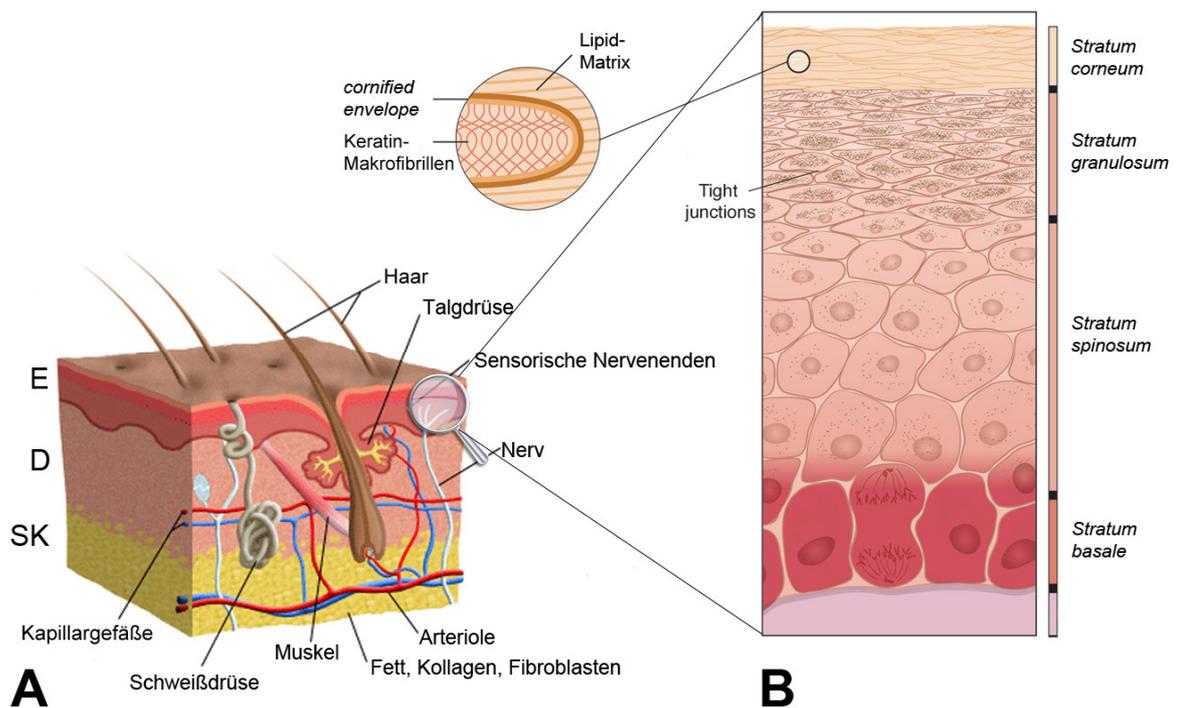


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der Haut.

(A) Die Haut setzt sich aus der Epidermis (E), der Dermis (D) und dem subkutanen Fettgewebe (SK) zusammen. In der Dermis sind Haare, Blutgefäße, Talg- und Schweißdrüsen sowie Nervenfasern lokalisiert, deren Enden bis in die Epidermis reichen. (B) Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithelgewebe, das aus Keratinozyten besteht. Es setzt sich aus den Schichten *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und *stratum corneum* zusammen. Die Permeabilitätsbarriere wird im *stratum corneum* von intrazellulären Keratinmakrofibrillen, quervernetzten Proteinen (*cornified envelope*) und sekretierten Lipiden sowie im *stratum granulosum* von Tight Junctions gebildet (modifiziert nach Segre 2006).

1.1.1 Merkelzellen

Die Merkelzelle wurde zuerst von Friedrich Merkel im Jahre 1875 entdeckt und von ihm als Tastzelle der Haut beschrieben. Sie ist eine ausdifferenzierte neuroendokrine Zelle, die in der Haut im *stratum basale* der Epidermis und in der Basalschicht der äußeren Wurzelscheide von Haarfollikeln, vorwiegend in der *Bulge* Region, zu finden ist (als Übersichtsartikel s. Boulais & Misery 2007, Moll I. *et al.* 2005, Tachibana & Nawa 2002). Die Verteilung der Merkelzellen in der Haut ist von der Körperregion abhängig. In der interfollikulären Epidermis kommen sie beispielsweise nur sehr vereinzelt vor, an den Handinnenflächen und den Fußsohlen hingegen in großer Zahl (Lacour *et al.* 1991). In der Nähe von Drüsenausführungsgängen oder in Haarfollikeln können sich zwischen 30-200 Merkelzellen

befinden, die dort gürtelförmig angeordnet sind. Des Weiteren gibt es nahe der Haarfollikel so genannte Haar- oder Tastscheiben, in denen Merkelzellen akkumuliert vorliegen (ca. 750 Merkelzellen/mm²) (Reinisch & Tschachler 2005). Insgesamt sind zwischen 0,2 und 5% aller epidermalen Zellen Merkelzellen (Fradette *et al.* 2003). Besonders häufig findet man Merkelzellen auch in Schnurrhaaren von Tieren (Halata *et al.* 2003), in der Gaumenmucosa und in den Geschmacksknospen (Tachibana *et al.* 1997). Darüber hinaus ist die Zahl an Merkelzellen in sonnenexponierter Haut doppelt so hoch wie in nicht exponierter Haut (Moll I. *et al.* 1990).

Merkelzellen besitzen eine leicht ovale, manchmal auch dendritische Form mit einem Durchmesser von ca. 10 µm. Sie haben bis zu 2,5 µm lange Zytoplasmafortsätze, die in den Intrazellularraum zwischen den umliegenden Keratinozyten reichen und über welche sie mit Desmosomen in Verbindung stehen (Halata *et al.* 2003). Eine Merkelzelle kann bis zu 50 dieser Fortsätze aufweisen. Sie sind häufig mit sensorischen Nervenenden assoziiert, so genannten *touch spots*, mit denen sie eine klassische chemische Synapse ausbilden (Kinkelin *et al.* 1999, Nakafusa *et al.* 2006) (s. Abb. 1.2). Im Zytoplasma von Merkelzellen befinden sich, akkumuliert an der Basalseite, viele neuroendokrine Granula. Sie enthalten Neuropeptide, Glykoproteine und biogene Amine wie Metenkephalin, *Vasoactive intestinal peptide* (VIP), *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), Synaptophysin und Substanz P (u.a. Fantini & Johansson 1995, Haeberle *et al.* 2004, Moll I. *et al.* 2005, Tachibana 1995).

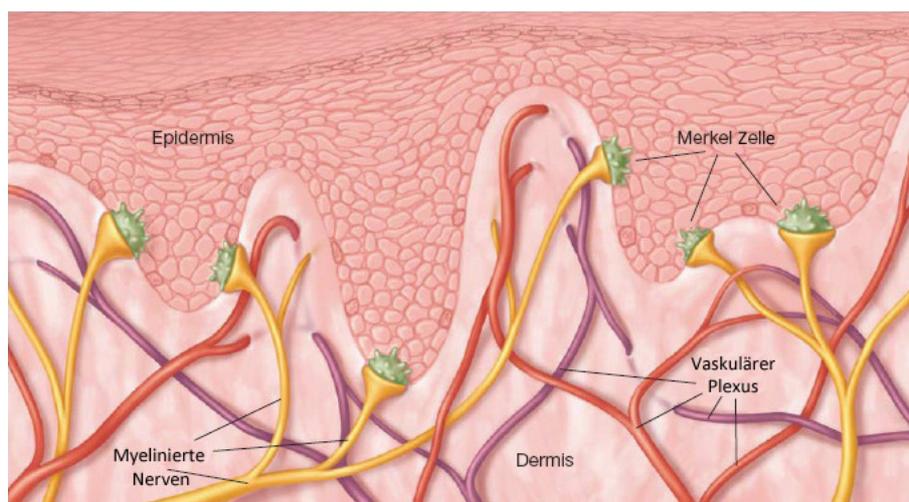


Abbildung 1.2: Lokalisation von Merkelzellen in der Basalzellschicht der Epidermis.

In der Epidermis sind Merkelzellen im *stratum basale* lokalisiert, wo sie mit sensorischen Nervenfasern assoziiert sein können und eine klassische chemische Synapse ausbilden (modifiziert nach Becker S. 2007).

Merkelzell-Axon-Komplexe funktionieren als langsam adaptierende Mechanorezeptoren. Für diesen Prozess werden neurosekretorische Substanzen aus den Merkelzellen freigesetzt, die als Neurotransmitter dienen. Erst vor kurzem konnte in Mäusen gezeigt werden, dass diese Mechanorezeptoren für die taktile Wahrnehmung verantwortlich sind (Maricich *et al.* 2009). Ob dies auch auf humane Merkelzellen zutrifft, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. In Lokalisationen, in denen die Merkelzellen keine Assoziation zu Nerven zeigen, scheinen sie endokrine oder parakrine Sekretionsprozesse auszuüben. In Gaumenschleimhaut von Nagetieren wurde der ultrastrukturelle Beweis für die Exozytose von Granula aus der Merkelzelle von Tachibana und Kollegen erbracht (Tachibana *et al.* 1997), in menschlicher Haut fehlt der Nachweis bisher. Es konnte außerdem *in vitro* gezeigt werden, dass Neuropeptide wie das VIP oder Substanz P das Zellwachstum und die Differenzierung verschiedener kutaner Zellen, wie z. B. Keratinozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen, fördern (Haegerstrand *et al.* 1989, Nilsson *et al.* 1985).

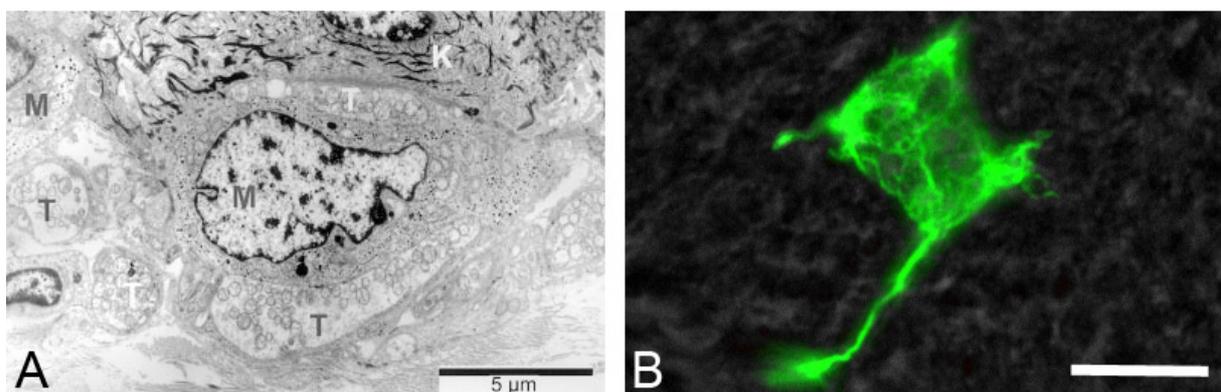


Abbildung 1.3: Elektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Merkelzelle

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Merkelzelle (M) in der Epidermis eines *touch spots* eines humanen Augenlids. Die Merkelzelle steht im Kontakt mit den Keratinozyten (K) der Basalzellschicht sowie mit den die Zelle umgebende Nervenenden (T) (Halata *et al.* 2003). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit CK20 angefärbten Merkelzelle in der Basalzellschicht der Epidermis einer humanen Fußsohle. Der Größenbalken entspricht einer Größe von 10 µm.

Ein besonderes Merkmal der Merkelzellen sind die von ihnen exprimierten Cytokeratine (CK), die tonofibrillenartige Aggregate um den Nukleus bilden (Tachibana & Nawa 2002). CK 8, 18, 19 oder 20 werden häufig zur Identifikation der Merkelzellen verwendet (Moll I. *et al.* 1995, Moll R. *et al.* 1984, Saurat *et al.* 1984). Alle diese CKs gelten als spezifische Marker für die Merkelzelle, wobei CK 20 das einzige CK ist, das, sowohl beim Menschen (Moll I. *et al.*

1995) als auch bei Nagern (Moll I. *et al.* 1996), von keiner anderen Zelle in der Haut exprimiert wird. Die CK20-Färbung einer Merkelzelle in der Basalschicht der Epidermis sowie eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Merkelzelle in Kontakt mit den umliegenden Keratinozyten und Nervenfasern sind in Abb. 1.3 gezeigt.

1.2 Das Merkelzellkarzinom

Das Merkelzellkarzinom (MCC) wurde zum 1. Mal von Toker im Jahre 1972 als trabekuläres Karzinom der Haut beschrieben (Toker 1972). Heute wird es meistens Merkelzellkarzinom oder neuroendokrines Karzinom der Haut genannt, aber auch Namen wie kutanes APUDoma, primäres Kleinzellkarzinom, primäres undifferenziertes Hautkarzinom, anaplastisches Hautkarzinom oder dunkles Zellkarzinom sind noch geläufig (Haag *et al.* 1995).

Das MCC ist ein Karzinom des höheren Alters (mittleres Lebensalter ca. 70 Jahre). Man findet es hauptsächlich auf sonnenexponierter Haut, etwa 40% an den Extremitäten und mehr als 50% an Kopf und Nacken (Feun *et al.* 1988, Messina *et al.* 1997), dabei sind im Gesicht vor allem die Augenlider betroffen (Soltau *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu kommen weniger als 10% der MCCs im Rumpfbereich vor (Gollard *et al.* 2000, Raaf *et al.* 1986, Skelton *et al.* 1997). Die Tumorinzidenz ist stark zunehmend, derzeit ca. 0.4/100.000/Jahr und gleich häufig bei beiden Geschlechtern. Die UV-Karzinogenese spielt eine wichtige Rolle (Cerroni & Kerl 1997, Hewitt J. B. *et al.* 1993, Iacocca *et al.* 1998, Miller & Rabkin 1999), aber auch eine Immunsuppression ist ein Risikofaktor. MCC kommen z. B. bei organtransplantierten oder HIV-Patienten viel häufiger (12/100.000/Jahr) und in deutlich jüngerem Alter (ca. 50% < 50 Jahre) vor (Bordea *et al.* 2004, Buell *et al.* 2002, Engels *et al.* 2002, Kanitakis *et al.* 2006a, Kanitakis *et al.* 2006b, Penn & First 1999).

1.2.1 Klinische Manifestation und Prognose

Erste Anzeichen eines MCCs sind schnell wachsende, nicht schmerzende, feste, nicht empfindliche, rundlich geformte, manchmal vereiterte Hautknoten. Sie haben eine rötliche

oder bläuliche Farbe und sind bis zu einigen Zentimetern groß. Beispiele für typische MCCs sind in Abb. 1.4 zu sehen.

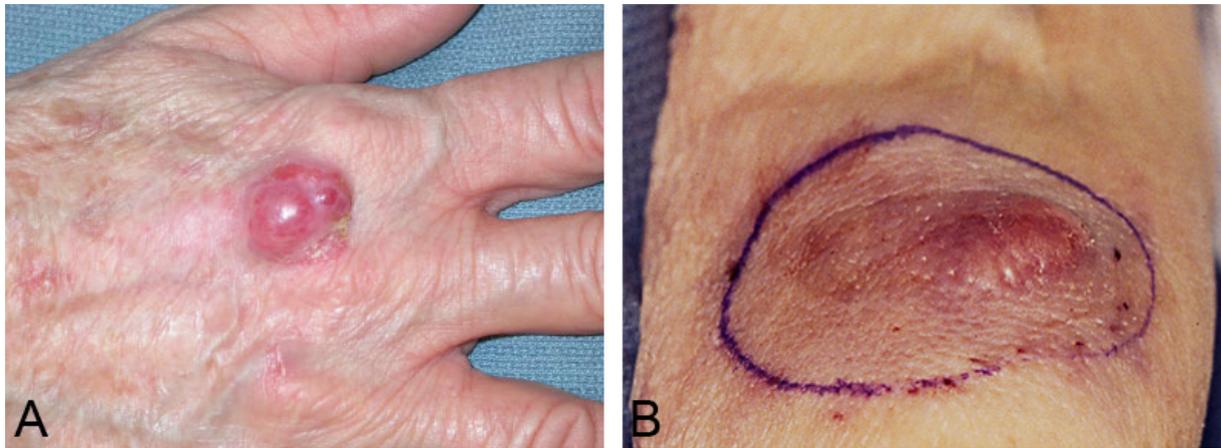


Abbildung 1.4: Merkelzellkarzinom auf dem Handrücken (A) und am Unterarm (B)

Abbildung 1.4 (A) zeigt ein primäres MCC auf dem Handrücken (Bichakjian *et al.* 2007), 1.4 (B) zeigt ein großes MCC auf dem Unterarm (Shea CR). Typisch ist die rötliche, teilweise auch violette Färbung des festen knotigen Tumors, der, wie in den meisten Fällen, keine Ulzeration zeigt.

Das MCC ist ein stark metastasierender Tumor. Bei Diagnosestellung haben bereits über ein Drittel der Patienten Metastasen (30% regionale und Lymphknotenmetastasen und 10% Fernmetastasen, überwiegend in Leber, Lunge, Knochen, Gehirn) (Bichakjian *et al.* 2007, Veness 2006, Weisser *et al.* 2007). Die Fünfjahresüberlebensrate von MCC-Patienten beträgt 75 % für Betroffene mit Primärtumoren, 59 % für Betroffene mit Lymphknotenmetastasen (und/oder Lokalrezidive) und 25% bei Patienten mit Fernmetastasen. Die meisten Rezidive treten während der ersten zwei Jahre auf (Hitchcock *et al.* 1988, Sibley & Dahl 1985).

Bisher gibt es nur eine vorläufige Einteilung des MCC in drei Stufen der klinischen Manifestation (Boyle *et al.* 1995, Yiengpruksawan *et al.* 1991):

Stufe I: kutaner, lokalisierter Befall (IA \leq 2cm, IB $>$ 2cm)

Stufe II: Befall der regionalen Lymphknoten

Stufe III: Systemische Metastasen

1.2.2 Pathologie und Diagnose

Im Gegensatz zu Merkelzellen sind MCCs hauptsächlich in der Dermis lokalisiert, von der sie bis ins subkutane Fettgewebe wachsen können. Nur in Ausnahmen kann eine Ausdehnung

bis in die Epidermis beobachtet werden (Silva *et al.* 1984). Die Tumorzellen selbst haben hyperchromatische Nuclei, sehr feines Chromatin und wenig Zytoplasma. Das Tumorgewebe ist durch viele Mitosen und Apoptosen gekennzeichnet. Allgemein sind die Tumorzellen des MCCs den Merkelzellen sehr ähnlich, weshalb die Entstehung des MCC aus Merkelzellen für wahrscheinlich gehalten wird (Tang C. K. & Toker 1978, Warner *et al.* 1983). Unterschiede gibt es allerdings in ihrer Lokalisation innerhalb der Haut und in der Expression einiger Neuropeptide. Merkelzellen exprimieren im Gegensatz zu MCC Zellen das vasoaktive intestinale Peptid und Metenkephalin (Hartschuh *et al.* 1983, Hoefler *et al.* 1984). Die Expression der Neuron-spezifischen Enolase (NSE) hingegen haben beide Zellen gemeinsam (Gu *et al.* 1981, Kurokawa *et al.* 2003).

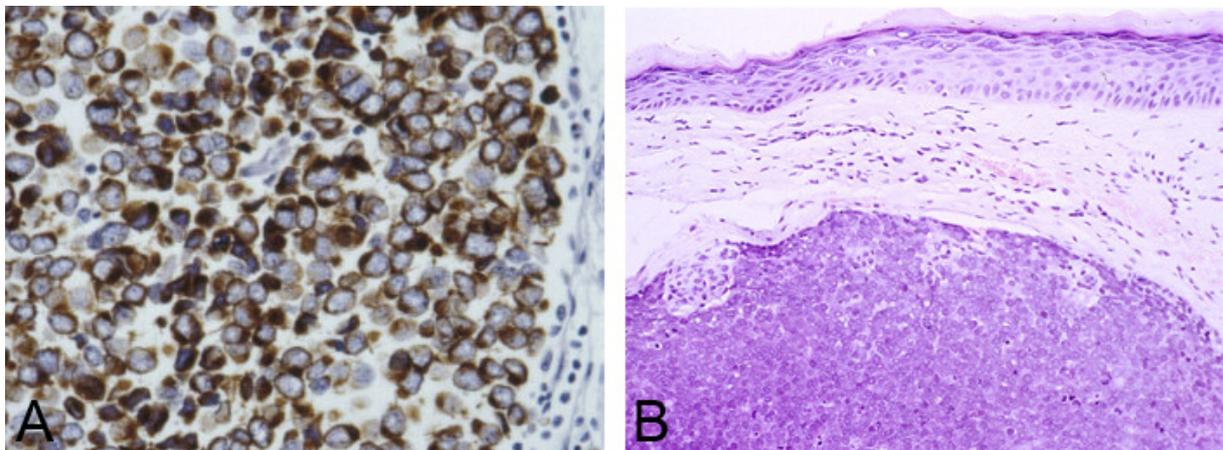


Abb.1.5: Histologische Darstellung des MCC

(A) Die CK20-Immunfärbung eines MCCs zeigt charakteristische paranukleäre, punktförmige Bereiche. Vergrößerung: 400 x (Bichakjian *et al.* 2007). (B) Hämatoxilin und Eosin (HE) Färbung eines in der Dermis lokalisierten MCC. Eine Ausbreitung des Tumors bis in die Epidermis erfolgt nur sehr selten. Charakteristisch sind die runde Form der Zellen und die hyperchromatischen Nuclei (Shea CR).

Wie auch die Merkelzellen exprimieren die meisten MCC Zellen CK 20 (Leech *et al.* 2001, Tanaka *et al.* 2004), über das sich das MCC spezifisch diagnostizieren lässt (Su *et al.* 2002b). Des Weiteren exprimieren sie neuroendokrine Marker wie NSE (Gu *et al.* 1981), Synaptophysin und Chromogranin A. Außerdem werden epitheliales Membran-Antigen (Kurokawa *et al.* 2003), Neurofilament Proteine (Schmidt *et al.* 1998, Shah *et al.* 1993), CD117 (c-kit) (Su *et al.* 2002a) und BEP-EP4 synthetisiert. Charakteristisch für MCC-Zellen ist, dass sie keinen Transkriptionsfaktor TTF-1 exprimieren, wohingegen dieser Marker im sehr ähnlichen kleinzelligen Bronchialkarzinom positiv ist. Durch das TTF-1 lässt sich eine falsche

Diagnose des MCCs eindeutig ausschließen. Ebenso negativ im MCC sind weitere Tumormarker wie HMB 45, S 100, LCA, Vimentin, saures Gliafaser-Protein und Desmin negativ (Becker J. *et al.* 2008, Pectasides *et al.* 2006).

Grundsätzlich kann das MCC durch immunhistochemische Färbungen mit typischen Markern wie CK20 (Abb. 1.5 A), Pan-Neurofilament, Chromogranin A und NSE, HE-Färbung (Abb. 1.5 B) oder elektronenmikroskopische Aufnahmen diagnostiziert werden (Messina *et al.* 1997, Sibley & Dahl 1985). Dabei werden drei histologische Subtypen unterschieden: Der intermediäre Typ, der trabekuläre Typ und der kleinzellige Typ. Der intermediäre Typ ist am häufigsten (ca. 80 %). Die Tumorzellen sind mittelgroß, zeigen große, gelappte Zellkerne und wenig schwach gefärbtes Zytoplasma. Die Mitoserate ist meist hoch, während Nekrosen selten sind. Der klassische, ursprünglich trabekuläre Typ tritt nur selten auf (ca. 10%). Charakteristisch sind große monomorphe Zellen, die trabekulär in der Dermis wachsen. Der dritte Subtyp ist ebenfalls selten (ca. 10% der Fälle) und zeichnet sich durch eine geringe Zellgröße, stark hyperchromatische Zellkerne und gelegentlich Nekrosen aus. Misch- und Übergangsformen zwischen allen drei Typen sind sehr häufig (Sidhu *et al.* 2005).

1.2.3 Das Merkelzellpolyomavirus (MCPyV)

Das häufige Auftreten des MCC bei immunsupprimierten und älteren Patienten ließ schon lange einen infektiologischen Ursprung zur Entstehung dieses Tumors vermuten. Im Jahre 2008 lieferte die Arbeitsgruppe um P. Moore in Pittsburgh den eindeutigen Beweis für diese Hypothese. Sie konnten zeigen, dass in ca. 80% aller MCCs die DNA eines Polyomavirus klonal integriert ist. Da dieses Virus mit keinem der bisher bekannten Polyomaviren übereinstimmt, wurde es Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) genannt (Feng *et al.* 2008). Die Häufigkeit, mit der das MCPyV in MCC auftritt, konnte bisher von vielen Arbeitsgruppen bestätigt werden (u.a. Becker J. C. *et al.* 2009b, Foulongne *et al.* 2008, Garneski *et al.* 2009, Kassem *et al.* 2008). Dies und die Tatsache, dass die virale DNA monoklonal ins Genom ihrer Wirtszellen integriert ist, lassen auf eine Rolle des Virus in der Pathogenese des Tumors schließen. Das MCPyV Genom kodiert für typische Polyomavirus Gene. Dazu gehören das große T-Antigen (LT-Antigen), das kleine T-Antigen (ST-Antigen) sowie die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 (Abb. 1.6 A). Vom SV40 Virus ist bekannt, dass das LT Antigen

Tumorsuppressorproteine und zellzyklusregulierende Proteine wie p53 oder Retinoblastoma (Rb) binden kann (Abb. 1.7). Dadurch reguliert das Virus sowohl seinen eigenen, als auch den Lebenszyklus der Wirtszelle. Diese virale Stimulation des Zellzyklus ist die größte Triebkraft des onkologischen Potentials von Polyomaviren (Caracciolo *et al.* 2006, Moens *et al.* 2007). Das MCPyV LT Antigen zeigt sehr viele Homologien zu dem LT Antigen onkogener Polyomaviren. Dazu zählt u.a. das LxCxE Motiv, das direkt unphosphoryliertes Rb binden kann (Feng *et al.* 2008). Polyomaviren induzieren häufig latente, nicht zu erkennende, Infektionen, die bei Immunsuppression zur Tumorgenese führen können (Ahsan & Shah 2006).

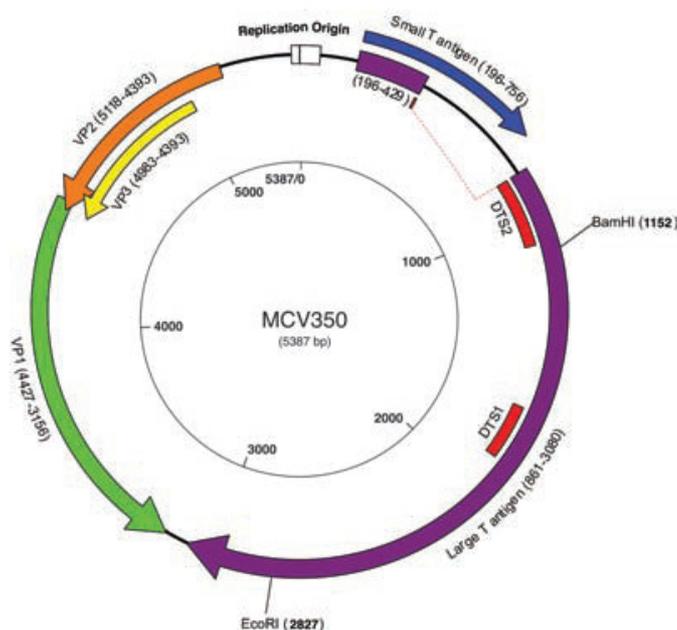


Abbildung 1.6: Schematisches Darstellung des MCPyV Genom

Die Abbildung zeigt schematische das Genom eines MCPyVs. Das Genom kodiert typische Polyomavirengene inklusive dem LT Antigen (lila) und dem ST Antigen (blau). Auch die Gene für die Strukturproteine VP1 (grün), VP2 (orange) und VP3 (gelb) sind darstellen (Feng *et al.* 2008).

Im Gegensatz zu allen bisher untersuchten onkogenen Polyomaviren wird im MCPyV eine verkürzte Form des LT Antigen synthetisiert. Diese entsteht aufgrund von Punktmutationen, die zu spontanen Stoppkodons führen können. Dadurch geht die p53 Bindungsstelle des LT Antigen verloren, die Rb-Bindungsstelle hingegen bleibt konserviert (Fischer *et al.* 2010, Shuda *et al.* 2008).

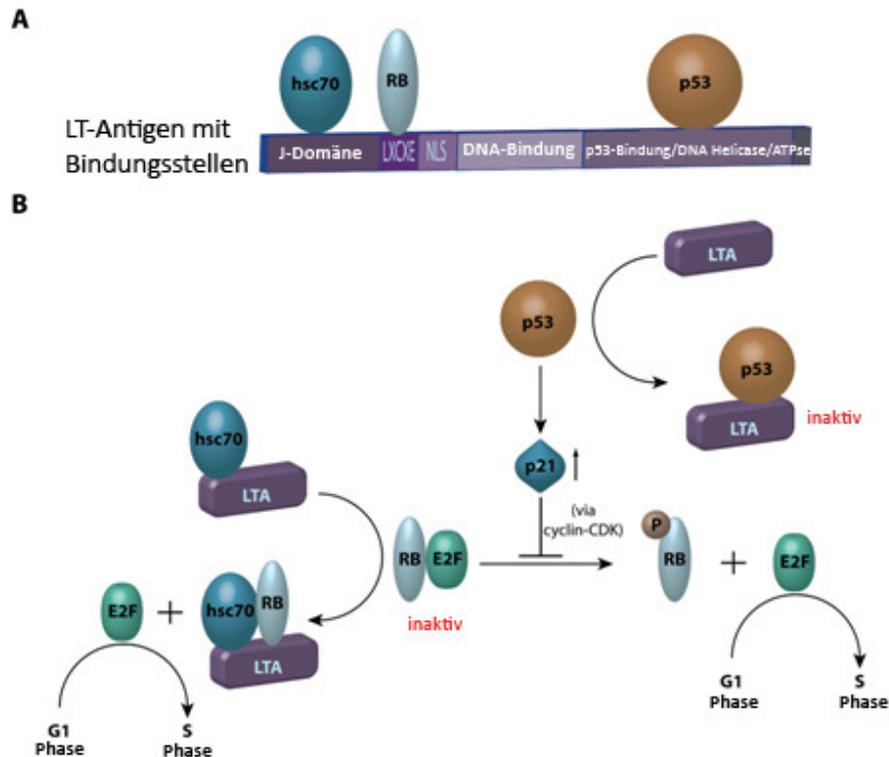


Abbildung 1.7 Regulation des Zellzyklus der Wirtszelle durch virale Proteine onkogener Polyomaviren

(A) zeigt die Bindungsstellen des LT Antigens für p53 an der DNA-Helikase/ATPase Domäne und die Bindungsstellen für Mitglieder der Rb Familien am LxCxE Motiv. Abbildung (B) zeigt schematisch den Einfluss des viralen LT Antigens auf die Zellzykluskontrolle der Wirtszelle. Der Transkriptionsfaktor E2F kodiert für Proteine, die die S-Phase des Zellzyklus einleiten. Er wird durch das Tumorsuppressorgen Rb inaktiviert, indem Rb E2F bindet. Bindet aber das virale LT Antigen an Rb verliert dieses seine Bindung an E2F, wodurch die Zelle aus der G1- in die S-Phase getrieben wird. Über die Bindung von p53 an das LT Antigen kann ebenfalls die Zellzykluskontrolle überwunden werden. P53 aktiviert normalerweise p21, welches die Phosphorylierung von Rb und somit auch die Dissoziation von Rb und E2F verhindert. LTA = LT Antigen, hsc70 = *heat shock protein 70* (Becker J. C. *et al.* 2009a).

1.2.4 Klassifizierung von Merkelzellkarzinom Zelllinien

Merkelzellkarzinom-Zelllinien (MCCL) dienen der besseren Untersuchung der sehr heterogenen MCCs. Sie werden aus Tumorgewebe, Primärtumoren oder Metastasen isoliert und kultiviert. Aufgrund ihrer sehr aufwändigen Kultivierung und dem sehr langsamen Wachstum der Zellen gibt es weltweit nicht sehr viele MCCL. In dieser Arbeit wurden die Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -7, -8, -9, -11, -12 und -15 untersucht, die alle in unserem Labor etabliert wurden. Die Linien MCCL-3, -5 und -6 wurden bereits 2002 beschrieben (Popp *et al.* 2002). Diese drei Zelllinien sind alle CK18 und CK20 positiv. Außerdem konnten bei MCCL-5

und MCCL-6 Mutationen im p53 Gen nachgewiesen werden. Die Zelllinie MKL-1 wurde 1987 aus einer Lymphknotenmetastase eines 26-jährigen Patienten etabliert (Rosen *et al.* 1987). Sie wurde als CK 8, CK 18 und CK 19 positive MCCL mit neurosekretorischen Granula und losen Zellaggregaten beschrieben.

Aufgrund ihres stark heterogenen Wachstums werden MCCL anhand biochemischer und morphologischer Kriterien in unterschiedliche Klassen eingeteilt (Leonard *et al.* 1993, Leonard *et al.* 1995). Die Einteilung in diese Klassen erfolgte wegen der Ähnlichkeit beider Zelllinien in Anlehnung an die Klassifizierung von Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, die bereits 1985 erfolgte (Broers *et al.* 1985, Carney *et al.* 1985, Gazdar *et al.* 1985a). Die Zelllinien lassen sich anhand ihrer biochemischen Unterschiede in klassische und variante Linien unterteilen. Klassische Zelllinien sind positiv für die neuroendokrinen Marker Chromogranin A und NSE und den epithelialen Marker CAM 5.2. Bei varianten Linien hingegen kann man einen selektiven Verlust dieser Marker beobachten, so dass diese Zelllinien negativ für Chromogranin A und auch teilweise für NSE und CAM 5.2 sind. Sowohl die klassischen als auch die varianten Linien verfügen wiederum über zwei Untergruppen (Typ I und II bzw. Typ III und IV), die über morphologische Merkmale der Zellen in Kultur zu unterscheiden sind. Die Typen I und II gehören zu den klassischen Linien, Typ III und IV zu den varianten Linien, wobei es auch Ausnahmen von varianten Typ I oder II, bzw. klassischen Typ III oder IV Zelllinien geben kann. Typ I ist durch dichte, Zellaggregate gekennzeichnet, die eine scharfe Begrenzung nach außen haben. Auch Zelllinien vom Typ II bilden Sphäroide, die aber etwas lockerer angeordnet sind. Zelllinien des Typ III bilden zweidimensionale lockere Aggregate, und Typ IV Linien sind durch Einzelzellen charakterisiert, die teilweise auch adhärent wachsen können (Leonard *et al.* 1993, Leonard *et al.* 1995).

1.3 Zell-Zellverbindungen

1.3.1 Tight Junctions und TJ-Proteine

Tight Junctions (TJs) sind die am weitesten apikal liegenden Zell-Zell-Verbindungen von Epithelzellen. Im Wesentlichen haben sie zwei wichtige Funktionen. Zum einen die Barrierefunktion, die den parazellulären Fluss von Molekülen und Ionen durch die Bildung einer größen- und ionenselektiven Barriere verhindert (Anderson 2001). Zum anderen trennen TJs in Kooperation mit assoziierten Polaritätskomplexen wie Par3/Par6/aPKC, Crumbs/PALS/PATJ und Scribble/Dlg/Lgl (Hurd *et al.* 2003, Lemmers *et al.* 2004, Qin *et al.* 2005) die Zellmembran in einen apikalen und einen basolateralen Bereich und sorgen damit für die Bildung und Aufrechterhaltung der Polarität der Zellen (Zaunfunktion) (als Übersichtsartikel s. Aijaz *et al.* 2006, Schneeberger & Lynch 2004, Shin *et al.* 2006). Zusätzlich sind TJ-assoziierte Proteine an Zellproliferation, Differenzierung und Vesikeltransport beteiligt (Matter *et al.* 2005).

Die TJ-Proteine lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Zu den Transmembranproteinen, die die Plasmamembranen jeweils einer der beiden beteiligten Zellen durchspannen, gehören Occludin (Furuse *et al.* 1993), Mitglieder der Claudin-Familie (Tsukita *et al.* 2001), die *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs) (Martin-Padura *et al.* 1998) und Tricellulin (Ikenouchi *et al.* 2005). Zusätzlich bestehen TJs aus intrazellulär gebundenen Proteinen wie den Zonula Occludens Proteinen 1-3 (ZO 1-3) (Balda & Anderson 1993, Stevenson *et al.* 1986), dem 7H6 Antigen (Zhong *et al.* 1993), Mupp-1 (Hamazaki *et al.* 2002) oder Cingulin (Citi *et al.* 1988). Ein schematischer Aufbau eines TJ-Komplexes ist in Abb. 1.8 dargestellt.

Als erstes TJ Transmembranprotein wurde Occludin im Jahr 1993 durch Furuse und Kollegen identifiziert (Furuse *et al.* 1993). Occludin, ein 65 kD 4-Transmembranprotein, wurde längere Zeit als das wichtigste Transmembranprotein für die Struktur von TJs angesehen, aber es konnte gezeigt werden, dass in Epithelzellen von Occludin knockout-Mäusen noch TJ-Stränge ausgebildet werden und ihre Barrierefunktion nicht beeinträchtigt ist (Saitou *et al.* 2000). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass Occludin an der Regulation der Permeabilität von TJs beteiligt ist (Hirase *et al.* 2001). Einige Jahre später wurde die Familie der Claudine entdeckt (Furuse *et al.* 1998, Morita *et al.* 1999) zu der derzeit 24 Mitglieder zählen (Hewitt K. J. *et al.* 2006). Die Claudine weisen, identisch zu Occludin, vier transmembrane Domänen

auf und scheinen tatsächlich für die Barriereigenschaften der TJs verantwortlich zu sein (Furuse *et al.* 2002, Tsukita & Furuse 2000b, Tsukita *et al.* 2001). Untersuchungen belegen, dass die spezifische Kombination einzelner Claudine für die unterschiedliche Permeabilität der TJs in den verschiedenen Geweben verantwortlich ist (Tsukita & Furuse 2000a). Ebenfalls zu den Transmembranproteinen zählt die Familie der *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs). 1998 wurde das erste Mitglied der Familie, JAM-A, entdeckt (Martin-Padura *et al.* 1998). Inzwischen wurden weitere Mitglieder der JAM-Familie identifiziert, JAM-B, JAM-C und JAM-4, die alle zur Immunglobulin Superfamilie gehören (Arrate *et al.* 2001, Aurrand-Lions *et al.* 2001, Cunningham S. A. *et al.* 2000).

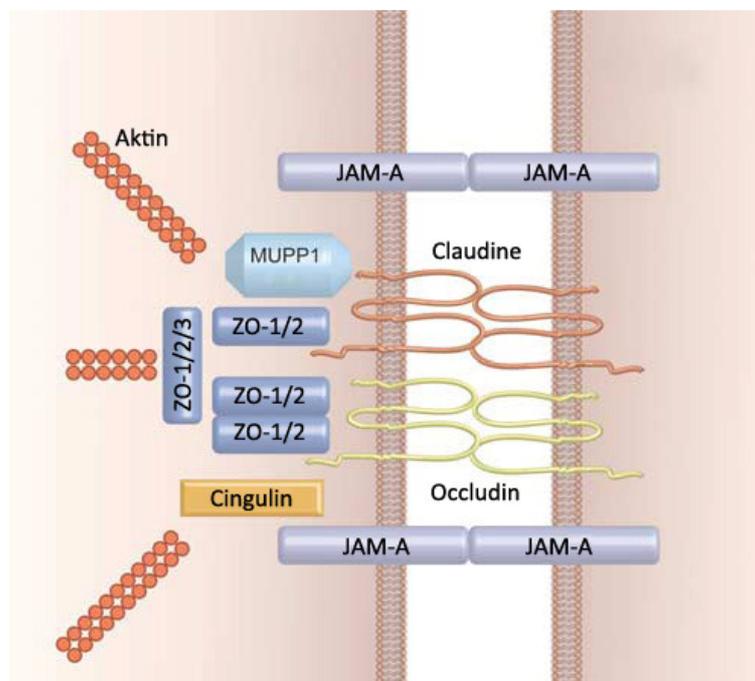


Abbildung 1.8: Schematischer Aufbau von TJs

Die Abbildung zeigt den beispielhaften Aufbau von TJs zwischen zwei benachbarten Zellen. Claudine und Occludin sind Proteine, die jeweils vier membrandurchspannende Regionen und zwei extrazelluläre *Loops* besitzen und die Zellen miteinander verbinden. Auch die Mitglieder der JAM-Familie sind Transmembranproteine. Intrazellulär sind die Proteine ZO-1 bis -3, Mupp-1 oder Cingulin lokalisiert, die die Transmembranproteine mit den Zytoskelett verbinden (modifiziert nach Niessen *et al.* 2007).

ZO-1 wurde erstmalig 1986 von der Arbeitsgruppe um Bruce R. Stevenson in Yale entdeckt (Stevenson *et al.* 1986). Es ist ein Protein, das in TJs auf der zytoplasmatischen Seite vorkommt. Es kann aber auch an Adhärenzverbindungen (AJ) lokalisiert sein. ZO-1 ist ein Mitglied der MAGUK-Familie (MAGUK = *membrane associated guanylate kinase homologue*) und hat am N-Terminus drei Amino (N)-terminale PDZ-Domänen, eine SH-3- und eine GUK-

Domäne. Des Weiteren verfügt ZO-1 über eine prolinreiche Domäne am C-Terminus. Mit seinen PDZ-Domänen kann es gezielt an den C-Terminus von Claudinen, ZO-2 und ZO-3 (Itoh *et al.* 1999) und das *Gap-Junction* Protein Cx43 binden (Giepmans & Moolenaar 1998, Hunter & Gourdie 2008). Über seinen C-Terminus kann es mit dem Aktinskelett interagieren (Schneeberger & Lynch 2004) und so als Verbindungsprotein zwischen Aktinfilamenten und Cadherin-Catenin-Komplexen (Itoh *et al.* 1997) bzw. Occludin (Fanning *et al.* 1998) fungieren. Umeda und Mitarbeiter (2006) konnten zeigen, dass die Anwesenheit von ZO-1 und/oder ZO-2, nicht aber ZO-3, für die Zusammenlagerung von Claudinen, die Ausbildung von TJ-Strängen und die Barrierefunktion wichtig ist.

1.3.2 Adhärenzverbindungen

Adhärenzverbindungen (*Adherens Junctions*, AJ) gewährleisten einen widerstandsfähigen mechanischen Zusammenhalt der Zellen, indem Calcium-abhängige Verbindungsproteine, die Cadherine, für die Adhäsion zwischen benachbarten Epithelzellen sorgen. Die Cadherine stellen eine Superfamilie transmembranärer Glykoproteine dar, die in Abhängigkeit von Ca^{2+} eine homophile Adhäsion zwischen Zellen vermitteln. Dabei liegen die Cadherine einer Zelle als cis-Homodimere vor und verbinden sich mit den entsprechenden Homodimeren einer anderen Zelle. Die Bindung erfolgt an der N-terminalen Domäne. Sie bilden eine dreidimensionale Netzstruktur aus, die oft als Cadherin-Reißverschluss bezeichnet wird.

Die klassischen Cadherine umfassen mindestens 15 Moleküle, wie zum Beispiel das N-, C-, P- und das E-Cadherin (Takeichi 1995). Das E-Cadherin, erstmals als L-CAM auf Leberzellen von Hühnerembryonen beschrieben (Bertolotti *et al.* 1980), ist das dominante Zell-Zell-Adhäsionsmolekül in den meisten Epithelien (Shimoyama *et al.* 1989). Die klassischen Cadherine konzentrieren sich in *Zonulae adhaerentes*, wo sie intrazellulär über Adapterproteine, die Catenine, mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind (s. Abb. 1.9). P120 Catenin und β -Catenin binden direkt an die Cadherine. Die Bindung von β -Catenin an Cadherine ist für die adhäsive Funktion unerlässlich und ist abhängig von der brückenbildenden Funktion zwischen dem Cadherin und dem Aktin-bindenden Protein α -Catenin (Aberle *et al.* 1996, Niessen 2007). Die desmosomalen Cadherine sind dagegen

intrazellulär über das γ -Catenin (auch Plakoglobin) mit den Intermediärfilamenten verbunden (Koch & Franke 1994).

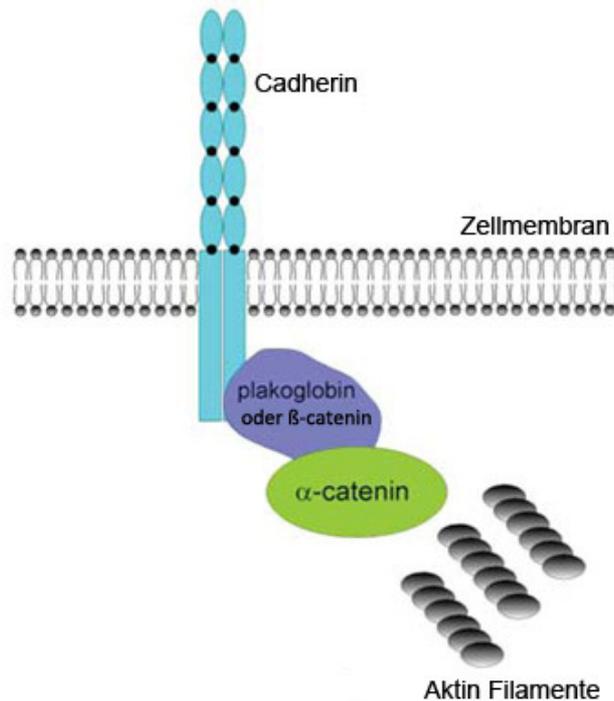


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des Cadherin-Catenin Komplexes

Cadherine sind über β -Catenin bzw. Plakoglobin und α -Catenin mit dem Zytoskelett der Zelle verankert (modifiziert nach Niessen 2007).

1.3.3 Regulation des Aufbaus von TJs

Die Bildung von TJs wird über E-Cadherin vermittelt, welches eine initiale Adhäsion zwischen zwei Zellen hervorruft. Diese E-Cadherin vermittelte Adhäsion ist Calcium abhängig. Zunächst kommt es zur Ausbildung von *primordialen* Zellverbindungen an der basolateralen Plasmamembran, die aus Bestandteilen von AJs und TJs bestehen. Bei Anwesenheit von Calcium aktiviert der Cadherin-Komplex den Par-Polaritätskomplex Par3/Par6/aPKC über den Rac-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktor Tiam1. Tiam1 interagiert mit Par3, welches an JAM-A gebunden ist, und fördert die Aktivität von Rac. Es kommt zur Aktivierung der atypischen Proteinkinase C (aPKC) durch Rac1 und zur Rekrutierung von JAM-A, Occludin und Claudinen, die sich schließlich von den AJ-Proteinen trennen und TJ-Stränge bilden (Macara 2004, Matter & Balda 2003, Mertens *et al.* 2006).

1.3.4 TJs und TJ-Proteine im MCC und anderen Tumoren

Der Verlust der TJ-Funktion ist ein häufiges Ereignis in der Tumorgenese. Abhängig vom Tumortyp können TJ-Proteine herunterreguliert, überexprimiert oder delokalisiert sein.

Durch eine abnormale Proteinexpression kann es zur Störung der Barrierefunktion und Zellpolarität kommen, dies kann das Gleichgewicht der Zelle verändern und somit die Tumorentstehung oder -progression fördern (als Übersichtsartikel s. Singh *et al.* 2010). Beim MCC kommt es zu einer Hochregulation von TJ-Proteinen. Klassische Merkelzellen sind negativ für die TJ-Proteine Cldn-1 bis -5, Occludin und ZO-1, die Expression JAM-A in Merkelzellen ist bisher noch unklar (Werling *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu findet man in Tumoren des MCC eine heterogene Verteilung von TJ-Proteinen. In einer Untersuchung von N. Haass an einer kleinen Fallzahl wurden die TJ-Proteine Cldn-3, -4 und 5 sowie Occludin und ZO-1 gefunden. Cldn-1 konnte in keinem Tumor nachgewiesen werden, obwohl dies das einzige TJ-Protein ist, das in der natürlichen Umgebung von Merkelzellen, im *stratum basale* der Epidermis, vorkommt (Haass *et al.* 2005b). In einer Studie mit einem deutlich größeren Kollektiv im Jahr 2010 wurde Cldn-1 in etwa 20% aller MCC identifiziert. Cldn-2 konnte bisher in keinem MCC gefunden werden. Cldn-3 ist in 63% und Cldn-4 in 12% der Tumore lokalisiert. Mit 86% ist Cldn-5 das TJ-Protein, das am häufigsten in MCCs gefunden wurde. Etwa 60% der Tumore sind positiv für JAM-A, 42% sind positiv für ZO-1 und 64% für ZO-2 (Werling *et al.* 2011).

Eine erhöhte Cldn-Expression wird häufig mit verstärkter Invasivität von Tumoren in Verbindung gebracht. Hier geht man davon aus, dass die Claudine mit membranständigen Matrixmetalloproteasen (MT-MMPs) interagieren und dadurch ihre Aktivität fördern (Miyamori *et al.* 2001). Beim Kolonkarzinom beispielsweise erhöht eine starke Cldn-1 Expression die Zellmigration und die Aktivität von MMP-2 und MMP-9. Tumor *Xenografts* Cldn-1 überexprimierender Zellen bildeten sehr viel mehr Metastasen als solche, die niedrige Level an Cldn-1 exprimieren (Dhawan *et al.* 2005). Andererseits gibt es auch Untersuchungen, die die Cldn-Expression in Tumoren mit geringerer Invasivität in Verbindung bringen. Bei einigen Tumoren wie dem Pankreaskarzinom, dem Kolonkarzinom oder Schilddrüsenkarzinom wurde die erhöhte Cldn-1 Expression mit einer geringeren Invasivität, einer geringeren Tumorgenese und einem niedrigeren metastatischen Potential

in Verbindung gebracht (de Oliveira *et al.* 2005, Iacobuzio-Donahue *et al.* 2002, Miwa *et al.* 2001). Ähnlich kontrovers wie bei Cldn-1 sind auch die Auswirkungen der Cldn-4 Hochregulation in Tumoren. Pankreaskarzinomzellen mit erhöhter Cldn-4 Expression zeigen eine verminderte Invasivität und ein geringeres metastatisches Potential (Michl *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu sind bei aggressiven Formen des Mammakarzinoms die Cldn-4 Level deutlich höher als in schwächeren Formen dieses Tumors (Lanigan *et al.* 2009). Für einige Tumore scheint die Überexpression von Claudinen ein frühes Ereignis der Tumorgenese zu sein. Die Vorstufe des Ösophagus Adenokarzinoms zeigt beispielsweise eine verstärkte Proteinexpression von Cldn-3, -4, und -7 (Montgomery *et al.* 2006). Dasselbe wurde für die Vorstufe des Adenokarzinoms des Magens gezeigt (Cunningham S. C. *et al.* 2006). Im Gegensatz dazu vermutet man bei der verminderten Expression von Claudinen in Tumoren, dass die Transformation der Zellen durch die Zerstörung von TJs und somit dem Verlust der Zell-Zell Adhäsion, gefolgt von einem Verlust der Differenzierung, unkontrollierter Proliferation und Invasivität eingeleitet wird (u.a. Gonzalez-Mariscal *et al.* 2007). Cldn-1 ist z.B. beim Mammakarzinom herunter reguliert (Kramer *et al.* 2000). Eine mögliche Erklärung für die starke Diskrepanz der Claudin Expression in den unterschiedlichen Tumoren kann auf die unterschiedlichen, gewebespezifischen Funktionen von Claudinen zurück geführt werden.

Ähnlich wie bei den Claudinen wurde in unterschiedlichen Tumoren eine Hoch- oder Herunterregulation von ZO-1 beobachtet. Beim Mamma- (Hoover *et al.* 1998, Sommers *et al.* 1992) und Kolonkarzinom (Kaihara *et al.* 2003) ist ZO-1 herunter, beim malignen Melanom (Smalley *et al.* 2005) und beim Pankreaskarzinom (Kleeff *et al.* 2001) ist es herauf reguliert. Gleichzeitig ist beim malignen Melanom eine erhöhte Invasivität von Kulturzellen gegenüber solchen Zellen zu beobachten, bei denen das ZO-1 Protein experimentell herunter reguliert wurde (Smalley *et al.* 2005). Allerdings ist das ZO-1 Protein in Zelllinien des Melanoms nicht an TJs, sondern an AJs lokalisiert.

Für das TJ-Protein Occludin konnte bisher in fast allen untersuchten Tumoren eine Herunterregulation gezeigt werden (u.a. Kimura *et al.* 1997, Tobioka *et al.* 2004b). Des Weiteren gibt es Indizien, dass der Verlust von Occludin zu onkogener Transformation von Zellen führen kann (Wang *et al.* 2005). Die verstärkte Expression von Occludin *in vivo* führt zu vermehrter Apoptose, was gleichzeitig Invasivität, Mobilität und das metastatische

Potential der Tumorzellen beeinträchtigt (Osanai *et al.* 2006). Dies lässt vermuten, dass Occludin ein mögliches Tumorsuppressorprotein ist.

TJ-Stränge wurden bereits im kolorektalen Karzinom (de Oliveira *et al.* 2005), beim hepatozellulären Karzinom (Swift *et al.* 1983) und für Schilddrüsenkarzinome (Kerjaschki *et al.* 1979) beschrieben. Bei letzteren konnte ein Verlust der TJ-Stränge in hoch anaplastischen Karzinomen und eine Korrelation der TJ-Stränge zur Differenzierung des Tumors beobachtet werden. Beim kolorektale Karzinom sind die Claudine 1-4 hochreguliert und trotzdem sind die TJ-Stränge dieser Tumore weniger dicht als die in der normalen kolorektalen Mucosa. Auch die Permeabilität dieser TJs ist gegenüber dem gesunden Gewebe erhöht (de Oliveira *et al.* 2005, Soler *et al.* 1999) und es konnte eine Herunterregulation von E-Cadherin beobachtet werden (de Oliveira *et al.* 2005). Es wird vermutet, dass die TJ-Funktion durch die Herunterregulation von Occludin und ZO-1 beeinträchtigt wird. Auch beim Hepatozellulären Karzinom kann eine Disorganisation von TJ-Strängen im elektronenmikroskopischen Gefrierbruch beobachtet werden (Swift *et al.* 1983), obwohl die Claudine 1, 2 und 7 vermehrt exprimiert werden (als Übersichtsartikel s. Singh *et al.* 2010). Generell ist in vielen Tumoren die Expression einzelner TJ-Proteine verändert, was auf eine wichtige Funktion dieser Proteine in der Tumorgenese einiger Tumore schließen lässt. Dabei kommt es häufig zur Herunterregulation von TJ-Proteinen, was in Fehlfunktionen der TJs resultiert. Im Gegensatz dazu sind im MCC die TJ-Proteine hochreguliert. Inwieweit diese Proteine funktionelle TJs ausbilden können und ob die Anwesenheit von TJ-Proteinen die Proliferation und Invasivität von Zellen beeinflusst, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.3.5 AJs und AJ-Proteine im MCC und anderen Tumoren

Zelladhäsionsmoleküle sind nicht nur an der Regulation von Zellverbindungen, sondern auch an allen Schritten der malignen Progression beteiligt. Durch Verlust und Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen geht die geordnete Gewebestruktur verloren, wodurch sich Zellen aus dem Gewebeverband lösen können (Behrens 1999, Handschuh *et al.* 1999, Takeichi 1993, Vleminckx *et al.* 1991). Eine Modifikation im Bereich der Zelladhäsion schließt zum Beispiel den Verlust des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin ein, welches bereits durch die Untersuchung vieler Tumorarten (u.a. Kolon-, Mamma- und Prostatakarzinom) publiziert

worden ist (Berx & Van Roy 2001, Paul *et al.* 1997). Auch für Hautkrebs konnte in immunhistochemischen Studien gezeigt werden, dass E-Cadherin im Melanomgewebe, verglichen mit Melanozyten und benignen Nävi signifikant vermindert bzw. völlig verloren gegangen ist (Sanders *et al.* 1999, Silye *et al.* 1998). In der Epidermis der Haut dient E-Cadherin der Interaktion zwischen Keratinozyten untereinander bzw. Keratinozyten und Melanozyten (als Übersichtsartikel s. u. a. Haass *et al.* 2005a) oder Merkelzellen (Werling *et al.* 2011). Vom Melanom ist bekannt, dass durch den Verlust der E-Cadherin Expression ein regulierender Einfluß der Keratinozyten verlorenggeht und die veränderten Melanozyten beginnen, unkontrolliert zu wachsen (Hsu *et al.* 1996, Poser *et al.* 2001, Silye *et al.* 1998). Wird eine Reexpression von E-Cadherin in Melanomzellen, z. B. durch Transfektion eines E-Cadherin Expressionsplasmids initiiert, so wird die Tumorentwicklung *in vivo* gestoppt und die Melanomzellen kehren zu einem normalen melanozytären Phänotyp zurück (Hsu *et al.* 2000). Diese Beobachtungen und Daten, die aus anderen Modellsystemen erhoben wurden, führten zu der Bezeichnung von E-Cadherin als Tumorsuppressor (Birchmeier & Behrens 1994). Zusätzlich zu dem Verlust von E-Cadherin, findet bei der Entwicklung vieler Tumore die Neuexpression von N-Cadherin statt, die das Adhäsionsverhalten der Zellen verändert. Die Zellen befinden sich durch den Verlust von E-Cadherin und der nun vorhandenen N-Cadherin Expression in einem destabilisiertem Zell-Zell Verband zu den umgebenden Zellen und werden invasiver und mobiler, wodurch sie sich von ihrem Primärtumor lösen. Dieser Cadherin "switch" führt zu einem neuen Bindungsvermögen der Zellen an Stromazellen, Endothelzellen und weiteren Zelltypen, die ebenfalls N-Cadherin an ihrer Zelloberfläche tragen (Li G. *et al.* 2001).

Im MCC wurden bisher die AJ-Proteine E-, N-, P- und VE-Cadherin sowie α - und β -Catenin und p120 untersucht. N-Cadherin konnte in einer Vielzahl der Tumore in drei verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Han *et al.* 2000, Tanaka *et al.* 2004, Werling *et al.* 2011). In zwei der drei Studien wurde N-Cadherin in mehr als 90% der Fälle nachgewiesen, in der dritten Studie aber nur in 63%. E-Cadherin wurde in den Arbeiten von Tanaka und Werling in 70% bzw. 67% aller untersuchten Tumore gefunden. Han und Kollegen detektierten E-Cadherin hingegen in 97% aller untersuchten MCCs. Dabei zeigt das Färbemuster von E-Cadherin nur in 57% eine Färbung an den Zellgrenzen der Tumorzellen, aber in 91% eine positive Färbung im Kern, entweder ausschließlich im Kern, oder zusätzlich zur Färbung an

den Zellgrenzen (Han et al. 2000). P-Cadherin wurde in 43% (Han et al. 2000) bzw. 65% (Werling et al. 2011) der bisher untersuchten Fälle nachgewiesen. Da normale Merkelzellen positiv für E- und P-Cadherin sind, N-Cadherin aber gar nicht exprimieren, gibt es Anlass zur Vermutung, dass es bei der Tumorgenese zum MCC auch zu einem Cadherin *switch* von E- und P- zu N-Cadherin kommt (Werling et al. 2011). Die Cadherin assoziierten Proteine α - und β -Catenin sowie das Protein p120 wurden von nahezu allen untersuchten Tumoren synthetisiert, VE-Cadherin hingegen konnte in keinem MCC nachgewiesen werden (Werling et al. 2011). Ähnlich wie TJ-Proteine sind auch AJ-Proteine in vielen Tumoren an der Tumorentstehung und -progression beteiligt. Deshalb sollen die Auswirkungen des Cadherin *switches* in MCC anhand von Zelllinien untersucht werden.

1.4 Ziel der Arbeit

Bei der detaillierten Untersuchung des MCC spielen Zelllinien eine wichtige Rolle. Sie sind unerlässlich bei Studien der Funktionalität von Molekülen, denn diese sind im Gewebe nur schwer durchführbar. Beim MCC spielen Zelllinien eine besonders große Rolle da es nur geringe Fallzahlen dieses Tumors gibt, was Korrelationen, beispielsweise der Metastasierung oder der Überlebensrate der Patienten, schwer macht. Die Arbeit an Zelllinien dieses Tumors macht viele Untersuchungen möglich, die an Tumorgewebe nicht durchführbar sind. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur sehr wenige MCCL beschrieben und untersucht, was aufgrund der großen Heterogenität dieser Zelllinien nicht für aussagekräftige Studien ausreicht. Deshalb steht in dieser Arbeit zunächst die Charakterisierung sechs neuer MCCL und die erweiterte Charakterisierung von drei schon in der Literatur beschriebenen MCCL, unter besonderer Berücksichtigung der Klassifizierung, der Morphologie, der Wachstumsgeschwindigkeit und der erst kürzlich entdeckten MCPyV-Infektion der Zelllinien im Vordergrund.

Des Weiteren gibt es viele Hinweise, dass TJ-Proteine eine Rolle in der Tumorgenese vieler Karzinome spielen. Von einzelnen TJ-Proteinen ist bekannt, dass ihre veränderte Expression zu stärkerer Invasion, vermehrter Metastasierung und schnellerem Wachstum von Tumorzellen führen kann. Aber es gibt kaum aussagekräftige Studien über die Beeinflussung der TJ-Funktion in Tumoren. Deshalb soll in dieser Arbeit das Expressionsmuster von TJ-

Proteinen in MCCL untersucht werden und gleichzeitig ihre Funktionalität *in vitro* überprüft werden. Zusätzlich wird die Auswirkung der TJ-Proteinexpression auf die Proliferation und Invasion der Zellen überprüft und TJ-Proteinmuster mit der Morphologie der Zelllinien korreliert.

2 Material

Die verwendeten Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad bezogen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle aufgeführten Puffer und Lösungen in Aqua bidest. angesetzt und der pH-Wert mit Hilfe von 25%iger Salzsäure eingestellt. Für die Zellkulturarbeiten wurde grundsätzlich steriles PBS von der Firma Biochrom AG verwendet.

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerätename	Gerätetyp	Hersteller
Cytospin	Shandon Cytospin® 3	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
Deckgläser	Superior, 20 x 38 mm bzw 24 x 60 mm	Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, DE
Feinwaage	Sartorius BL3100	Sartorius AG, Göttingen, DE
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2 mit CCD-Kamera	Zeiss GmbH, Jena, DE Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, DE
Geldokumentationsanlage	Gene Genius System	Syngene, Cambridge, UK
Heizblock	Thermoblock Uno	Biometra, Göttingen, DE
Kryostat	Leica CM 3050	Leica Camera AG, Solms, DE
Lichtmikroskop, invers	Leica DMIL	Leica Camera AG, Solms, DE
Markierungsstift für Gefrierschnitte	Liquid Blocker Super PAP Pen	Daido Sangyo Co., Higashicho, JPN
Lichtmikroskop, Auflicht	Leica DM LS	Leica Camera AG, Solms, DE
Objektträger	SuperFrost/Plus	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, DE
Digitalkamera	Olympus Camedia C-5050	Olympus, Hamburg, DE

Digitalkamera	Leica EC3	Leica Camera AG, Solms, DE
pH-Meter	Knick 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH&Co., Berlin, DE
Photometer	Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech, Freiburg, DE
Pipetten	Eppendorf Research 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Röntgenröhre	RS 225	Gulmay Medical, Camberley, UK
Sterilwerkbank	Haereus HERA safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Multiwell Platten	Multiwell™, 6-, 12-, 24- und 96-well	BD Labware, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipetten	sterile Pipetten (2,5, 5, 10 und 25 ml)	BD Labware, Franklin Lakes, USA
SpeedVac	Bachofer Vacuum Concentrater	Bachofer, Reutlingen, DE
Tischwaage	Sartorius BL610	Sartorius AG, Göttingen, DE
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Brutschrank	Zellkultur Wärmeschrank (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus Instruments (Thermo Fisher Scientific), DE
Zellkulturflaschen	25 cm ² und 75 cm ²	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Zentrifuge	Labofuge 400e	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE

2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Biesterfeld Chemiedistribution, Hamburg, DE
Agarose	Cambrex Bio Science, Charles City, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg, DE
Bacitracin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE
β -Mercaptoethanol	Fluka, Hamburg, DE
Benzonase [®]	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, DE
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Coomassie Brilliant Blau G250	Fluka, Hamburg, DE
di-Natriumhydrogensulfat-DiHydrat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Shandon Cryomatrix	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol (reinst)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol (vergällt)	Walter-CMP GmbH, Hamburg, DE
EZ-Link [™] Sulfo-NHS-LC-Biotin	Fisher Scientific, Schwerte, DE
Fluoromount G [™]	Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe, DE
Glycin	Roth, Karlsruhe, DE
Igepal	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
Immersol [™] 518N	Zeiss GmbH, Jena, DE
Isopentan	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE

Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, DE
Methanol	JT Baker, Deventer, NL
Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, NL
N,N,N',N'Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE
Pepstatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE
Petroleumbenzin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE
Salzsäure (HCl)	Riedel-de Haen, Seelze, DE
SDS	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE
Trizma [®] Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE
Tween	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Wasser, DEPC-behandelt	Eppendorf, Hamburg, DE
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL

2.3 Zellkulturmaterialien

Substanz	Hersteller
Apo-transferrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, DE

Collagen I rat tail (1,1 mg/ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Depot H Insulin (400I.E.-human)	Hoechst GmbH, Frankfurt a. M., DE oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE
EDTA (1%)	Biochrom AG, Berlin, DE
EMEM (10x)	BioWhittaker, Walkersville, USA
fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, DE
KGM 2 (1x)	Promocell, Heidelberg, DE
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG, Berlin, DE
Natriumbicarbonat 7.5%	BioWhittaker, Walkersville, USA
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, DE
RPMI 1640 Medium (1X)	Biochrom AG, Berlin, DE
Steriles PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, DE
Trypsin / EDTA (0,05% /0,02%)	Biochrom AG, Berlin, DE

2.4 Kits

Folgende Kits wurden im Verlauf dieser Arbeit benutzt und, wenn nicht anders beschrieben, nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Name des Kits	Hersteller
ApopTag® Fluorescein Direct in Situ Apoptosis Detection Kit	Chemicon, Billerica, USA
Cell Proliferation Elisa, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
iQ-Supermix	Bio-Rad, München, DE
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München, DE

Quick Cell Proliferation Assay Kit	Biocat, Heidelberg, DE
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hamburg, DE
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Hamburg, DE

2.5 Primer

Tabelle 2.1: Verwendete PCR-Primer und ihre Sequenzen

In dieser Tabelle sind alle verwendeten Primer (*sense* und *antisense*) und ihre Sequenzen in 5'-> 3' Richtung dargestellt.

Primer	Sequenz / Taqman [®] -Sonde
Cldn-1	<i>sense</i> : GCTCTAGAATTCGGCCAACGCGGGGCTGCAGC <i>antisense</i> : GCTCTAGAATTCCTTCATGCCAACGGTGGCCAC
Cldn -2	<i>sense</i> : GCTCTAGAATTCGTGTGCCTGGCACTGTTACAG <i>antisense</i> : GCTCTAGAATCCCCCTCAATGTATAAATTGC
Cldn -3	<i>sense</i> : AAGGTGTACGACTCGCT <i>antisense</i> : AGTCCCGGATAATGGTGTG (Morita <i>et al.</i> 2008)
Cldn -4	<i>sense</i> : GCTCTAGAATTCGTTCTGCTCACACTTGCTGG <i>antisense</i> : GCTCTAGAATCCGCGCAGCACAGCATGACGG
Cldn -5	<i>sense</i> : GAGGCGTGCTCTACCTGTTT <i>antisense</i> : GACTTCACGGGGAAGCTGA (Morita <i>et al.</i> 2008)
Occludin	<i>sense</i> : GCTCTAGAATTCGGACCATAACCCCGGAAGCC <i>antisense</i> : GCTCTAGAATTCGGGGTGTGAAAGTTTAGTTC
Cldn-1 human	Hs01076359_m1
Cldn-4 human	Hs00533616_s1
Jam-A human	Hs00170991_m1
Occludin human	Hs00170162_m1
ZO-1 human	Hs01551876_m1
18S human	Hs99999901_s1

Die Primer für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (USA) oder Gibco/Invitrogen (USA) bezogen. Für die quantitative Real-time PCR wurden FAM™-markierte TaqMan®-Sonden der Firma Applied Biosystems (USA) benutzt. Als Kontrolle für die Spezifität der Primer diente cDNA normaler Haut und Aorta (Invitrogen) sowie Keratinozyten aus der Zellkultur und genomische DNA (Novagen).

2.6 Antikörper

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper.

Die Bezugsquelle, die Spezies und der Name des Klons sowie die jeweils verwendete Verdünnung für Westernblot (WB) und/oder Immunfluoreszenz (IF) sind für jeden Antikörper angegeben.

Antigen	Firma	Spezies	Klon	Verdünnung
α -Tubulin	Calbiochem	Maus	DM1A	1:250 (WB)
β -actin	Sigma	Maus	AC-15	1:500 (WB)
E-Cadherin	Zymed	Ratte	ECCD-2	1:100 (WB)
N-Cadherin	Zymed	Maus	3B9	1:75 (IF) 1:100 (WB)
P-Cadherin	BD Transduction Laboratories™	Maus	56	1:1000 (WB)
Claudin-1	Zymed	Kaninchen	polyklonal	1:80 (IF) 1:200 (WB)
Claudin-2	Zymed	Maus	12H12	1:100 (WB)
Claudin-3	Zymed	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)
Claudin-4	Zymed	Kaninchen	polyklonal	1:80 (IF)
Claudin-4	Zymed	Maus	3E2C1	1:80 (IF) 1:400 (WB)
Claudin-5	Zymed	Kaninchen	Z43.Jk	1:200 (WB)
Chromogranin A	Lifespan Biosciences	Maus	LK2H10	1:200 (IF)
Cytokeratin 20	Progen	Maus	ITKs20.10	1:100 (IF) 1:50 (WB)
Cytokeratin 20	Epitomics	Kaninchen	EPR1622Y	1:100 (IF)

Jam-A	R+D	Ziege	AF1103	1:80 (IF) 1:100 (WB)
Ki67	DAKO	Maus	MIB-1	1:20 (IF)
MCPyV LT-Ag	Santa Cruz	Maus	CM2B4	1:500 (WB)
Neuron Spezifische Enolase	Gene Tex	Maus	5A4	1:200 (WB)
Occludin	Invitrogen	Maus	OC 3F10	1:80 (IF) 1:300 (WB)
p53	Santa Cruz	Ziege	polyklonal	1:500 (WB)
Par 3	Upstate	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)
PARD6A	Santa Cruz	Ziege	polyklonal	1:100 (WB)
Retinoblastoma	Epitomics	Kaninchen	E194	1:200 (IF)
aPKC ζ	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	1:500 (WB)
ZO-1	Zymed	Kaninchen	polyklonal	1:80 (IF) 1:100 (WB)
ZO-2	Zymed	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper

Das Antikörper-Konjugat, die Bezugsquelle, die Spezies und die jeweils verwendete Verdünnung für Westernblot (WB) und/oder Immunfluoreszenz (IF) sind für jeden Antikörper angegeben.

Antikörper-Konjugat	Firma	Spezies	Verdünnung
Alexa-488 F(ab') ₂	Invitrogen	Ziege gegen Maus	1: 600 (IF)
Alexa-488 IgG (H+L)	Invitrogen	Ziege gegen Meerschweinchen	1: 600 (IF)
Alexa-488 F(ab') ₂	Invitrogen	Ziege gegen Kaninchen	1: 600 (IF)
Alexa-594 F(ab') ₂	Invitrogen	Ziege gegen Maus	1:1250 (IF)
Alexa-594 F(ab') ₂	Invitrogen	Ziege gegen Kaninchen	1:1250 (IF)
Cy ³ IgG	JIR Dianova	Esel gegen Ziege	1:500 (IF)
Meerrettichperoxidase	JIR Dianova	Ziege gegen Maus	1:5000 (WB)
Meerrettichperoxidase	JIR Dianova	Ziege gegen Kaninchen	1:5000 (WB)
Meerrettichperoxidase	JIR Dianova	Esel gegen Ziege	1:2500 (WB)

Als Negativkontrollen in der Immunfluoreszenz dienten Antikörper-Isotypen von der Firma Dako (Hamburg), die entsprechend der Proteinkonzentration des Primärantikörpers eingesetzt wurden.

2.7 Kulturzellen

2.7.1 Humane Fibroblasten und Keratinozyten

Infante humane Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus infanten Vorhäuten als Primärkulturen angelegt. Die Verwendung der Proben wurde autorisiert vom Ethikkomitee der Ärztekammer Hamburg (060900). Konfluent gewachsene Fibroblastenkulturen wurden röntgenbestrahlt als Fütterzellen (Feederlayer) für die Merkelzellkarzinomzelllinien (MCCL) benutzt. Keratinozytenkulturen dienten als Positivkontrolle für immunhistochemische Färbungen und Westernblots.

2.7.2 Merkelzellkarzinom Zelllinien

Die Merkelzellkarzinom Zelllinien sind, mit Ausnahme der Linie MKL-1, in unserem Labor etablierte Zelllinien. Sie wurden entweder aus Metastasen oder Primärtumoren des Merkelzellkarzinoms angelegt.

Das Tumormaterial stammt aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und wurde zur Diagnosestellung entnommen. Die Verwendung des Materials wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg (WF08/08) genehmigt. Herkunft und Lokalisation des Tumors sowie Alter des Patienten sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Alle Zelllinien waren kryokonserviert und wurden zu Versuchszwecken aufgetaut.

Tabelle 2.5: Übersicht über die Herkunft der verwendeten Merkelzellkarzinom Zelllinien.

Der Name der Zelllinie, die Art des Tumors aus dem die Zellen isoliert wurden, die Lokalisation des Tumors sowie Alter und Geschlecht des Patienten sind angegeben.

Name der Zelllinie	Art des Tumors	Lokalisation des Tumors	Alter und Geschlecht des Patienten bei Tumorentfernung
MCCL-3	Metastase	Gesäß	70 Jahre, weiblich
MCCL-5	Primärtumor	Schlüsselbein	90 Jahre, männlich
MCCL-6	Primärtumor	Wade	72 Jahre, männlich
MCCL-7	Metastase	Lymphknoten	79 Jahre, weiblich
MCCL-8	Metastase	Lymphknoten, Leiste	80 Jahre, weiblich
MCCL-9	Metastase	Dünndarm	92 Jahre, weiblich
MCCL-11	Metastase	Lymphknoten	40 Jahre, weiblich
MCCL-12	Metastase	Abdomen	73 Jahre, männlich
MCCL-15	unbekannt	Oberarm	82 Jahre, männlich

2.8 Software

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Software Openlab 9.0.1 (Improvision, Coventry, UK) eingesetzt. Für die digitale Datenverarbeitung wurden die Microsoft Office Programme MS Word, MS Excel und MS Powerpoint verwendet. Optische Auswertungen der Westernblots wurden mit Hilfe der Software ImageJ (NIH) vorgenommen. Für die Bearbeitung von Bildern und Fotos wurde die Software Adobe Photoshop in der Version 7.0.1 von Adobe Systems Incorporated (San Jose, USA) verwendet.

2.9 Statistische Auswertungen

Ausgewertete Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des gepaarten und ungepaarten Student's t-Test berechnet, wobei ein p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant definiert wurde.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Anlegen und Kultivieren von humanen Fibroblasten

Infante humane Fibroblasten wurden immer aus infanten humanen Vorhautbiopsien gewonnen. Dazu wurde die Vorhaut mit einem Skalpell in kleine Stücke ($<1\text{mm}^2$) geschnitten und mit 2,5 ml RPMI komplett Medium (s. Tabelle 3.1) in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm^2) gegeben. Im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 wurden sie dann für mindestens 7 Tage unberührt stehen gelassen. Waren nach dieser Zeit aus den Hautstücken Zellen heraus gewachsen, wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter im Brutschrank kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Konfluente Zellkulturflaschen wurden mit 0.05% Trypsin/ 0.02% EDTA für 3 min inkubiert und die abgelösten Zellen auf 3 neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Für die Anzucht der Keratinozyten wurde das Gewebestück zunächst vom subkutanen Fettgewebe befreit, in PBS gewaschen und mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Nach Inkubation über Nacht in einer $0,25\%$ iger Trypsin-Lösung bei 4°C , konnte die Epidermis von der Dermis gelöst werden. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden die Epidermis-Stückchen dann in 5 ml 10% igem fötalem Kälberserum (FCS) suspendiert, wobei sich die Keratinozyten aus dem Gewebeverband lösten. Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Zellsuspension bei $800 \times g$ für 5 min zentrifugiert und mit Keratinozytenwachstumsmedium (*Keratinocyte growth medium 2* (KGM) von Promocell) auf die erwünschte Zelldichte eingestellt. Für die Kultivierung wurden jeweils ca. 10^6 Zellen/ml in eine 10er Petrischale (Falcon) eingesät und auf 10 ml mit KGM aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank, wobei das Medium alle zwei Tage erneuert wurde. Die Keratinozytenkulturen dienten als Positivkontrolle für immunhistochemische Färbungen und Westernblots.

Eingefroren wurden die Zellen in Suspension in ihrem jeweiligen Medium plus 10% FCS und 10% DMSO zunächst für 24 Stunden in einer Einfrierbox bei -80°C und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

3.1.2 Bestrahlung von Fibroblasten

Fibroblasten dienten als *Feeder*-Zellen für die Merkelzellkarzinom Kulturen. Damit sie die Merkelzellen nicht überwuchern, wurden sie bestrahlt, wodurch ihr Wachstum unterbunden wurde. Ihr Stoffwechsel blieb durch diese Prozedur jedoch unbeschadet, so dass die Fibroblasten weiterhin für die Merkelzellkarzinomzellen wichtige Stoffe ins Medium abgaben.

Eine konfluente 75 cm^2 Kulturflasche mit Fibroblasten wurde in einer Styroportransportbox in die Abteilung Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie des UKE Hamburg gebracht. Hier wurden die Zellen mit dem Gulmay RS 225 bei einer Röhrenspannung von 200 kV und einer Röhrenstromstärke von 15 mA unter Verwendung eines Filters von 5 mm Cu zusätzlich zum Röhreneigenfilter von 0,8 mm Be 20 min lang bestrahlt. Die Dosisrate war 0,8 Gy/min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Medium der Zellen erneuert und diese im Brutschrank weiterbebrütet. Frühestens am nächsten Tag wurden die Zellen dann als *Feederlayer* verwendet.

3.1.3 Kultivierung von Merkelzellkarzinom-Zelllinien (MCCL)

Es wurden die Merkelzellkarzinom-Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -7, -8, -9, -11, -12, -15 und MKL-1 kultiviert. Die Merkelzellkarzinom-Zellen wuchsen auf einem *Feederlayer* aus humanen Fibroblasten. Hierzu wurde ein aufgetautes Kryoröhrchen pro Linie auf eine 25 cm^2 Zellkulturflasche mit konfluentem *Feederlayer* gesetzt und in MCC-Medium (s. Tabelle 3.1) kultiviert. Die Zellen wurden ca. 3 Mal pro Woche gefüttert. Dabei wurden abwechselnd 4 ml Medium zugefüttert oder das komplette Medium aus der Flasche in ein Falcon-Röhrchen überführt, 5 min bei $800 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet resuspendiert und zurück auf den *Feederlayer* gegeben. Der *Feederlayer* musste alle 6-8 Wochen erneuert werden.

Die Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -9 und MKL-1 wachsen auch ohne *Feederlayer*. Die Behandlung der Zellen erfolgte hier aber genauso wie die Behandlung der anderen Zelllinien.

Tabelle 3.1: Verwendete Zellkulturmedien und ihre Zusammensetzung

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
RPMI komplett	1% Pen-Strep 1% L-Glutamin 10 % FBS in RPMI Medium
MCC-Medium	1% Pen-Strep 1% L-Glutamin 1% Apo-Transferrin 0,5 % Insulin 15 % FBS in RPMI Medium

3.1.4 *In vitro* Barriere-Assays – Biotinylierung von Sphäroiden und Behandlung mit EDTA und *Clostridium Perfringens* Enterotoxin

Um die Permeabilität der MCCL Sphäroide zu testen wurden diese biotinyliert. Dazu wurden 5 mg Biotinylierungsreagenz (EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin; Thermo Scientific, BR) in 500 µl PBS (+ 1mM CaCl₂) gelöst. Makroskopisch sichtbare Sphäroide wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig aus der Kultur entnommen und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Sobald sich die Sphäroide am Boden des Gefäßes abgesetzt hatten, wurde das Medium weitestgehend abgenommen und ca. 100 µl des BR auf die Sphäroide gegeben. Die Sphäroide wurden eine Std. in dieser Lösung inkubiert. Das BR (557 Da *Tracer*) hat die Eigenschaft durch den Extrazellularraum zu diffundieren und dabei Proteine zu biotinylieren. Dabei wird es von TJs gestoppt (Furuse et al. 2002, Kirschner et al. 2010). Der *Tracer* ist nicht membrangängig und kann deshalb nicht in Zellen aufgenommen werden. Nach der Inkubation wurden die Sphäroide kryokonserviert und 6 µm dicke Schnitte davon angefertigt. Die Schnitte wurden für 30 min in 95% Ethanol bei 4°C und für 1 min in Aceton bei RT fixiert. Der *Tracer* konnte anschließend mit einer TexasRed Streptavidin-Färbung nachgewiesen werden. Der TexasRed Streptavidin-Antikörper wurde dabei, wie in Kapitel 3.2.3 für den Sekundär-Antikörper beschrieben, behandelt. Um zu untersuchen inwieweit die Barriere durch Zugabe des Ca²⁺-Chelators EDTA beeinflusst wird, wurden die Sphäroide

vor der Biotinylierung für 2 Std. in 0,5% EDTA (in PBS verdünnt) inkubiert. Das EDTA wurde von den abgesunkenen Sphäroiden abgenommen, diese ein Mal mit PBS gewaschen und mit 100 µl BR für 1 Std. inkubiert. Als Kontrolle wurden die Sphäroide nur in PBS, ebenfalls für 2 Std. bei 37°C, inkubiert. Um zu untersuchen ob die Barriere nach der EDTA-Behandlung wieder hergestellt werden kann, wurde ein Teil der Sphäroide nach der EDTA-Inkubation nicht biotinyliert, sondern für weitere zwei Stunden zurück ins MCC-Medium gegeben und anschließend 1 Std. biotinyliert. Die Kryokonservierung und der Nachweis des Tracers erfolgten wie eben beschrieben.

Um den Einfluss von Cldn-3 und Cldn-4 auf die Barriere zu untersuchen, wurden die Sphäroide vor der Biotinylierung mit dem C-terminalen Teil des *Clostridium Perfringens* Enterotoxins (cCPE) bzw. mit einem Kontrollpeptid (GST) für 20 Std. mit einer Konzentration von 20 µg/ml in MCC-Medium behandelt. Das bakterielle Toxin *Clostridium Perfringens* Enterotoxin (CPE) ist ein kleines Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, welches bei Menschen Nahrungsmittelvergiftungen hervorruft (McClane *et al.* 1988). Der N-terminale Teil des Polypeptids (nCPE) ist die zytotoxische Region, während das C-terminale Fragment des Polypeptids (cCPE) das rezeptorbindende Fragment ist (Katahira *et al.* 1997). cCPE bindet spezifisch an Cldn-3, -4, -6, -7, -8 und -14 in TJs. Für Cldn-4 konnte gezeigt werden, dass die Bindung von cCPE an dieses Protein zu einer Dislokation von Cldn-4 von den TJ-Strängen und zu einer gestörten Barrierefunktion von Cldn-4 abhängigen TJs führt. Für diesen Versuch wurde das C-terminale Fragment des CPEs (Aminosäuren 194-319) mit einem Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag) verwendet. Die Kontrolle (GST) ist ein Peptid mit ähnlicher Größe, die auch einen GST-Tag hat. Anschließend wurde das cCPE-haltige Medium von den Sphäroiden abgenommen, einmal mit Medium gewaschen und 100 µl Biotinylierungsreagenz auf die Sphäroide gegeben.

3.1.5 Einfrieren von Sphäroiden

Die gesammelten Sphäroide wurden vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und in ein vorher präpariertes Gefäß gebracht, überschüssiges Medium mit einer Pipette und Filterpapier aufgesaugt, die Sphäroide mit *Cryomatrix* überschichtet und in flüssigem

Stickstoff kryokonserviert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Sphäroide dann bei -80°C gelagert.

3.1.6 Invasionsexperiment

Kollagenmix

3,5 ml Kollagen

462 μl FCS

420 ml EMEM

83 μl L-Glutamin (200mM)

78 μl NaHCO_3

Bei diesem Versuch kann man die Migration von Zellen aus einem Zellverband heraus beobachten und somit eventuell Rückschlüsse auf die Metastasierung von Tumorzellen ziehen. Zunächst wurde unter sterilen Bedingungen ein Kollagenmix hergestellt. Die Herstellung erfolgt komplett auf Eis um ein vorzeitiges Polymerisieren des Gels zu verhindern. In einer 12-well Platte wurden 0.2 ml von dem Kollagenmix pro well vorlegt und 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wurden die Sphäroide aus der Merkelzellkarzinom-Kultur gesammelt und in Eppendorfgefäße gegeben. Das Medium wurde abgenommen und die Sphäroide mit dem restlichen Kollagenmix gemischt. Dann wurde in jedes Well 0,3 ml des Kollagen/Sphäroid Gemischs gegeben und die Platte für 15 min im Brutschrank inkubiert. Auf das feste Gel wurde dann noch 1 ml MCC-Medium gegeben. Von jedem Well wurden regelmäßig Fotos gemacht um zu überprüfen, wie weit sich die Zellen im Gel bewegen. Um zu gewährleisten, dass immer dasselbe Sphäroid fotografiert wurde, wurde wenn möglich nur ein Sphäroid in jedes well gegeben und zusätzlich Skizzen der Sphäroide angefertigt, über die die genaue Lage und Form des Sphäroids dokumentiert wurde.

3.1.7 Zellzählung

Cell dissociation buffer

135 mM KCl

15 mM $\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Für die Bestimmung der Zellzahl mit der Trypanblaufärbung mussten die Zellen in einer Einzelzellsuspension vorliegen. Ein Zellpellet der zu zählenden Zellen wurde in ca. 1 ml Cell *dissociation buffer* resuspendiert und für 5 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach zusätzlicher mechanischer Dissoziation durch Resuspension mit einer Pipette und optischer Kontrolle der Dissoziation unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen Kulturmedium resuspendiert, von dem 20 µl abgenommen wurden. Diese wurden im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau versetzt und dann auf eine Neubauerzählkammer pipettiert. Das Auszählen der Zellen in den 16er Quadranten erfolgt unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung und mit Phasenkontrast. Die Gesamtzellzahl berechnet sich wie folgt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times f \times V \times 10000$$

n = ausgezählte Zellen
 f = Verdünnungsfaktor
 V = Gesamtvolumen
10000 = Kammerfaktor (1mm³).

Die Vitalität errechnet sich aus:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl} \times 100}$$

3.1.8 WST-1 Assay

Um die Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien zu messen wurde das *Quick Cell Proliferation Assay Kit* von Biocat benutzt. Der Assay basiert auf der Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 zu Formazan durch zelluläre mitochondriale Succinat-Tetrazolium Reduktasen in lebenden Zellen. Von jeder MCCL wurden 5×10^4 Zellen in 100 µl Medium in eine 96 Well Platte eingesät und bis zu sieben Tagen inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 Tage (d), 3d, 5d und 7d wurden zu jedem *well* 10 µl WST hinzu gegeben und für 4 Std. inkubiert. Das in dieser Zeit gebildete Formazan konnte fotometrisch bei einer Wellenlänge von 420-480 nm und einer Referenzwellenlänge von 600 nm gemessen werden. Je größer die Wachstumsgeschwindigkeit einer Zelllinie ist, desto mehr WST kann von den Zellen zu Formazan umgesetzt werden und desto größer ist die gemessene Absorption im Fotometer. MCC-Medium diente als Kontrolle. Von jeder Zelllinie wurde zu allen Zeitpunkten eine

Dreifachbestimmung durchgeführt. Um Messschwankungen auszugleichen wurde der jeweils höchste Wert eines Versuchs auf die optische Dichte (OD) von 1 gesetzt und alle anderen Werte auf diesen Wert normiert.

3.1.9 BrdU-Elisa

Um die Menge der proliferativen Zellen zwischen den einzelnen MCCL zu vergleichen wurde der *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* (Bromdesoxyuridin (BrdU)-Elisa) von Roche benutzt. Dafür wurden ca. 10^6 Zellen in 24-well Schalen für 4 Tage kultiviert. Es wurde 1 ml BrdU in jedes *well* gegeben und für 3 Std. inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, mit Zell-Dissoziationspuffer einzellig gemacht und 5×10^4 Zellen in jedes *well* einer 96-*well* Platte eingesät. Von jeder Zelllinie wurde ein dreifacher Ansatz gemacht. Im weiteren Verlauf wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die Absorption des Farbstoffs wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm im *Elisa*-Messgerät gemessen.

3.2 Immunhistologische Methoden

3.2.1 Kryoschnitte

Für die immunhistologische Charakterisierung wurden die eingefrorenen Sphäroide mit Hilfe eines Kryostaten bei einer Temperatur von -22°C in 6 μm dicke Scheiben geschnitten. Auf jeden Objektträger wurden mehrere Schnitte aufgebracht und 30-45 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung der Schnitte für 10 min in eiskaltem Aceton (-20°C), wonach die Schnitte erneut getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C bzw. -80°C gelagert wurden.

3.2.2 Cytospin

Mit Hilfe des Cytospins können Kulturzellen auf einen Objektträger aufgebracht werden, um mit ihnen weitere Untersuchungen wie Immun- oder HE-Färbungen durchzuführen. Zellen in Medium wurden abzentrifugiert, das Medium vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Die Objektträger für das Cytospin wurden mit zwei Filterpapieren und dem Trichterelement in die Halterungen eingespannt und in den Rotor des Cytospins eingesetzt. Pro Objektträger wurden ca. 500 µl Zellsuspension in die Trichter gefüllt und das Cytospin bei 800 upm für 5 min gestartet. Danach wurden die Zellen sofort für 5 min in eiskaltem Methanol (-20°C) und anschließend für 15 sec in eiskaltem Aceton (-20°C) fixiert. Nach dem Trocknen der Objektträger konnten diese sofort verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

3.2.3 Immunfluoreszenz

PBS-Puffer, pH 7,4
NaCl 140 mM
KCl 2,7 mM
Na₂HPO₄ x 2 H₂O 8,1 mM
KH₂PO₄ 1,5 mM

Die Charakterisierung der untersuchten Merkelzellkarzinomzellen erfolgte in der Immunfluoreszenz mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern (AK). Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe waren Alexa-488, Alexa-594 und das Cyanin (CY) 3. Alexa-488 wird bei einer Wellenlänge von 488 nm (blaues Licht) angeregt und emittiert bei 520 nm (grünes Licht). Alexa-594 absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 594 nm (grünes Licht) und emittiert bei 618 nm (oranges Licht), CY3 absorbiert bei 550 nm und emittiert bei 570 nm.

Zunächst wurden die zu färbenden Schnitte oder Zellen aufgetaut und mit einem *Pap pen* auf dem Objektträger umrandet. Um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern, fanden die Färbungen in einer dunklen Feuchtkammer statt. Um unspezifische Bindungsstellen auf den Schnitten abzublocken, wurden die Schnitte bzw. Zellen mit Blockierungspuffers (2% Normal-Ziegen-Serum oder Normal-Esel-Serum) für eine viertel Stunde inkubiert. Zum

Permeabilisieren der Membran wurde eine 0,01% Triton X-100 Lösung verwendet. Dies erfolgte bei allen Antikörpern bis auf die Cytokeratine, β -catenin und N-Cadherin. Der primäre unmarkierte AK wurde entsprechend einer vorher ausgetesteten Konzentration (s. Tabelle 2.2) mit PBS verdünnt und auf die Schnitte gegeben und dieser für 30 min inkubiert. Als Negativkontrolle diente der jeweilige Isotyp des Antikörpers in derselben Proteinkonzentration. Danach wurde der AK vorsichtig mit PBS von den Schnitten gespült und die Schnitte einmal 5 und zweimal 10 min in PBS gewaschen, bevor der sekundäre AK auf die Schnitte gegeben wurde. Auch dieser wurde zuvor in PBS verdünnt (s. Tabelle 2.3). Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Schnitte 5 min in PBS gewaschen und anschließend für 1 min in die DAPI-Färbelösung (1:5000) getaucht. Es folgten noch zwei Waschschrte in PBS für jeweils 5 min und zwei Waschschrte in Aqua dest. für jeweils 3 min. Dann wurden die Schnitte mit Fluoromount D eingedeckelt und über Nacht bei RT trocknen gelassen. Bei der Doppelfärbung wurden sowohl die beiden Primär- als auch die Sekundär-AK vor dem Auftrag auf die Schnitte in doppelter Konzentration 1:1 gemischt. Die weitere Färbung wurde dann exakt wie oben beschrieben durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte an einem Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Jena) und die Abbildungen wurden mit dem Programm Openlab Version 9.0.1 (Improvision Systems, Tübingen) erstellt.

3.2.4 Bestimmung der Menge apoptotischer Zellen in MCCL

Der Nachweis apoptotischen Zellen in den MCCL wurde mit Hilfe des ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit von Chemicon durchgeführt. Dazu wurden die Zellen der MCCL mittels Cytospin auf Objektträger geschleudert und sofort in 2%iger Formaldehydlösung fixiert. Die Durchführung der Tunel-Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Als Kontrolle dienten frische Schnitte der Milz einer Maus. Zur Auswertung wurden von jedem gefärbten Objektträger drei Fotos in der 40er Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop angefertigt und die Tunel- und DAPI-gefärbten Zellen mit der Zählfunktion der Fotosoftware Openlab Version 9.0.1 (Improvision Systems, Tübingen) ausgezählt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinisolation aus Zellen

RiPA-Puffer

50 mM Tris,
150 mM NaCl
1% NP40 (Igepal)
0,5% Na-Deoxycholat
5 mM EDTA
0,1% SDS in H₂O bidest., pH 8

Protease-Inhibitormix

1 mg/ml Leupeptin
0,1 mg/ml Pepstatin A
10 mg/ml Bacitracin
10 mM PMSF in H₂O bidest.

Die Zellen der MCCL lagen in Medium vor und wurden zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde, je nach Größe, in 50–200 µl Ripa-Puffer, mit 1% Protease-Inhibitor-Mix versetzt, resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Alle Proben wurden dann für 15 min bei 13000 upm und 4°C zentrifugiert, ihr Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde verworfen.

3.3.2 Proteinbestimmung (nach Bradford)

Bradford-Reagenz

100 mg Coomassie Brilliant Blau G
47 ml Ethanol, absolut
100 ml Phosphorsäure (88%)
auf 1l mit H₂O bidest. auffüllen

Die Bestimmung der Proteinmenge in den Proben wurde mit Hilfe des Bradford-Tests durchgeführt. Durch die Bindung von *Coomassie brilliant blue* G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist also ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung und ermöglicht die genaue Bestimmung der Proteinmenge einer Probe.

Es wurde eine Eichgerade aus 1 µg, 2 µg, 4 µg, 7 µg, 10 µg, 15 µg und 20 µg Protein (BSA) in je 100 µl Aqua bidest. hergestellt. Der Leerwert enthielt nur 100 µl Aqua bidest. Zu jedem Ansatz wurden dann 900 µl Bradford-Reagenz pipettiert. Von den Proben wurde eine Menge zwischen 1 und 10 µl mit Aqua bidest. auf 100 µl aufgefüllt und ebenfalls 900 µl Bradford-Reagenz hinzu gegeben. Nach ca. 5 min konnte die Absorption bei 595 nm gegen den

Leerwert der Eichkurve im Photometer gemessen werden. Anhand der Eichkurve wurde die entsprechende Proteinmenge durch Interpolation bestimmt und durch Dividieren der bestimmten Proteinmenge durch das Ausgangsvolumen der Messprobe (1-10 μl) erhielt man die Konzentration des Proteins in der Probe (in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

3.3.3 Proteinfällung

SDS-Probenpuffer, pH 6,8

60 mM Tris,
10% Glycerin
10% β -Mercaptoethanol
5% SDS in H_2O bidest.

Wenn eine Probe eine geringere Konzentration als 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hatte, musste diese mit einer Chloroform/Methanol-Fällung aufkonzentriert werden. Dabei wurde die Probe mit dem vierfachen ihres Volumens mit Methanol, dem einfachen ihres Volumens mit Chloroform und dem dreifachen Volumen Aqua bidest. versetzt. Nach gründlichem Vortexen wurde das Gemisch für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Dabei entstanden 3 Phasen, von denen die oberste vorsichtig abpipettiert und verworfen wurde. Die anderen beiden Phasen wurden mit dem dreifachen Volumen der ursprünglichen Probe mit Methanol versetzt, gemischt und erneut für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Proteinpellet im *SpeedVac* 5-20 min getrocknet. Anschließend konnte das Pellet in der gewünschten Menge Ripa-Puffer oder direkt in SDS-Probenpuffer gelöst werden.

3.3.4 Westernblot

Trenngelpuffer

1,5 M Tris
0,4% SDS
pH 8,8 in H_2O bidest.

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris
0,4% SDS
pH 6,8 in H_2O bidest.

Bis-Acrylamidlösung

30% Acrylamid
0,8% Bis
in H_2O bidest.

SDS-Probenpuffer, pH 6,8

60 mM Tris,
10% Glycerin
10% β -Mercaptoethanol
5% SDS in H_2O bidest.

Elektrophoresepuffer, pH 8,8

192 mM Glycin
25 mM Tris
0,1% SDS
in H_2O bidest.

Coomassie Brilliant Blau G250

40% Methanol
5% Essigsäure in H_2O bidest. eine
Spatelspitze Coomassie
Brillantblau

Entfärbelösung

40% Methanol
5% Essigsäure
in H₂O bidest.

Konservierungslösung

7,5% Essigsäure
in H₂O bidest.

Blotpuffer

20% Methanol
0,02% SDS
192 mM Glycin
25 mM Tris
in H₂O bidest.

TBST-Puffer

100 mM Tris
1,5 M NaCl
0,5% Tween
in H₂O bidest.

Bevor die Proteine auf die Westernblot-Membran aufgebracht werden, müssen sie zunächst mittels einer eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) der Größe nach aufgetrennt werden. Durch die Bindung von SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung, die zu ihrem Molekulargewicht proportional ist und die SDS-Protein-Komplexe werden in der Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt. Es wurde die Methode nach Lämmli (Laemmli 1970) benutzt. Das Gel enthielt je nach Größe des untersuchten Proteins 8 – 10% Bis-Acrylamidlösung. Die mit SDS-Puffer versetzten Proben (20-30 µg pro Bahn) wurden über 3 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für ca. 1 Stunde in den mit Elektrophoresepuffer gefüllten Gelkammern. Als Molekulargewichtsmarker diente der *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* von Fermentas.

Das Proteinmuster des Gels wurde mit Hilfe des Wetblot-Verfahrens in einer vertikalen Blotkammer (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte bei 350 mA und 100 V bei 4°C für eine Stunde. Zur Kontrolle des vollständigen Proteintransfers wurden die Gele nach dem Transfer mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. Die Proteine auf den Membranen wurden nach dem Transfer für 5 min in Ponceau S angefärbt, die Höhe der Standards markiert und mit Leitungswasser wieder entfärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer 5%igen Magermilchlösung in TBST-Puffer inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Folie eingeschweißt in Rotation über Nacht bei 4°C oder 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte entsprechend der Tabelle 2.2 in 5% Magermilch/TBST-Puffer. Die Membranen wurden 3 Mal mit TBST-Puffer gewaschen und der Peroxidase markierte sekundäre Antikörper eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Nach einem weiteren 3-schrittigen Waschgang mit TBST-Puffer erfolgte die Detektion des Proteins. Pro Membran wurden ca. 2 ml der Westernblot Detektionslösungen

(*Westernblotting detection reagents*, Amersham Biosciences) 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran gegeben und für eine Minute inkubiert. Die Membranen wurden in eine Röntgenkassette gelegt und ein Röntgenfilm (Medical Film, Konica Minolta) 1, 2 und 5 min in der Kassette belichtet. Dieser wurde anschließend im Röntgenentwicklergerät (AGFA Curix 60) entwickelt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen). Nicht mehr als 10^7 Zellen einer Zelllinie wurden pelletiert und mit 700 μ l des im Kit enthaltenen RLT-Puffer (1% Mercaptoethanol) lysiert. Das Zelllysate wurde auf eine *Shredder*-Säule gegeben, diese wurde zentrifugiert wodurch eine Homogenisierung des Lysats entstand. Das Homogenisat wurde mit 700 μ l 70%igem Alkohol versetzt und auf zwei *Spin columns* aufgeteilt. Des Weiteren erfolgte die RNA-Isolierung durch mehrere Wasch- und Elutionsschritte nach Vorgabe des Arbeitsprotokolls. Genomische DNA wurde durch einen DNA-Verdau mit dem *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) entfernt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit erfolgte durch die Messungen der Absorption bei 260 nm und 280 nm, wobei eine Extinktion bei 260 nm von 1,0 einer Menge von 40 μ g RNA entspricht.

3.4.2 Synthese komplementärer DNA mit Hilfe der reversen Transkription

Mit Hilfe des *iScript cDNA Synthesis Kits* (Bio-Rad) wurde aus RNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Bei einem Gesamtansatz von 60 μ l wurden 3 μ g RNA eingesetzt. Der Ansatz wurde im PCR Gerät zunächst für 5 min bei 25°C inkubiert, dann folgte eine Inkubation für 30 min bei 42°C und eine weitere für 5 min bei 85°C. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des cDNA Synthese Ansatzes

Reagentien	Ansatz
Reaktions-Mix	12 μ l
Reverse Transkriptase	3 μ l
RNA	3 μ g
DEPC H ₂ O	auf 60 μ l auffüllen

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Stücke mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Sie erlaubt den schnellen, empfindlichen Direktnachweis kleinster Mengen von DNA. Sie beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten, diese sind:

- 1) die Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge
- 2) die Anlagerung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an die flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereiches
- 3) die Polymerisierung der doppelsträngigen DNA - ausgehend von den Primern – mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase sowie der vier Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Reaktionsbestandteile zusammen pipettiert:

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des PCR Ansatzes

Reagenzien	Ansatz
cDNA	1 μ l
Inkubationspuffer (10x)	5 μ l
MgCl ₂ (50mM)	1,5 μ l
dNTPs (2 mM)	5 μ l
Sense Primer	25 pmol
Antisense Primer	25 pmol
Taq DNA-Polymerase (5U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O	auf 50 μ l auffüllen

Zur Amplifizierung wurde folgendes Programm im PCR Gerät (UNO Thermoblock, Biometra) eingestellt:

Tabelle 3.7: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1.	95	60
2.	55	30
3.	72	30
4.	94	60
5.	55	30
6.	72	30
7.	Schleife zu 4 mit 40 Wiederholungen	
8.	4	∞

Als Positivkontrolle dienten humane Keratinozyten, cDNA normaler Haut oder Aorta (Invitrogen) sowie humane genomische DNA (Novagen). Als Negativkontrolle wurde DEPC-Wasser benutzt. Da nicht alle mRNA-Sequenzen Introns haben wurden zum Ausschluss von Kontaminationen mit genomischer DNA von allen Proben reverse Transkriptionen ohne das Enzym reverse Transkriptase durchgeführt und mit allen Proben die PCRs mit den entsprechenden Primern durchgeführt.

3.4.4 Agarose Gelelektrophorese

TBE-Puffer, pH 8,3

10,8 g Trisma base

5,5 g Borsäure

0,93 g Titriplex III

auf 1 l mit H₂O bidest. auffüllen

Das Ergebnis der Amplifikation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Durch die Agarose-Gelelektrophorese können lineare DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderungstrecke linearer DNA ist umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht. Als Größenstandard diente eine 100 bp DNA Leiter der Firma Fermentas. Von der PCR-Reaktion wurden 20 µl des PCR Produktes für die Agarosegelelektrophorese eingesetzt und mit 4 µl Beladungspuffer gemischt. Um das Agarosegel herzustellen, wurde 1 g Agarose in 50 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle

verflüssigt. Vor dem Gießen des Gels wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben und die flüssige Agarose auf den Glasschlitten einer Gelelektrophoresekammer bis zu einer Höhe von 0,5 cm gegossen. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen geformt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit dem TBE-Puffer überschichtet, und die DNA-Lösung in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde ca. 50 min bei 60 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Dokumentation in der Geldokumentationsanlage.

3.4.5 quantitative Polymerase Kettenreaktion

Zur Bestimmung von relativen mRNA-Mengen wurde nach reverser Transkription in cDNA eine quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR) durchgeführt, bei der Intensitäten fluoreszierender Sonden während der exponentiellen Phase der PCR gemessen werden können. Für die qRT-PCR Reaktion wurden TaqMan[®]-Expressionsassays (Applied Biosystems) eingesetzt, die aus spezifischen Primern sowie Fluorophor- und *Quencher*-markierten TaqMan[®]-Sonden bestehen. Dazu wurde der *iQ-Supermix* (Bio-Rad) verwendet, der bereits Puffer, dNTPs und die Taq-Polymerase enthält. Aus folgender Tabelle kann die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes entnommen werden.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung eines Probenansatzes bei der qRT-PCR.

Reagenzien	Ansatz
cDNA	2 µl
Supermix (10x)	12,5 µl
TaqMan [®] -Expressionsassay	1,25 µl
H ₂ O	9,25 µl

Die PCR wurde in einem iCycler iQ5 (BioRad) durchgeführt, als endogene Referenz wurden 18S-rRNA-Sonden verwendet. Das Programm wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: Start bei 50°C für 2 min, initiales Aufheizen auf 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95°C für 15 s und *Annealing* und Extension bei 60°C jeweils für 1 min. Die Fluoreszenz wurde mit der iCycler Software (Bio-Rad) analysiert. Zunächst wurden die CT-Werte jeder MCCL für die untersuchten Gene ermittelt. Der CT-

Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die CT-Werte einer Probe (CT,P) wurden gegen eine Kontrolle (CT,K), das konstant exprimierte Housekeeping-Gen 18S, normalisiert. Aus dem CT-Wert der Probe und der Kontrolle erhielt man demzufolge den Δ CT,P-Wert (Livak & Schmittgen 2001). Diese Werte wurden unter den einzelnen MCCL verglichen um die exprimierten RNA-Mengen eines Gens untereinander zu vergleichen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung humaner Zelllinien des MCC

In dieser Arbeit wurden zunächst zehn MCCL auf ihre Klassifizierung, ihre Wachstumsgeschwindigkeit und die Infektion mit dem MCPyV untersucht. Alle untersuchten Zelllinien exprimieren CK 20 (Abb. 4.1), einen wichtigen Marker dieses Tumors, der aber nicht essentiell positiv sein muss. Die Zelllinien, mit Ausnahme von MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9 und MKL-1, wachsen ausschließlich auf einem *Feederlayer* aus humanen, sich nicht mehr teilenden, Fibroblasten.

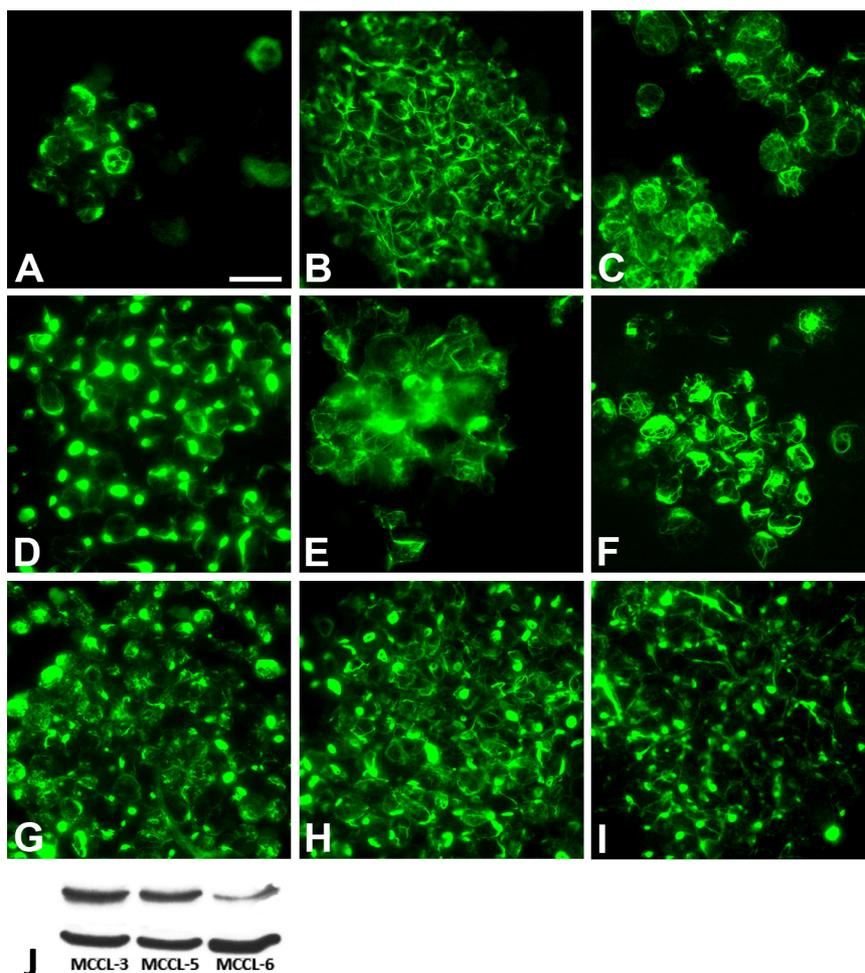


Abbildung 4.1: Nachweis von CK 20 in MCCL

Cytopspins der Zelllinien MCCL-3 (A), MCCL-5 (B), MCCL-7 (C), MCCL-8 (D), MCCL-9 (E), MCCL-11 (F), MCCL-12 (G), MCCL-15 (H) und MKL-1 (I) wurden auf die Expression von CK 20 untersucht (grün). Alle Zelllinien zeigen ein typisches Färbemuster für das Intermediärfilament CK 20. MCCL-6 wurde nur im Westernblot auf die Expression von CK 20 untersucht (J). Als Kontrolle für die korrekte Durchführung des Blots sind die Banden für MCCL-3 und MCCL-5 ebenfalls dargestellt. Maßstab: 20 µm.

4.1.1 Klassifizierung von Merkelzellkarzinom-Zelllinien

Merkelzellkarzinom Zelllinien (MCCL) zeigen ein sehr heterogenes Wachstum in Kultur. Da sie aber Analogien zu den Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (*small cell lung cancer* = SCLC) aufweisen, wurde die Klassifizierung der SCLC Zelllinien auch für die MCCL übernommen (Carney et al. 1985, Gazdar *et al.* 1985b, Leonard et al. 1993). Dabei trennt sich die Klassifizierung in eine biochemische, bei der die Proteine Chromogranin A (CRGA) und Neuron spezifische Enolase (NSE) untersucht werden, und eine morphologische Charakterisierung, bei der ausschließlich das Wachstumsverhalten der Zellen in Kultur begutachtet wird. Die biochemische Charakterisierung liefert eine Aussage über das Vorkommen neuroendokriner Granula in den Zellen der MCCL. Diese klassischen Zellen sind positiv für Marker wie CRGA, NSE, Substanz P oder Synaptophysin (Leonard et al. 1993, Leonard et al. 1995), variante Zelllinien haben einen selektiven Verlust dieser Marker, wobei CRGA ausschließlich in klassischen Zelllinien zu finden ist, NSE aber auch noch in varianten Linien vorkommen kann. Entsprechend dieser Einteilung wurden zehn Zelllinien des MCC zunächst auf die Anwesenheit der klassischen Marker CRGA und NSE untersucht.

Die Untersuchung auf den neuroendokrinen Marker NSE erfolgte mittels Westernblot an allen 10 Zelllinien. Hier zeigte sich, dass alle MCCL positiv für NSE sind (Abb. 4.2). Zusätzlich wurden von den meisten MCCL *Cytospins* angefertigt und immunhistochemisch auf die Expression von NSE untersucht. Die Ergebnisse der Färbungen waren mit dem Westernblot übereinstimmend (Daten nicht gezeigt).

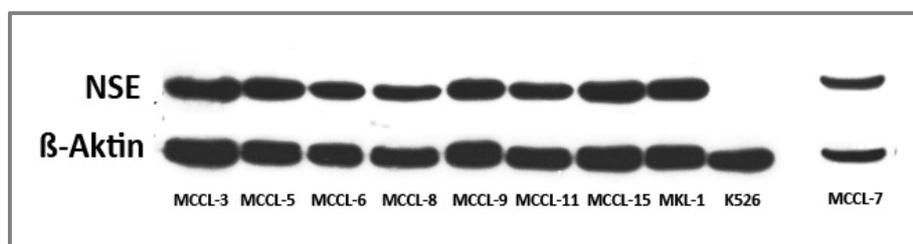


Abbildung 4.2: Biochemische Charakterisierung der MCCL - NSE

Analyse der NSE Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-8, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-15, MKL-1 und MCCL-7. Die Linie MCCL-7 wurde nicht gemeinsam mit den anderen Zelllinien untersucht und ist deshalb getrennt dargestellt. Als Kontrolle für eine korrekte Durchführung des MCCL-7 Blots dienten die Proben MCCL-3, -5, -6, -9 und -11. Als Negativkontrolle diente die Keratinozytenkultur K526, als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels wurde β -Aktin verwendet.

Als sehr viel wichtigeren Marker als NSE zum Beweis ob eine Zelllinie klassisch oder variant ist gilt CRGA, denn auch variante Zelllinien können positiv für NSE sein. Deshalb wurden *Cytospins* von allen Zelllinien auf die Expression von CRGA immunhistochemisch untersucht. Eine starke CRGA-Färbung war bei den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-8, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-12, MCCL-15 und MKL-1 zu sehen. Die einzige eindeutig CRGA-negative Zelllinie ist MCCL-6. MCCL-7 zeigt eine schwache und unspezifische Färbung, die sich nicht eindeutig von der Negativkontrolle unterscheiden lässt, so dass diese Zelllinie nicht eindeutig einer Klasse zugeordnet werden kann (Abb. 4.3). Charakteristisch für die CRGA-Färbung sind kleine Punkte, die ungleichmäßig um den Zellkern im Zytoplasma der Zelle verteilt sind und die Lokalisation der neurosekretorischen Granula darstellen (in Abb. 4.3 weiße Pfeile).

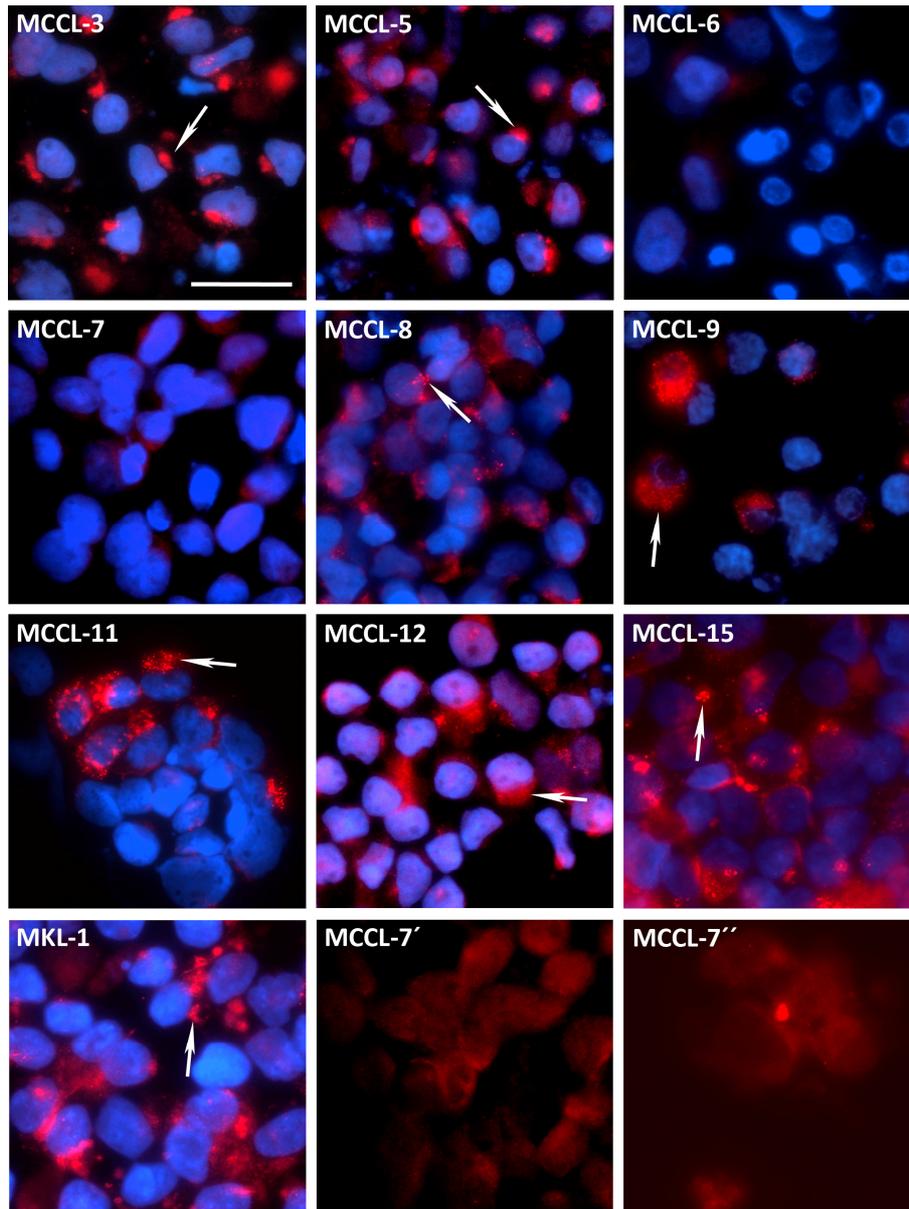


Abbildung 4.3: Biochemische Charakterisierung der MCCL - CRGA

2% Formaldehyd fixierte *Cytospins* der MCCL wurden immunhistochemisch auf die Expression von CRGA (rot) untersucht. Die typische CRGA-Färbung konzentriert sich auf kleine Punkte im Cytoplasma der Zellen (weiße Pfeile). Überlagerung von Epifluoreszenzaufnahmen von CRGA und DAPI (blau). Die CRGA-Färbung der Zelllinie MCCL-7 (MCCL-7') konnte nicht eindeutig von ihrer Negativkontrolle (MCCL-7'') unterschieden werden. Maßstab: 20µm.

4.1.2 Morphologische Charakterisierung der MCCL

Anhand ihrer morphologischen Eigenschaften lassen sich die Zelllinien weiter in vier Subtypen unterteilen. Die Typen I und II gehören meist zu den klassischen Linien, die Typen

III und IV zu den varianten, wobei auch Mischformen möglich sind. Zelllinien des Typ I sind durch dicht gepackte Sphäroide, die eine klare Abgrenzung nach außen zeigen, charakterisiert. Das Innere der Sphäroide weist häufig dunkle Stellen auf, die in der Literatur als „zentrale Nekrosen“ beschrieben wurden (Leonard et al. 1993). Zellen von Typ II Zelllinien zeigen sehr ähnliche Charakteristika wie die des Typ I, jedoch fehlen die dunklen Stellen in den Sphäroiden. Sie sind auch sehr dicht gepackt und nach außen abgegrenzt. Zeigen die Zellkulturen lockere Zellaggregate, die häufig auch zwei- und nicht drei-dimensional sind, werden diese Zelllinien dem Typ III der MCCL zugeordnet. Wachsen die Zellen einer Linie überwiegend als Einzelzellen, möglicherweise auch adhärent, werden sie zum Typ IV gezählt. Auch die Größe der Zellen in den einzelnen Linien kann einen Hinweis auf ihren Subtyp geben. Es wurde beobachtet, dass Zellen der Typ III und IV Linien größer sind als die von Typ I und II Linien.

Die verwendeten Zellen der MCCL wurden nach ihrer Isolation aus dem Tumor alle in frühen Passagen eingefroren und für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche aufgetaut. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Morphologie der einzelnen Zelllinien. Diese Morphologien sind im Folgenden beschrieben:

Die Zelllinie MCCL-3 hat kleine Zellen, die teilweise adhärent auf dem *Feederlayer* oder in Suspension wachsen. Die Zellen bilden schon nach kurzer Zeit in Kultur sehr große, auch makroskopisch sichtbare Sphäroide, die in ihrem Inneren dunkler sind. Teilweise gibt es auch sehr dunkle Sphäroide, die aussehen als würden sie nekrotische Zellen enthalten (Abb 4.4). Die Zelllinie MCCL-3 wird aufgrund dieser morphologischen Merkmale als Typ I MCCL charakterisiert.

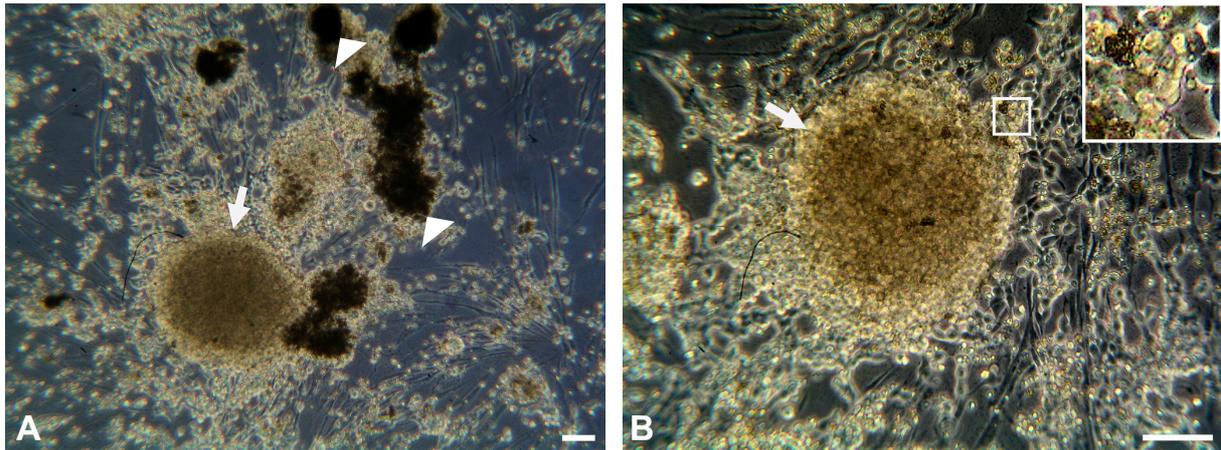


Abb. 4.4: Morphologische Merkmale der Zelllinie MCCL-3 in der Zellkultur.

Die Abbildung zeigt ein typische helle (weiße Pfeile) und dunkle (weiße Pfeilspitzen) Sphäroide dieser Zelllinie und zusätzliche Einzelzellen, die adhärent oder in Suspension auf dem *Feederlayer* wachsen. Abb. A zeigt die Zelllinie bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus B. Maßstab: 100 μm .

Die Zelllinie MCCL-5 zeigt ähnliche Charakteristika wie die Zelllinie MCCL-3. Ihre Zellen sind ebenfalls klein und bilden in kurzer Zeit große Sphäroide mit dunklen Stellen in ihrem Zentrum (Abb. 4.5). MCCL-5 ist ebenfalls eine Typ I Zelllinie.

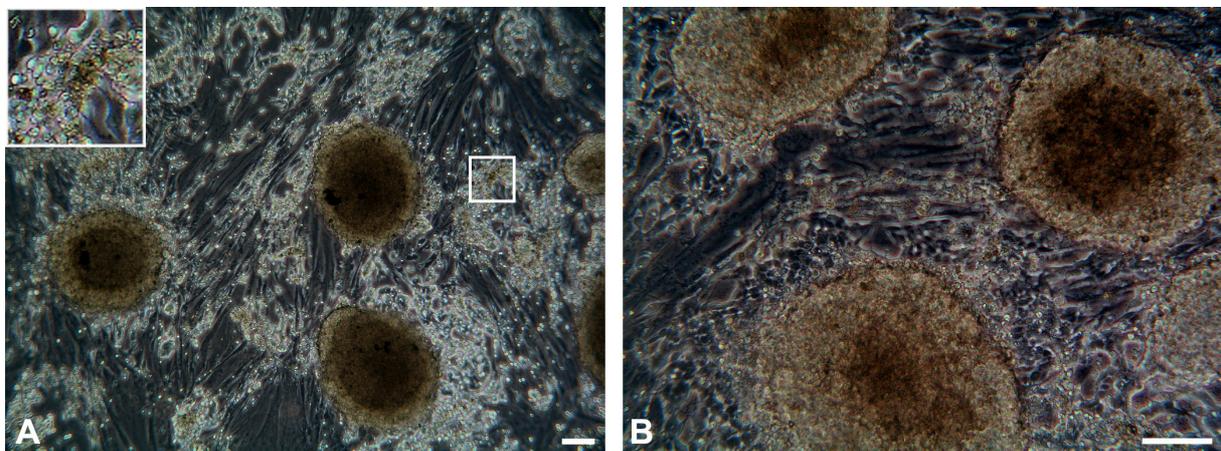


Abb. 4.5: Morphologische Merkmale der Zelllinie MCCL-5 in der Zellkultur

Die Abbildung zeigt typische Sphäroide dieser Zelllinie und zusätzliche Einzelzellen, die adhärent oder in Suspension in einer Kultur mit *Feederlayer* wachsen. Abb. A zeigt die Zelllinie bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus A. Maßstab: 100 μm .

Die Zelllinie MCCL-6 besteht hauptsächlich aus Einzelzellen, die zu einem Teil adhärent auf dem *Feederlayer* wachsen und zum anderen Teil in Suspension vorkommen. Nach sehr

langer Kultivierung der Zellen in einem Gefäß können sich kleine Zellhaufen bilden. Diese findet man immer in adhärenter Form auf dem *Feederlayer*, zum Teil auch in dunkler Ausprägung (Abb. 4.6, Pfeile). Die Form der Zellen ist entweder groß und rund oder klein und ungleichmäßig (Abb. 4.6, Vergrößerungsausschnitt). MCCL-6 ist aufgrund ihrer Merkmale eine Typ IV MCCL.

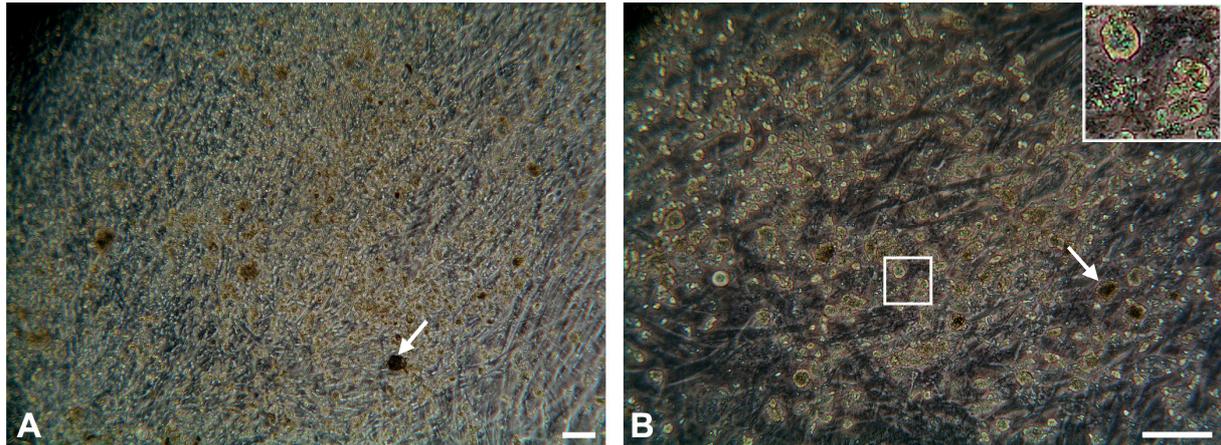


Abb. 4.6: Morphologische Merkmale der Zelllinie MCCL-6 in der Zellkultur

Die Abbildungen A und B zeigen die morphologischen Merkmale der Zelllinie MCCL-6 nach längerer Kultivierung. Die Zellen wachsen überwiegend als Einzelzellen adhärent auf dem *Feederlayer* oder in Suspension. Pfeile markieren Zellhaufen, die sich nach langer Kultivierung bilden. Abb. A zeigt die Zelllinie bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus B. Maßstab: 100 μm .

Zu der Zelllinie MCCL-7 zählen sowohl große runde als auch kleine Zellen, die keinen glatten Zellrand haben. Die Zellen bilden plaqueartige Zellzusammenschlüsse, die immer adhärent auf dem *Feederlayer* sind. Dies entspricht einer Typ II MCCL. Die Einzelzellen der Kultur können sowohl adhärent als auch in Suspension wachsen (Abb. 4.7).

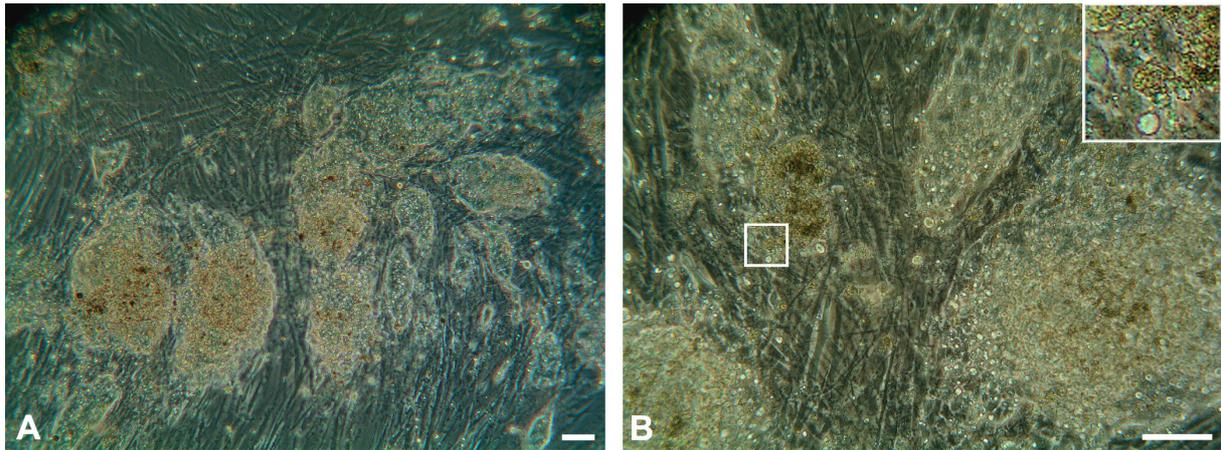


Abb. 4.7: Morphologische Merkmale der MCC Zelllinie MCCL-7 in der Zellkultur

Die Abbildung zeigt das typische Wachstum dieser Zelllinie in der Kultur auf einem *Feederlayer* aus humanen Fibroblasten. Die Zellen bilden zweidimensionale, plaqueartige Zellzusammenschlüsse, die adhären auf dem *Feederlayer* sitzen. Die Einzelzellen der Kultur können ebenfalls adhären oder in Suspension wachsen. Abb. A zeigt die Zelllinie bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus B. Maßstab: 100 μm .

MCCL-8 hat überwiegend kleine, unregelmäßig geformte Zellen, die sich zu Zellverbänden zusammenschließen. Diese Zellzusammenschlüsse sind hell oder dunkel und kommen sowohl in Suspension als auch als adhärenter Zellklumpen auf dem *Feederlayer* vor (Abb. 4.8). MCCL-8 ist ebenso wie MCCL-7 eine Typ II Zelllinie.

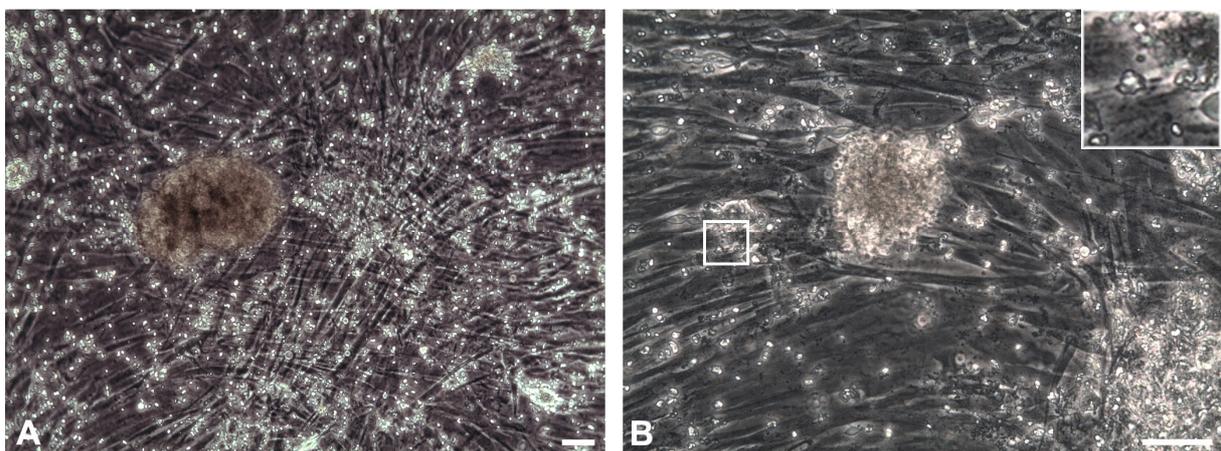


Abb. 4.8: Morphologische Merkmale der MCC Zelllinie MCCL-8 in der Zellkultur

Die Abbildung zeigt das typische Wachstum dieser Zelllinie. Die Zellen bilden zwei- oder dreidimensionale Zellzusammenschlüsse, die adhären auf dem *Feederlayer* sitzen oder in der Zellsuspension schwimmen. Die Einzelzellen der Kultur können ebenfalls adhären oder in Suspension wachsen. Abb. A zeigt die Zelllinie bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus B. Maßstab: 100 μm .

Die Zelllinie MCCL-9 ähnelt den Linien MCCL-3 und MCCL-5 sehr, zum Teil können die „zentralen Nekrosen“ intensiver ausgeprägt sein als bei den anderen beiden Zelllinien (Abb. 4.9; vergleiche Abb. 4.4 und 4.5). Dementsprechend gehört MCCL-9 auch zu den Typ I Zelllinien.

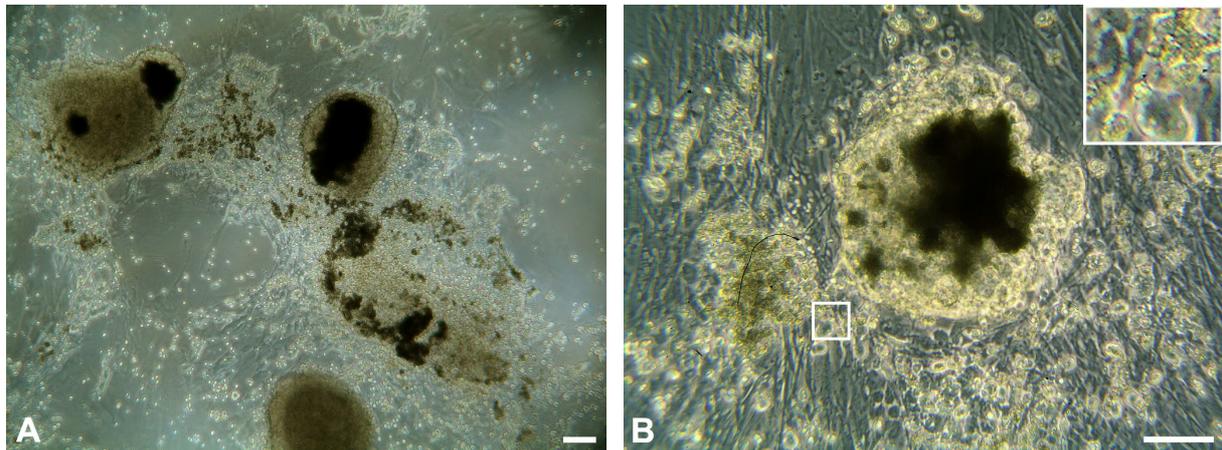


Abb. 4.9: Morphologische Merkmale der MCC Zelllinie MCCL-9 in der Zellkultur

Die Abbildung zeigt typische Sphäroide dieser Zelllinie und zusätzliche Einzelzellen, die adhärent oder in Suspension in der Kultur mit *Feederlayer* wachsen. Abb. A zeigt die Zelllinie bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus B. Maßstab: 100 μm .

Die Zellen der Linie MCCL-11 sind sehr groß, rund und haben ein gleichmäßiges Erscheinungsbild. Die meisten Zellen liegen als Einzelzellen vor, überwiegend adhärent auf den *Feederzellen*. Es können sich aber auch kleine, sehr lockere Zellzusammenschlüsse ohne feste Begrenzung nach außen bilden, die immer in Suspension vorliegen (Abb. 4.10). Dies entspricht einer MCCL des Typs III. Des Weiteren findet man nach langer Kultivierung auch adhärente Zellaggregate von sehr dunkler Farbe (Abb. 4.10 A (weiße Pfeilspitze), Abb. 4.10 B).

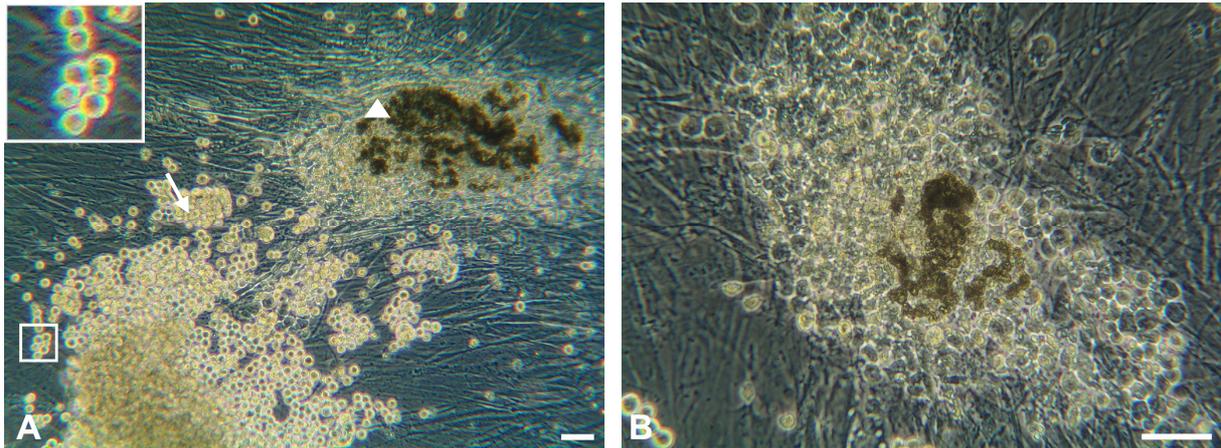


Abb. 4.10: Morphologische Merkmale der MCC Zelllinie MCCL-11 in der Zellkultur

Die Abbildung zeigt das typische Wachstum dieser Zelllinie nach längerer Kultivierung. Die Zellen wachsen überwiegend als Einzelzellen adhärent auf dem *Feederlayer* oder in Suspension. Zellzusammenschlüsse sind locker, meist zweidimensional und ohne feste Begrenzung nach außen (weißer Pfeil). Nach längerer bilden sich auch Zellaggregate von sehr dunkler Farbe (weiße Pfeilspitzen). Abb. A zeigt ein Bilde der Zelllinie mit hellen und dunklen Sphäroiden bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung eines dunklen Sphäroids. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus Abb. A. Maßstab: 100 μm .

Die Zelllinie MCCL-12 zeigt nahezu die gleichen Charakteristika wie die Zelllinie MCCL-6 und gehört somit auch zu den Typ IV Zelllinien. Ihre Zellen sind groß und rund, es gibt aber auch kleine, unregelmäßig geformte Zellen dazwischen. Sie wachsen teils adhärent auf dem *Feederlayer* oder in Suspension, aber immer als Einzelzellen. Nur nach sehr langer Kultivierung der Zellen ohne Wechseln des Gefäßes kann man die Bildung von kleinen Zellklumpen beobachten (Abb. 4.11).

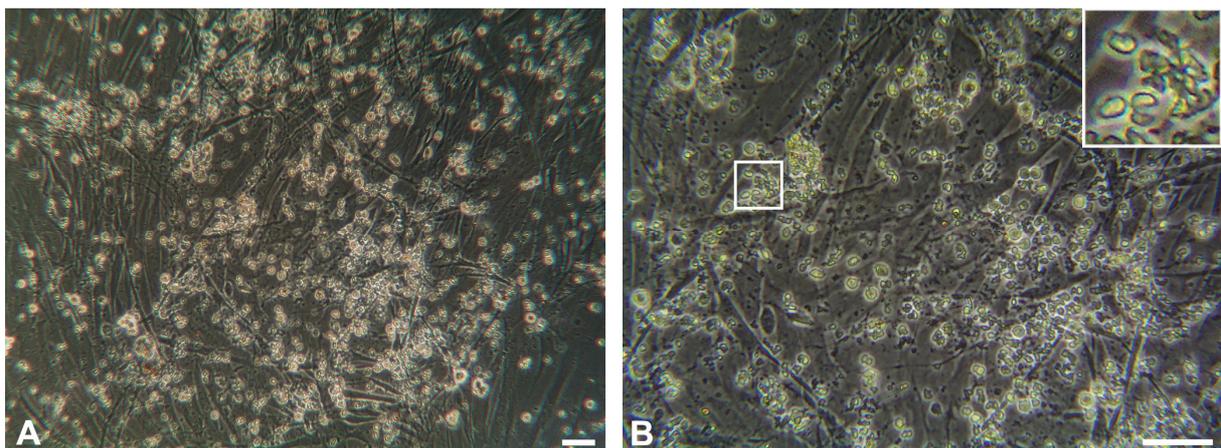


Abb. 4.11: Morphologische Merkmale der MCC Zelllinie MCCL-12 in der Zellkultur

Die Abbildung zeigt das typische Wachstum dieser Zelllinie. Die Zellen wachsen überwiegend als Einzelzellen adhärent auf dem *Feederlayer* oder in Suspension. Abb. A zeigt die Zelllinie bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus Abb. B. Maßstab: 100 μm .

Die Zelllinie MCCL-15 wird von kleinen, meist ungleichmäßig geformten Zellen gebildet. Sie bildet in Kultur sehr schnell Sphäroide, die zu Beginn noch klein und hell sind, sich im Laufe der Zeit aber zu großen Sphäroiden entwickeln, die dunkle Stellen in ihrem Inneren haben. Die Sphäroide haben immer eine runde dreidimensionale Form und zeigen eine klare Abgrenzung nach außen (Abb. 4.12). Dies entspricht einer Typ I MCCL.

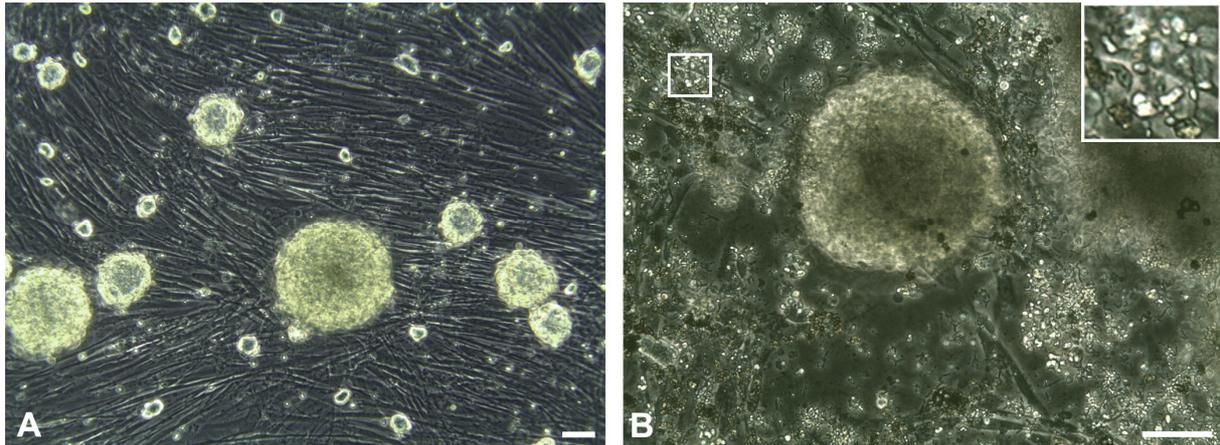


Abb. 4.12: Morphologische Merkmale der MCC Zelllinie MCCL-15 in der Zellkultur

Die Abbildung zeigt typische mittelgroße Sphäroide dieser Zelllinie und zusätzliche Einzelzellen, die adhären oder in Suspension auf dem *Feederlayer* wachsen. Abb. A zeigt die Zelllinie bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus Abb. B. Maßstab: 100 μm .

Auch die Zellen der Linie MKL-1, die nicht in unserem Labor etabliert wurde, sondern die wir von Prof. Frank Spelemann erhalten haben, bilden in Kultur sehr schnell große Sphäroide mit „zentralen Nekrosen“, wie in Abbildung 4.13 zu sehen ist, und gehört zu den Typ I MCCL. Die Zellen sind klein, haben eine runde Form und wachsen überwiegend in Suspension, was den bisherigen Beschreibungen dieser Zelllinie in der Literatur entspricht (Rosen et al. 1987). MKL-1 Zellen lassen sich auch gut in RPMI- anstatt MCC-Medium kultivieren.

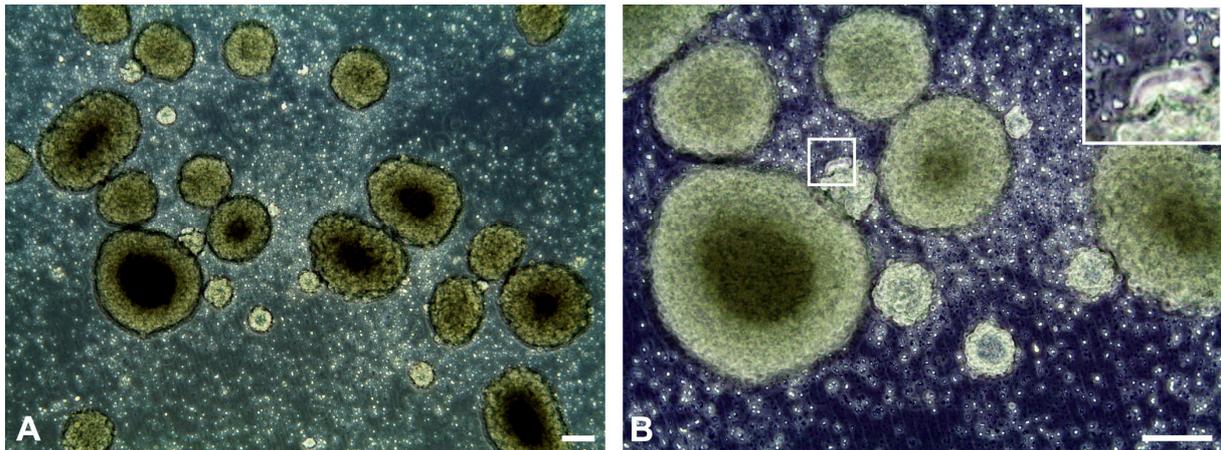


Abb. 4.13: Morphologische Merkmale der MCC Zelllinie MKL-1 in der Zellkultur

Die Abbildung zeigt typische Sphäroide dieser Zelllinie und zusätzliche Einzelzellen, die adhärent oder in Suspension auf dem *Feederlayer* wachsen. Abb. A zeigt die Zelllinie bei einer 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops, Abb. B eine 20-fache Vergrößerung. Der Vergrößerungsausschnitt entspricht der dreifachen Vergrößerung des markierten Bildausschnittes aus Abb. B. Maßstab: 100 μm .

Zusammenfassend ergibt sich aufgrund der biochemischen und morphologischen Charakterisierung der Zelllinien folgende Klassifizierung: Die Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9, MCCL-15 und MKL-1 gehören zu den klassischen Zelllinien mit dem Subtyp I. MCCL-7 und MCCL-8 haben, auf ihrem Phänotyp basierend, den Subtyp II, wobei MCCL-8 eine klassische Linie ist und MCCL-7 sich nicht eindeutig zuordnen lässt. Die Zelllinie MCCL-11 ist eine klassische Zelllinie und gehört morphologisch eindeutig zu den Typ III Zelllinien. MCCL-6 und MCCL-12 sind Zelllinien des Typ IV, sie unterscheiden sich aber in ihrer Klasse. MCCL-6 ist eine variante Zelllinie, wohingegen MCCL-12 klassisch ist. Die Ergebnisse der Klassifizierung sind in Tabelle 4.1 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Klassifizierung der MCCL

Zelllinie	Biochemischer Subtyp	Morphologischer Subtyp
MCCL-3	klassisch	I
MCCL-5	klassisch	I
MCCL-6	variant	IV
MCCL-7	?	II
MCCL-8	klassisch	II
MCCL-9	klassisch	I
MCCL-11	klassisch	III
MCCL-12	klassisch	IV
MCCL-15	klassisch	I
MKL-1	klassisch	I

1995 wurde in der Publikation von Helen Leonard schon beschrieben, dass sich MCCL vom Typ I nach längerer Kultivierung im selben Kulturgefäß und nach dem Wechsel der FCS-Charge verändern. Sie setzen sich auf dem Boden des Gefäßes ab und bilden nach einiger Zeit eine konfluente Zellschicht, die mehr an Zelllinien des Typ IV erinnert (Leonard et al. 1995). Auch in unseren Zellkulturen konnte ein solcher Klassenwechsel nach langer Kultivierung (> 6 Monate) im selben Kulturgefäß bei Zelllinien, die ohne *Feederlayer* kultiviert wurden, beobachtet werden. Nur die Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9 und MKL-1 wachsen auch ohne *Feederzellen* und bei allen vier Linien konnten diese morphologischen Veränderungen beobachtet werden.

Die Zelllinien verlieren zunächst ihre dicht gepackten Sphäroide. Stattdessen bilden sie nur noch lockere Zellaggregate, die keine feste Begrenzung nach außen haben. Die Zellen setzen sich auf dem Boden der Kulturschale ab und bekommen teilweise eine längliche Form. Diese Form ist bei den adhärennten Zellen der Linien MCCL-5 und MKL-1 noch stärker ausgeprägt. Die Zellen wachsen teilweise als Monolayer, meist aber auch mehrschichtig in kleinen adhärennten Zellhaufen. Beispiele für die Veränderung der Linien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9 und MKL-1 sind in Abbildung 4.14 gezeigt.

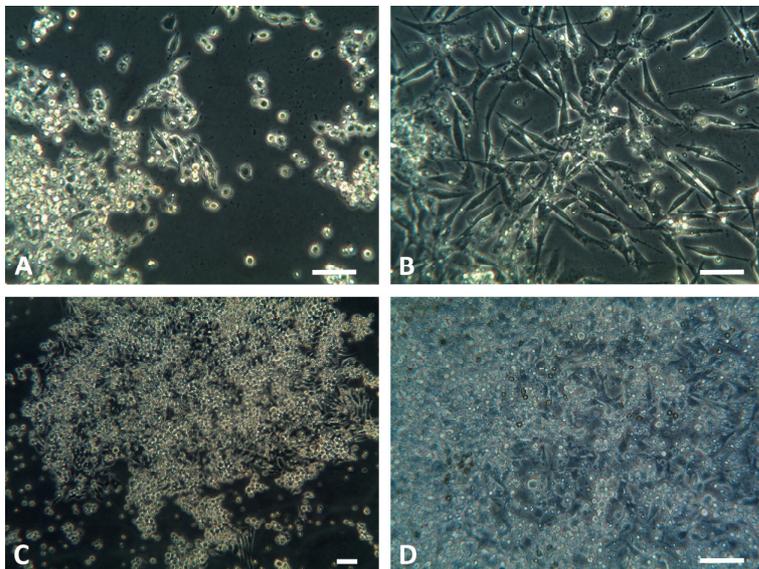


Abbildung 4.14: Veränderung der Morphologie von MCCL nach langer Kultivierung ohne *Feederlayer*

Veränderte Morphologie der Zelllinien MCCL-3 (A), MCCL-5 (B), MCCL-9 (C) und MKL-1 (D) nach langer Kultivierung in einem Kulturgefäß ohne *Feederlayer*. Die Typ I Zelllinien verlieren nach langer Kultivierung ohne *Feederlayer* ihre Sphäroide, setzen sich auf dem Boden des Kulturgefäßes ab und bekommen teilweise eine dendritische Form. Maßstab: 100µm.

Es scheint, als könne eine Zelllinie alle Stadien der beschriebenen Typen annehmen und diese Stadien unterschiedlich schnell durchlaufen. Da für die Kultivierung durchgehend das

FCS Gold der Firma Biochrom verwendet und die Charge während der Experimente nicht verändert wurde, ist der Einfluss der Zusammensetzung des FCS auszuschließen. Bei den in den folgenden Kapiteln beschriebenen Versuchen wurden aber immer Zelllinien verwendet, die den zuvor beschriebenen Klassen entsprechen.

4.1.3 Untersuchung der MCCL auf MCPyV-DNA und virale Proteine

Im Jahre 2008 fand die Arbeitsgruppe um Patrick Moore in Pittsburgh heraus, dass ca. 80% aller MCC die DNA eines Polyomavirus klonal in ihr Genom integriert haben. Dieses Virus wurde Merkelzellpolyomavirus (MCPyV) genannt. Die Häufigkeit der MCPyV infizierten MCC konnte noch von einigen Arbeitsgruppen bestätigt werden (u.a. Becker J. C. et al. 2009b, Foulongne et al. 2008, Garneski et al. 2009, Kassem et al. 2008), und auch in MCCL konnte das Virus nachgewiesen werden (Shuda et al. 2008).

Im Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und dem Heinrich-Pette Institut in Hamburg wurden die in dieser Arbeit verwendeten MCCL auf das Vorkommen des MCPyV untersucht. Es zeigte sich, dass acht der zehn getesteten Zelllinien positiv und zwei negativ für das MCPyV sind. Auch die Kopienzahl viraler DNA pro Zelle wurde in den Virus-positiven Zelllinien mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. Die Zelllinien MCCL-3, MCCL-11, MCCL-12 und MCCL-15 haben mehr als eine Kopie viraler DNA in jeder Zelle. Bei der Linie MKL-1 wurde in etwa eine Kopie viraler DNA pro Zelle gefunden und die Linien MCCL-5 und MCCL-7 tragen die virale DNA nicht in allen ihren Zellen (Abb. 4.15).

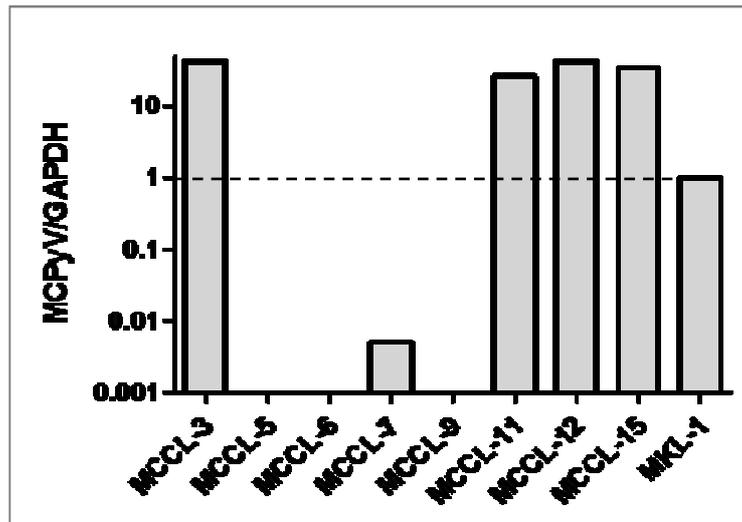


Abbildung 4.15: MCPyV Kopienzahl in MCCL

Genomische DNA aus den MCCL wurde durch qRT-PCR auf die Kopienzahl viraler DNA pro Zelle untersucht. Die Graphik zeigt die MCPyV-Kopienzahl relativ zur GAPDH-Expression. Es ist exemplarisch das Ergebnis eines Versuches gezeigt, wobei der Anteil viraler DNA in MCCL-5 in diesem Versuch zu gering war um es in der Graphik darzustellen. In anderen Versuchen wurden aber größere Mengen detektiert (Fischer et al. 2010). MCCL-8 wurde nicht auf die Kopienzahl viraler DNA untersucht. Die Abbildung wurde von Dr. N. Fischer zur Verfügung gestellt (Institut für Mikrobiologie, UKE).

Das große T-Antigen (LT-Antigen) von Polyomaviren spielt in der Tumorgenese eine wichtige Rolle. Vom SV40-Virus weiß man, dass das LT-Antigen die Tumorsuppressorproteine Retinoblastoma (Rb) und p53 binden kann (Caracciolo et al. 2006, Moens et al. 2007). Deshalb wurde im Westernblot das LT-Antigen in den MCCL detektiert. Da das LT-Antigen in allen untersuchten MCPyV verkürzt ist (Fischer et al. 2010, Shuda et al. 2008), kann das Protein in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich groß sein. In der Westernblotanalyse sieht man, dass MCCL-8, MCCL-12, MCCL-15 und MKL-1 das LT-Antigen in detektierbarer Menge bilden. Die Proteine von MCCL-8 und MCCL-12 haben ungefähr eine Größe von 45 kDa bzw. 43 kDa, die Bande von MCCL-15 liegt bei 54 kDa und die von MKL-1 hat eine Größe von ungefähr 52 kDa. Dies entspricht der Größenordnung der LT-Antigene anderer MCCL. Die Bande auf der Höhe des Pfeils in Abbildung 4.16 scheint eine unspezifische Bande zu sein, denn sie ist auch in der Keratinozyten-Negativkontrolle zu sehen (Abb. 4.16).

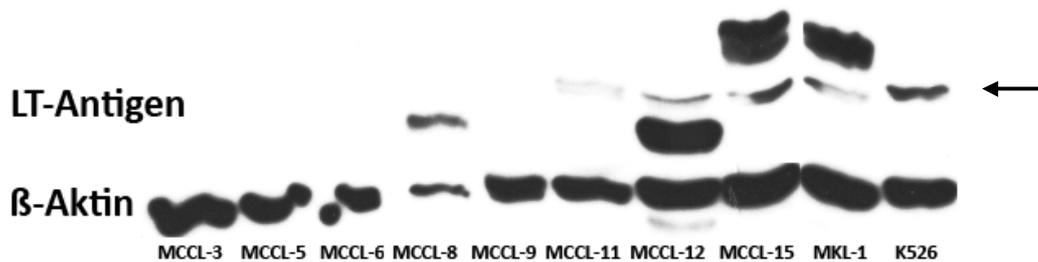


Abbildung 4.16: Westernblotanalyse des LT-Antigens in MCCL

Untersuchung der LT-Antigen Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-8, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-12, MCCL-15 und MKL-1. Das LT-Antigen Protein ist verkürzt und deshalb in einem Größenbereich von 40 – 55 kDa zu finden. Die Keratinozytenkultur K526 diente als Negativkontrolle. Der Pfeil markiert die Höhe einer unspezifischen Bande auf dem Blot. Der Versuch wurde zweimal (MCCL-8, MCCL-11, MCCL-12,) bis dreimal (MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9, MCCL-15, MKL-1) durchgeführt. Die Abbildung zeigt einen exemplarischen Westernblot mit allen untersuchten MCCL.

Des Weiteren wurden die absoluten Proteinmengen der Tumorsuppressorproteine Rb und p53 in den einzelnen MCCL ermittelt. Abbildung 4.17 A zeigt die quantitative Westernblotauswertung der Rb-Bandenintensitäten in den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-8, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-15 und MKL-1 normalisiert auf das *Housekeeping*-Gen β -Aktin, welches gleichzeitig als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung des Gels verwendet wurde. Die höchsten Rb-Proteinlevel findet man bei MCCL-15 und MKL-1, die geringsten bei MCCL-3 und MCCL-5. In der quantitativen Auswertung der p53-Banden von MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-8, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-15 und MKL-1 findet man eindeutig die höchste p53 Proteinkonzentration in den Zellen der Linie MCCL-9, die geringste bei MKL-1 (Abb. 4.17 B). Bei der Korrelation der Mengen des Tumorsuppressorproteins von Rb mit der Expression des LT-Antigens scheinen diese Zelllinien, die positiv für das LTA-Antigen sind, etwas größere Mengen von Rb zu exprimieren (Abb 4.17 C). Der Vergleich der Rb-Proteinmengen mit der generellen Viruslast der Zelllinien zeigt hingegen keine Korrelationen. Die Korrelation der Proteinmengen von p53 mit der Expression des LT-Antigens zeigt keine Anzeichen für eine gegenseitige Beeinflussung beider Proteine (Abb. 4.17 D), was aufgrund der fehlenden p53-Bindungsstelle für das LT-Antigen auch nicht zu erwarten war. Auch beim Vergleich der generellen Viruslast der Zelllinien und den Tumorsuppressorproteinleveln ergeben sich bei diesem Protein keine Korrelationen.

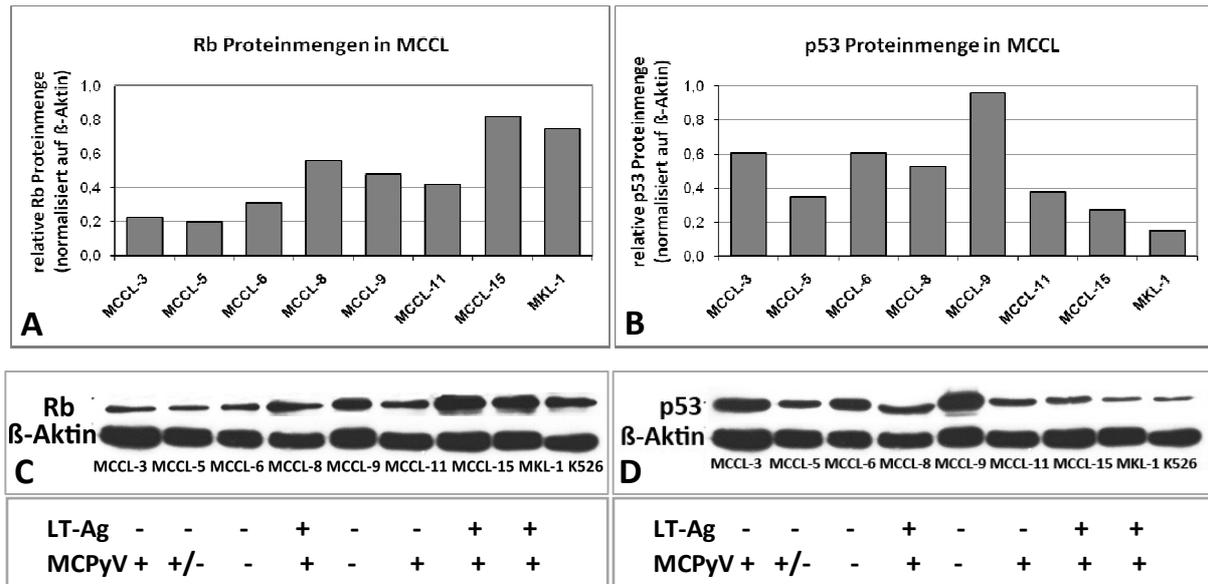


Abbildung 4.17: Analyse der Rb- und p53 Proteinmengen in MCCL und Korrelation zur LT-Antigen Expression und der MCPyV Last der Zelllinien

Quantitative Auswertung der Westernblots von Rb (A) und p53 (B) in den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-8, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-15 und MKL-1. Die Intensitäten der Banden von Rb bzw p53 wurden auf die Intensität der β -Aktin Bande desselben Blots normalisiert. (C) Korrelation der Rb-Proteinmenge zur LT-Antigen Genpression und MCPyV Status der MCCL. (D) Korrelation der p53-Proteinmenge zur LT-Antigen Genpression und MCPyV Status der MCCL.

4.1.4 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von MCCL

Die MCCL zeigen untereinander eine sehr unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit. Einige der Linien scheinen sich schnell zu vermehren, wohingegen bei anderen MCCL kaum ein Wachstum der Kultur beobachtet werden kann. Mit Hilfe des WST-1 Assays wurden die Zelllinien MCCL-3, MCCL -5, MCCL -6, MCCL -9 und MKL-1 über einen Zeitraum von sieben Tagen auf ihr Wachstum untersucht (Abb. 4.18). Der Assay basiert auf der Spaltung von WST-1 zu einem Formazan durch zelluläre mitochondriale Dehydrogenasen in lebenden Zellen. Das Formazan kann fotometrisch gemessen werden und ist somit proportional zu der Anzahl lebender Zellen in der Kultur. Misst man diesen Wert über mehrere Tage, kann darüber die Wachstumskurve der Zelllinie ermittelt werden. In diesem Versuch wurden Messungen an den Tagen 0, 3, 5 und 7 gemacht. Der Versuch konnte nur mit Zelllinien durchgeführt werden, die auch ohne *Feederlayer* wachsen. Um Unterschiede zwischen den Messungen der einzelnen Versuche auszugleichen, wurde der höchste gemessene Wert

eines Versuches auf die OD von 1 gesetzt und die anderen gemessenen Werte darauf normiert.

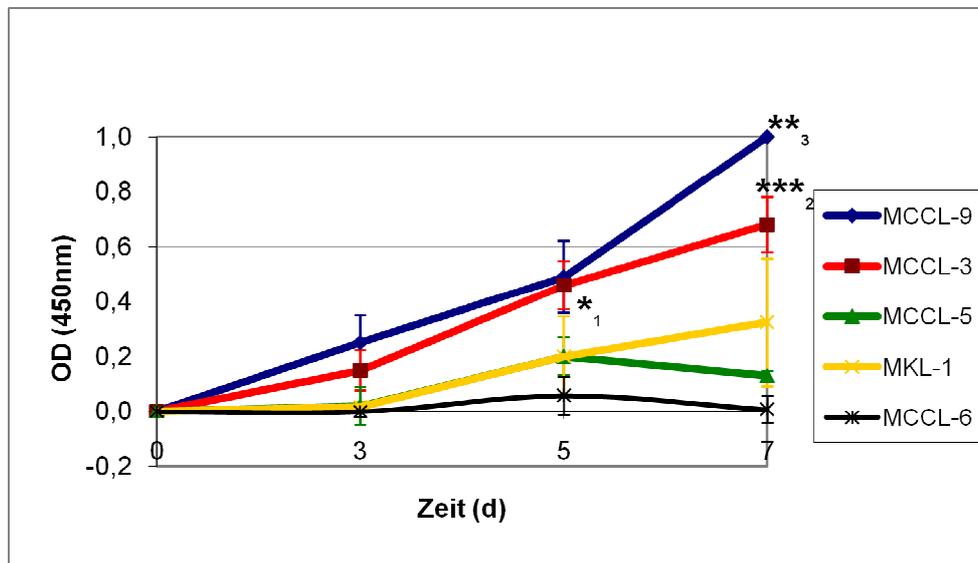


Abbildung 4.18: Vergleich der Wachstumskurven von MCCL über einen Zeitraum von 7 Tagen

Wachstumskurven der Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9 und MKL-1 mit Messwerten an den Tagen 0, 3, 5 und 7 nach dem Aussähen von 5×10^4 Zellen pro well einer 96-well Schale. In jedem Versuch wurde der höchste gemessene Wert auf 1 gesetzt und die anderen Werte darauf normiert. $n = 5$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$; Mittelwerte \pm SEM. *₁ = MCC_3 und MCCL-9 sind signifikant zu MCCL-5 und MCCL-6; ***₂ = signifikant zu MCCL-5 und MCCL-6; **₃ = signifikant zu MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6 und MKL-1.

Die Linie MCCL-9 zeigt die höchste Wachstumsrate aller untersuchten MCCL. Nach 7 Tagen ist das Wachstum der Kultur signifikant höher als bei allen andern Zelllinien. Ebenfalls eine sehr hohe Wachstumsrate zeigt die Zelllinie MCCL-3. Sowohl nach 5 als auch nach 7 Tagen ist ihr Wachstum signifikant schneller als bei den Linien MCCL-5 und MCCL-6. Die Zelllinien MCCL-5, MCCL-6 und MKL-1 zeigen ein deutlich schlechteres Wachstum als MCCL-3 und MCCL-9. Die Unterschiede zwischen MCCL-5, MCCL-6 und MKL-1 sind zu keinem gemessenen Zeitpunkt signifikant (Abb. 4.18).

Um das Wachstum der Zelllinien noch genauer zu charakterisieren, wurde zusätzlich zu den Wachstumskurven noch die Proliferation der Zellen und ihre Apoptoserate untersucht, denn charakteristisch für das MCC sind neben einem hohen proliferativen Index auch eine große Anzahl apoptotischer Zellen. Die Proliferation der Zelllinien wurde mit dem BrdU-Elisa Kit von Roche bei den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9 und MKL-1 durchgeführt. Analog zum WST-1 Assay wurden für einen Versuch 5×10^4 Zellen pro well einer 96-well Schale verwendet und der höchste gemessene Wert des Versuches auf eine OD von 1

gesetzt. Die Zelllinien MCCL-9 zeigt die größte gemessene Absorption im BrdU-Elisa (Abb. 4.19 A). Die Proliferation dieser Zelllinie ist signifikant höher als die der Zelllinien MCCL-5, MCCL-6 und MKL-1. Nur MCCL-3 hat eine ähnlich hohe Proliferation wie MCCL-9. Der Unterschied zwischen beiden Linien ist nicht signifikant. Die Proliferationsrate vom MCCL-3 ist statistisch signifikant höher als die der Linien MCCL-5 und MKL-1. Die geringste Proliferation wurde bei MCCL-5 gemessen, ähnlich niedrig liegen auch die Werte für MCCL-6 und MKL-1.

Die Anzahl der apoptotischen Zellen der Kulturen wurde mit Hilfe des *ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit* von Chemicon ermittelt. Von den untersuchten Zelllinien wurden *Cytospins* angefertigt und die apoptotischen Zellen angefärbt. Pro Objektträger wurden 3 Gesichtsfelder ausgezählt und der Anteil apoptotischer Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld, ermittelt. Zwischen den einzelnen Zelllinien gibt es zwar leichte Unterschiede im Anteil apoptotischer Zellen, aufgrund des großen Standardfehlers sind diese Unterschiede aber nicht signifikant (Abb. 4.19 B). Den größten Anteil apoptotischer Zellen hat die Linie MCCL-6. Zusammen mit ihrer relativ niedrigen Proliferation erklärt dies die geringe Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie, die im WST-1 Assay gemessen wurde. Die am schnellsten wachsende Linie MCCL-9 hat zugleich auch die niedrigste Apoptoserate und die höchste Proliferation. Grundsätzlich scheint bei den MCCL aber die Proliferation der entscheidende Faktor für die Wachstumsgeschwindigkeiten der Zelllinien zu sein.

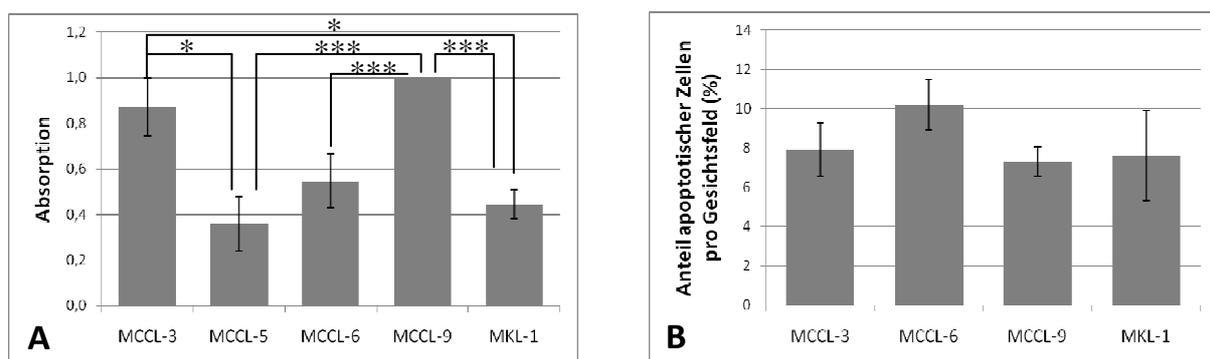


Abbildung 4.19: Vergleich von Proliferation und Apoptose in MCCL

(A) Proliferation der Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9 und MKL-1 im BrdU-Elisa. (B) Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl (in %) in den Zelllinien MCCL-3, - MCCL-6, MCCL-9 und MKL-1. $n = 3$; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,005$; Mittelwerte \pm SEM.

Korrelationen der Wachstumsgeschwindigkeiten bzw. Proliferation der Zelllinien zu ihrer Morphologie gibt es nicht und auch das Vorkommen von MCPyV-DNA bzw. die Expression von LT-Antigen in den Zelllinien ist nicht mit dem Wachstum der Zelllinien assoziiert, da es sowohl MCPyV-positive als auch negative Zelllinien gibt die sehr schnell wachsen und LT-Antigen positive und negative Linien, die langsam wachsen.

4.1.5 Untersuchung der Invasivität von Zellen der MCCL

Um mögliche Unterschiede in der Invasivität zwischen den MCCL zu untersuchen, wurden Sphäroide der Typ I MCCL in Kollagengele gesetzt und die Auswanderung von Zellen aus diesen Sphäroiden über einen Zeitraum von einer Woche täglich dokumentiert. Bei allen fünf MCCL kann nach drei bis vier Tagen einer Auswanderung von Zellen in das Kollagen gel beobachtet werden. Allerdings gibt es bei allen Zelllinien auch Sphäroide, bei denen keine Zellauswanderung beobachtet werden kann. Auch Sphäroide aus der selben Kultur zeigen häufig ein unterschiedliches Invasionspotential. Die Abbildung 4.20 zeigt exemplarisch ein Sphäroid aller fünf Typ I MCCL, bei dem eine Zellauswanderung zu sehen ist (Abb. 4.20 A-E) und jeweils ein Sphäroid pro MCCL, bei dem keine Zellen aus dem Sphäroid auswandern (Abb. 4.20 F-J).

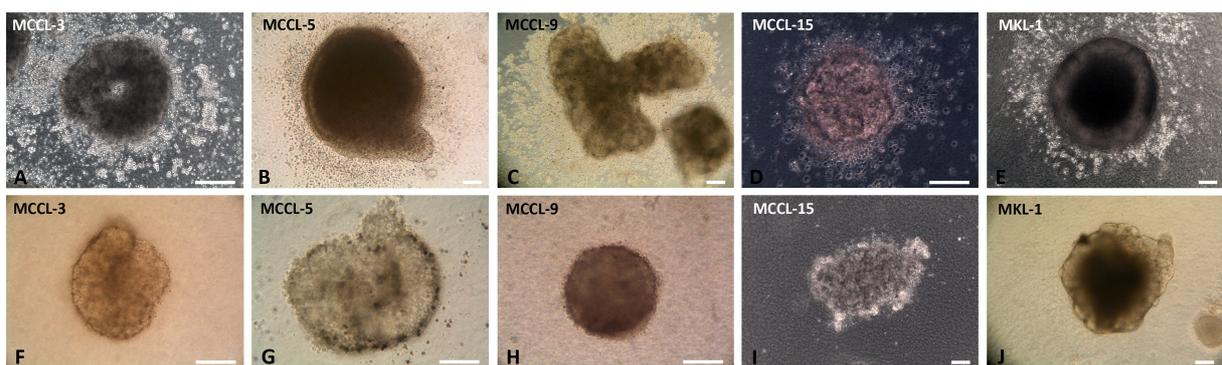


Abbildung 4.20: Vergleich der Invasivität von Zellen aus Typ I MCCL

Sphäroide der Typ I Zelllinien MCCL-3 (A, F), MCCL-5 (B, G), MCCL-9 (C, H), MCCL-15 (D, I) und MKL-1 (E, J) wurden in ein Kollagen gel gesetzt und die Auswanderung von Zellen aus dem Sphäroid über einen Zeitraum von einer Woche beobachtet. Die Bilder wurden alle nach fünf Tagen aufgenommen. (A)-(E) zeigen Sphäroide aller MCCL, bei denen Zellen aus den Sphäroiden auswandern, (F)-(J) zeigen Sphäroide, bei denen keine Invasion stattfindet. Maßstab: 100 μm .

Obwohl dieser Versuch für jede Zelllinie zwischen fünf und fünfzehn Mal wiederholt wurde, konnte bis jetzt noch nicht festgestellt werden, warum die Zellen im Invasionsexperiment so unterschiedlich reagieren. Bevor die Ursache für diese so heterogene Invasivität innerhalb einer Zelllinie nicht geklärt ist, kann hier leider keine Aussage über das Invasionspotential der einzelnen MCCL gemacht werden.

4.2 Untersuchung von TJ-Proteinen in MCCL

In diesem Kapitel werden die zuvor beschriebenen MCCL auf RNA und Proteinebene auf die Anwesenheit und Lokalisation der TJ-Proteine Cldn-1 bis -5, Occludin, JAM-A, ZO-1 und ZO-2 untersucht. Da die RNA-Konzentrationen aus den Isolationen der RNA von MCCL nur sehr gering ausfallen, konnten nicht alle Zelllinien auf RNA-Ebene untersucht werden, sondern nur die Linien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9, MKL-1 und teilweise MCCL-8.

4.2.1 Claudine in MCCL

Cldn-1 wird in heterotypischen Zellverbindungen zwischen Keratinozyten und Merkelzellen nicht exprimiert. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie mit 52 untersuchten MCCs in 20% der Fälle eine Cldn-1 Expression gefunden werden (Werling A. M. et al. 2011).

Auf RNA-Ebene zeigen die Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6 und MCCL-9 eine Expression für Cldn-1, was auf eine Hochregulation der Cldn-1 Expression in MCCL hinweist. Bei MCCL-8 und MKL-1 hingegen ist keine mRNA Expression nachzuweisen (Abb. 4.21 A). Die quantitative Real-time PCR (qRT-PCR), die mit anderen Primern durchgeführt wurde, bestätigt dieses Ergebnis (Abb. 4.21 B). Die höchste Cldn-1 Expression hat die Zelllinie MCCL-5, die geringste MKL-1. Die Linie MCCL-6 zeigt schon in der normalen rt-PCR eine schwächere Expression als die Linien MCCL-3, MCCL-5 und MCCL-9 und in der qRT-PCR wird ein Signal erst nach über 30 Amplifikationszyklen erreicht. Bei der Zelllinie MCCL-9 zeigt die rt-PCR ein eindeutiges Signal für Cldn-1 mRNA. In der qRT-PCR ist aber zu sehen, dass die Expression des Gens signifikant schwächer ist als bei der Linie MCCL-5.

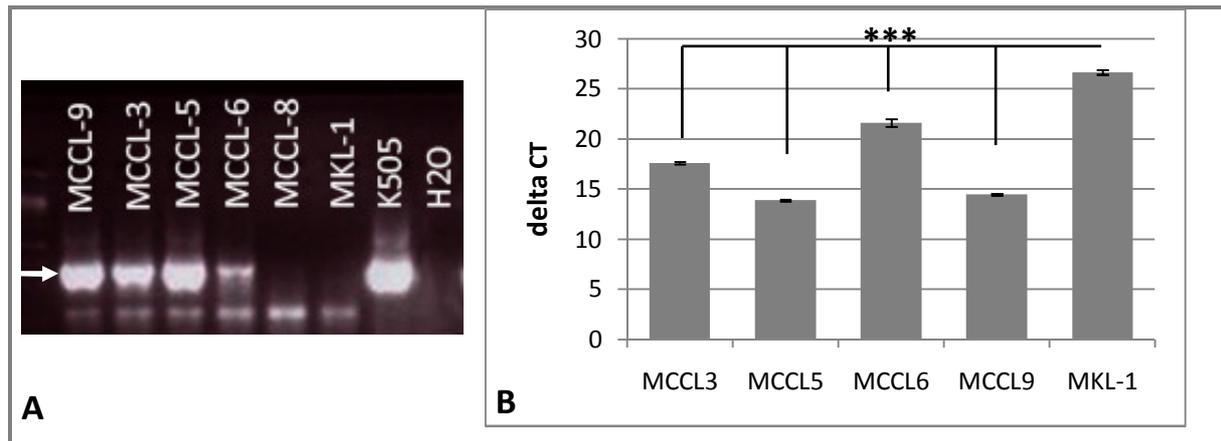


Abbildung 4.21: Cldn-1 mRNA Expression der MCCL

(A) Agarosegel einer Cldn-1 PCR der Zelllinien MCCL-9, -3, -5, -6, -8, MKL-1, der Positivkontrolle K505 (Keratinocytenkultur) und der H₂O-Negativkontrolle (n=3). Der Pfeil markiert die Höhe der spezifischen Bande der cDNA-Amplifikation in der Höhe von 306 kDa. (B) qRT-PCR für Cldn-1 bei den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -9 und MKL-1. Gezeigt sind die absoluten δ CT-Werte normalisiert auf das *Housekeeping*-Gen 18S. n = 3; ***: p \leq 0,005; Mittelwerte \pm SEM. Alle Proben exprimieren Cldn-1 in signifikant unterschiedlichen Mengen. Vergleichswert normale Haut (nicht gezeigt): δ CT = 10,67.

Auf Proteinebene wurden die Zelllinien ebenfalls auf Cldn-1 untersucht. Der Westernblot zeigt positive Signale für Cldn-1 bei den Zelllinien MCCL-5 und MCCL-7 und in manchen Untersuchungen MCCL-3. Als Positivkontrolle diente die Keratinocytenkultur K526, die einen sehr starken Proteingehalt für Cldn-1 zeigt (Abb. 4.22). Warum das Cldn-1 Proteine nur in diesen Zelllinien und nicht in MCCL-9, welche auf mRNA-Ebene ebenfalls hohe Cldn-1 Level zeigt, zu finden ist, ist bisher noch unklar. Mögliche Erklärungen hierfür könnten u.a. eine geringere Translation der Cldn-1 mRNA in dieser Zelllinie oder der Abbau des Proteins sein.

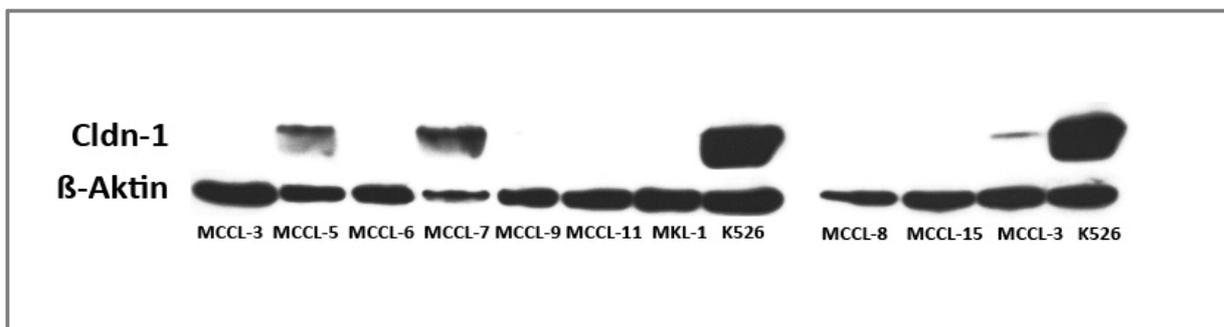


Abbildung 4.22: Cldn-1 Westernblotanalyse der MCCL

Beispielhafte Analyse der Cldn-1 Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -7, -9, -11, MKL-1 (linker Blot) sowie MCCL-8, -15 und -3 (rechter Blot). Die Keratinocytenkultur K526 diente als Positivkontrolle für die Cldn-1 Färbung des Blots. Von jeder Zelllinie wurden 30 μ g Protein für den Westernblot benutzt. Die Größe des Proteins liegt bei 22 kDa. n = 5 (MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9, MCCL-15, MKL-1), n = 3 (MCCL-7, MCCL-8, MCCL-11).

In der Immunfluoreszenzfärbung der zehn untersuchten Zelllinien des MCC sind vier Linien positiv für Cldn-1. MCCL-3 zeigt eine schwache Färbung für Cldn-1 in einem Teil der Zellen, wohingegen bei MCCL-5, MCCL-7 und MCCL-15 eine starke Färbung an den Zellgrenzen zu sehen ist. MCCL-6, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-12 und MKL-1 sind Cldn-1 negativ (Abb. 4.23). MCCL-8 ist ebenfalls negativ für Cldn-1 an den Zellgrenzen, allerdings scheint es eine leichte intrazelluläre Färbung in den Zellen zu geben (Abb. 4.23 e), die unspezifisch sein könnte, da MCCL-8 im Westernblot keine positive Antikörperreaktion zeigt. Die schwache Fluoreszenzfärbung von MCCL-3 (Abb. 4.23 a) wird im Westernblot durch eine sehr schwache Bande in einem der beiden Blots bestätigt. Der Grund hierfür könnte sein, dass MCCL-3 sehr wenig Cldn-1 Protein synthetisiert und gerade die Grenze für den Nachweis von Proteinen erreicht.

Insgesamt sind MCCL-5, MCCL-7 und MCCL-15 eindeutig auf Proteinebene Cldn-1 positiv, wobei MCCL-15 nur in der Immunfluoreszenz positiv getestet wurde. MCCL-3 scheint Cldn-1 nur in geringen Mengen zu bilden. MCCL-9 exprimiert ebenfalls viel Cldn-1 mRNA, ist aber auf Proteinebene negativ. Eine Kontamination der PCR mit genomischer DNA kann ausgeschlossen werden, da von allen Proben cDNA-Kontrollen ohne reverse Transkriptase hergestellt und diese mit allen verwendeten Primern getestet wurden. Dabei konnten nie positive Ergebnisse detektiert werden. Ein Beispiel dafür ist in Abb. 4.25 zu sehen.

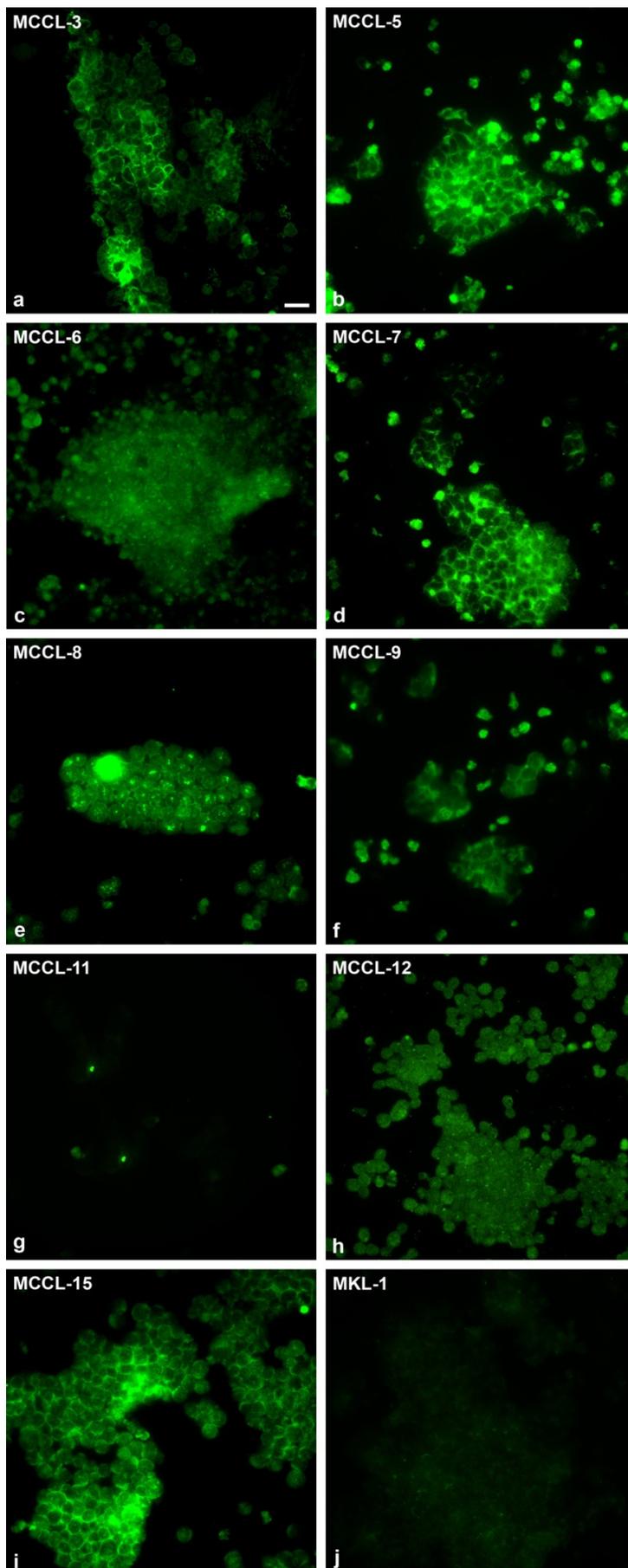


Abbildung 4.23: Immunhistochemische Färbung von Cldn- 1 in MCCL.

Cytospins von zehn verschiedenen MCCL wurden auf die Lokalisation von Cldn-1 (grün) untersucht. Die Zelllinien MCCL-3, MCCL5, MCCL7 und MCCL-15 zeigen eine typische Cldn-1 Färbung an den Zellgrenzen. Die Zelllinien MCCL-6, MCCL-9, MCCL-11, MCCL.12 und MKL-1 sind hingegen negativ für Cldn-1 und MCCL-8 zeigt eine leichte intrazelluläre Cldn-1 Färbung. Im Gegensatz zu der spezifischen Cldn-1 Färbung an den Zellgrenzen sind tote Zellen gleichförmig gefärbt und zeigen eine sehr starke, aber unspezifische, Fluoreszenzreaktion. Maßstab: 50 µm.

Cldn-2 wird in heterotypischen Verbindungen zwischen Merkelzellen und Keratinozyten nicht exprimiert. Auch in Untersuchungen an MCC-Tumorgewebe konnte bisher kein Cldn-2 nachgewiesen werden (Werling et al. 2011). Die Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-8, MCCL-9 und MKL-1 zeigen alle eine schwache Cldn-2 Bande in der PCR (Abb. 4.24 A), im Westernblot sind aber alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien negativ für Cldn-2 (Abb. 4.24 B). Möglicherweise resultiert die schwache Cldn-2 mRNA Expression in einer nur geringen oder sogar gar keiner Proteinsynthese, die zu gering für den Nachweis im Westernblot ist.

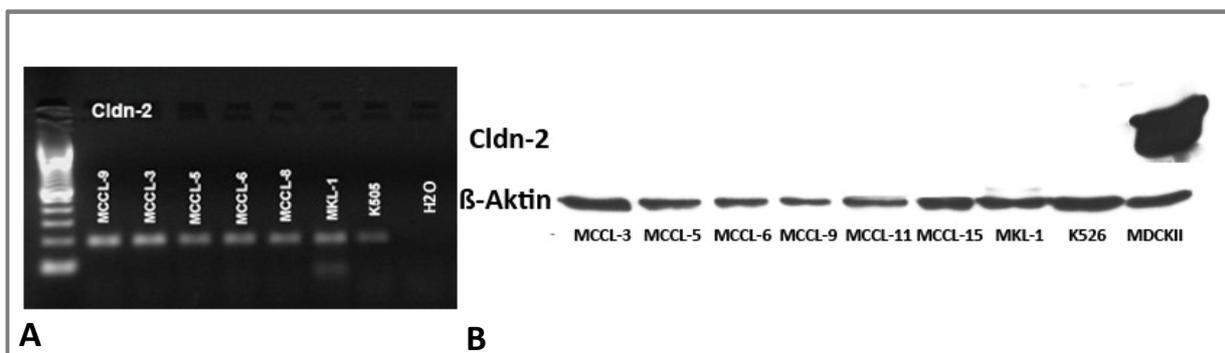


Abbildung 4.24: Cldn-2 PCR- und Westernblotanalyse der MCCL

(A) Agarosegel einer Cldn-2 PCR mit den Zelllinien MCCL-9, -3, -5, -6, -8 und MKL-1 ($n=3$). Die Bande entspricht der erwarteten Größe des amplifizierten cDNA-Abschnitts von 171 bp. (B) Analyse der Cldn-2 Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -9, -11, -15 und MKL-1. Die Keratinozytenkultur K526 wurde als Negativkontrolle verwendet, die Zelllinie MDCKII als Positivkontrolle für die Cldn-2 Färbung des Blots. Von jeder Zelllinie wurden 30 μ g Protein für den Westernblot benutzt. Die Größe des Proteins liegt bei 22 kDa. $n = 2$.

Die Cldn-3 PCR für Zelllinien des MCC zeigt starke Banden bei den Linien MCCL-3 und MCCL-5. MCCL-6, MCCL-8, MCCL-9 und MKL-1 hingegen zeigen etwas schwächere Banden (Abb. 4.25 A).

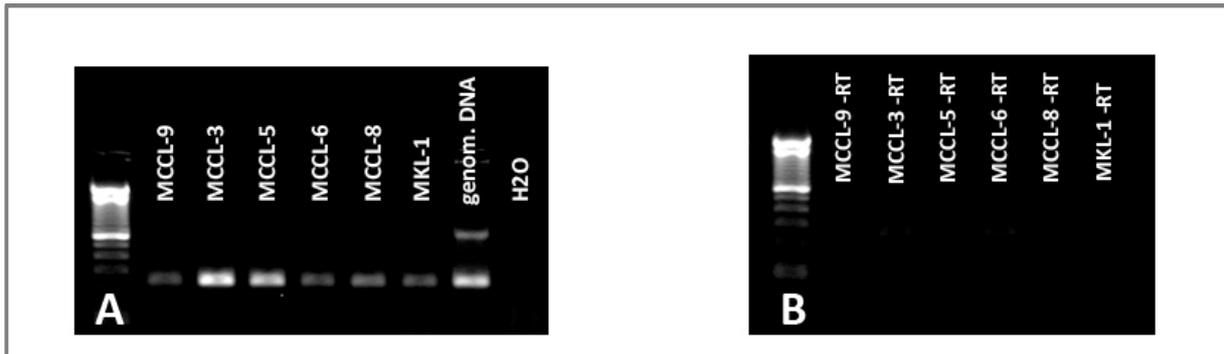


Abbildung 4.25: Cldn-3 mRNA Expression in den MCCL

(A) Agarosegel einer Cldn-3 PCR mit den Zelllinien MCCL-9, -3, -5, -6, -8 und MKL-1 (n=3). Genomische DNA wurde als Positivkontrolle verwendet, H₂O als Negativkontrolle. Die Bande entspricht der erwarteten Größe des amplifizierten cDNA-Abschnitts von 246 bp. (B) Agarosegel der -RT-Kontrollen der Cldn-3 PCR. Die cDNA aller Zelllinien wurde ohne das Enzym reverse Transkriptase hergestellt und die PCR mit dieser cDNA wie gewohnt durchgeführt. Die Abbildung zeigt, dass es keine Verunreinigungen der RNA-Proben mit genomischer DNA gegeben hat.

Auf Proteinebene sind die Linien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9 und MCCL-15 im Westernblot positiv für Cldn-3 (Abb. 4.26). Insgesamt sind somit auf Proteinebene alle Typ I MCCL, mit Ausnahme von MKL-1, positiv für Cldn-3. Die in der PCR schwach positiven Linien MCCL-6, MCCL-8 und MKL-1 sind auf Proteinebene negativ. Auch hier könnte ein Proteinabbau in den Zelllinien stattfinden oder die gebildeten Proteinmengen sind zu gering für den Westernblotnachweis.

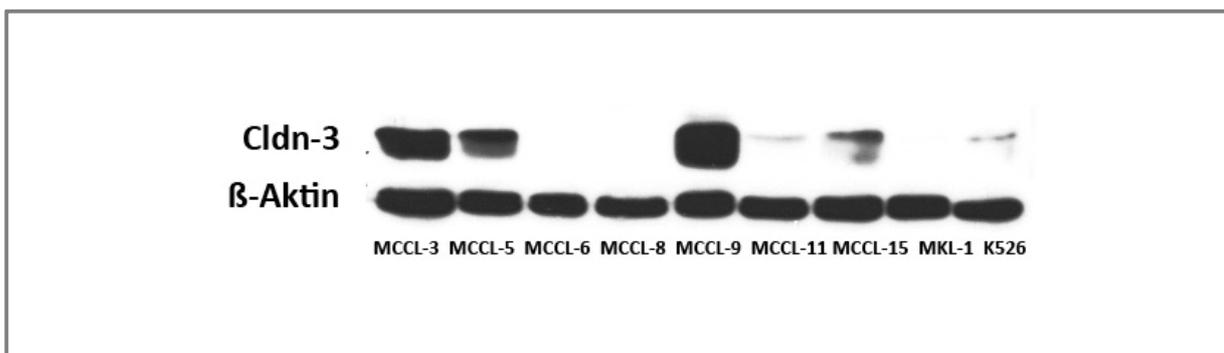


Abbildung 4.26: Cldn-3 Westernblotanalyse der MCCL

Exemplarisches Beispiel der Analyse der Cldn-3 Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -8, -9, -11, -15 und MKL-1 und der Keratinozytenkultur K526. Von jeder Zelllinie wurden 30 µg Protein für den Westernblot benutzt. Die Größe des Proteins liegt bei 22 kDa. n = 3.

Im Gegensatz zu untersuchtem Tumorgewebe des MCC, bei dem nur in 12% aller 52 untersuchten Fälle Cldn-4 nachgewiesen werden konnte (Werling A. M. et al. 2011), sind

viele MCCL positiv für dieses Protein. Auf RNA-Ebene sind die untersuchten Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-8, MCCL-9 und MKL-1 Cldn-4 in der rt-PCR positiv (Abb. 4.27 A). Die qRT-PCR, die mit anderen Primern durchgeführt wurde, bestätigt dieses Ergebnis und zeigt zusätzlich, dass die höchste Cldn-4 mRNA Expression bei den Linien MCCL-3, MCCL-6 und MCCL-9 mit δCT -Werten, die etwa bei 15 liegen, zu finden ist. Die Werte der Linien MCCL-5 und MKL-1 liegen etwas höher (Abb. 4.27 B).

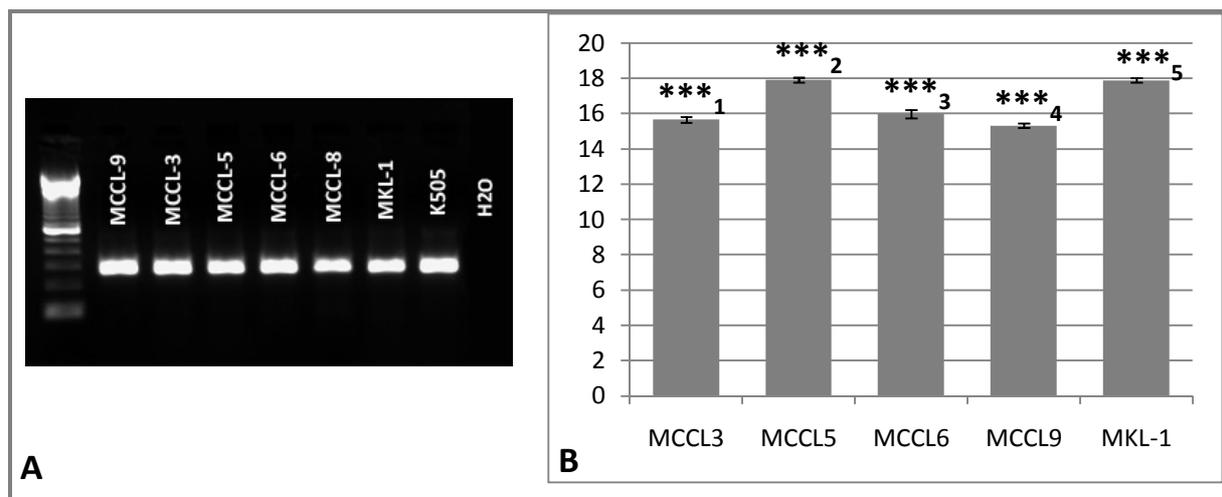


Abbildung 4.27: Cldn-4 mRNA Expression der MCCL

(A) Agarosegel einer Cldn-4 PCR bei den Zelllinien MCCL-9, -3, -5, -6, -8 und MKL-1 (n=3). Die Keratinozytenkultur K505 wurde als Positivkontrolle benutzt. Die Bande entspricht der erwarteten Größe des amplifizierten cDNA-Abschnitts von 247 bp. (B) qRT-PCR für Cldn-4 bei den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -9 und MKL-1. Gezeigt sind die absoluten δCT -Werte normalisiert auf das *Housekeeping*-Gen 18S. n = 3; ***: p ≤ 0,005; Mittelwerte ± SEM; ***₁: signifikant zu MCCL-5 und MKL-1; ***₂: signifikant zu MCCL-3, MCCL-6, MCCL-9; ***₃: signifikant zu MCCL-5, MKL-1; ***₄: signifikant zu MCCL-5, MKL-1; ***₅: signifikant zu MCCL-3, MCCL-6, MCCL-9. Vergleichswert normale Haut (nicht gezeigt): δCT = 10,99.

Diese schwächere Cldn-4 mRNA Expression bei MCCL-5 und MKL-1 scheint sich auch auf die Proteinmenge der Zelllinien auszuwirken. Im Westernblot werden bei den Linien MCCL-3, MCCL-7, MCCL-8, MCCL-9, MCCL-11 und MCCL-15 starke Proteinmengen detektiert. MCCL-5 und MCCL-6 exprimieren Cldn-4 schwächer als die übrigen Linien und MKL-1 sowie MCCL-8 sind auf Proteinebene Cldn-4 negativ (Abb. 4.28).

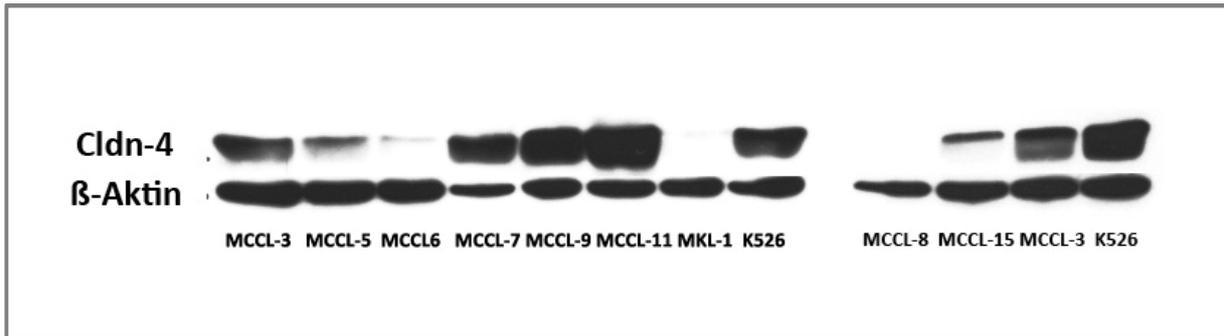


Abbildung 4.28: Cldn-4 Westernblotanalyse der MCCL

Exemplarisches Beispiel der Analyse der Cldn-4 Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -7, -9, -11, MKL-1 (linker Blot) sowie MCCL-8, -15 und -3 (rechter Blot). Die Keratinozytenkultur K526 diente als Positivkontrolle für die Cldn-4 Färbung des Blots. Von jeder Zelllinie wurden 30 µg Protein für den Westernblot benutzt. Die Größe des Proteins liegt bei 22 kDa. n = 5 (MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9, MKL-1), n = 4 (MCCL-6, MCCL-15), n = 3 (MCCL-7, MCCL-8, MCCL-11).

Cldn-5 ist das in Tumoren des MCC am häufigsten gefundene TJ-Protein. In einer Studie mit 52 Fällen konnte dieses Protein in 86% der Tumore gefunden werden (Werling A. M. et al. 2011). Bei den Zelllinien des MCC ist Cldn-5 in allen sechs untersuchten Linien auf RNA-Ebene nachzuweisen (Abb. 4.29). Allerdings ist die Bande für MCCL-9 nur sehr schwach. Die zweite, etwas kleinere, Bande ist unspezifisch und könnte durch die Bindung der Primer an andere cDNA-Sequenzen zustande kommen. Die Analyse der Primer ergab Übereinstimmungen der cDNA und Primersequenzen von 7 bp bei jedem Primer. Der dadurch zusätzlich amplifizierte cDNA-Abschnitt könnte eine Erklärung für die unspezifische Bande sein.

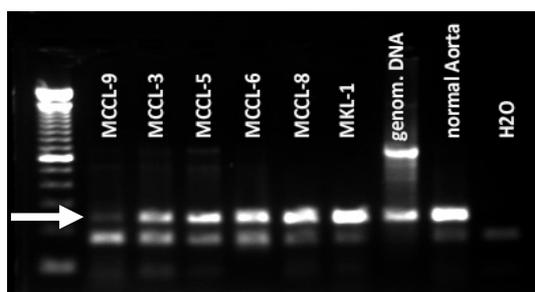


Abbildung 4.29: Cldn-5 mRNA Expression der MCCL

(A) Agarosegel einer Cldn-5 PCR bei den Zelllinien MCCL-9, -3, -5, -6, -8 und MKL-1 (n=3). Genomische DNA und Aorta cDNA wurden als Positivkontrollen verwendet. Der Pfeil markiert die Bande des amplifizierten cDNA-Abschnitts in der erwarteten Größe von 235 bp.

Im Gegensatz dazu wird das Cldn-5 Protein nur in den Zelllinien MCCL-3, MCCL-9, MCCL-15, MKL-1 und ganz schwach in der Linie MCCL-5 detektiert (Abb. 4.30). Interessanterweise sind

diese Linien alle vom Typ I und bilden, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, feste dreidimensionale Sphäroide. Alle anderen Zelllinien sind auf Proteinebene Cldn-5 negativ.

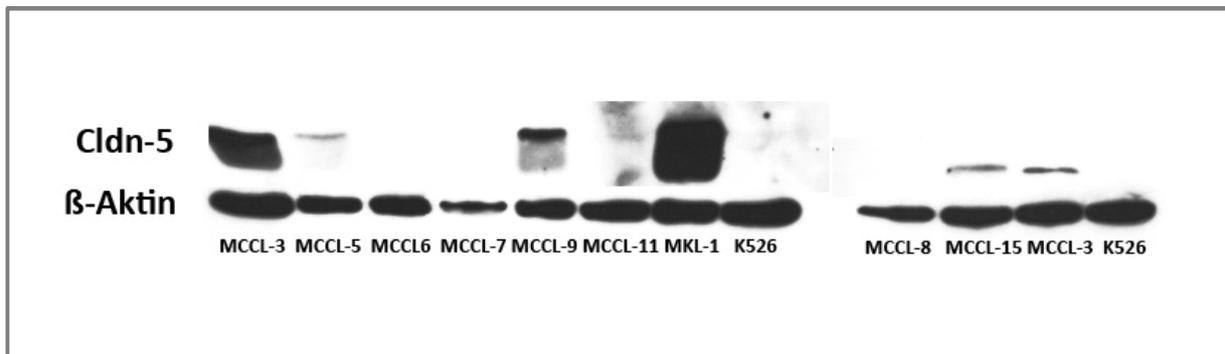


Abbildung 4.30: Cldn-5 Westernblotanalyse der MCCL

Beispielhafte Analyse der Cldn-5 Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-7, MCCL-9, MCCL-11, MKL-1 (linker Blot) sowie MCCL-8, MCCL-15 und MCCL-3 (rechter Blot). Die Keratinozytenkultur K526 diente als Negativkontrolle für die Cldn-5 Färbung des Blots. Von jeder Zelllinie wurden 30 µg Protein für den Westernblot benutzt. Die Größe des Proteins liegt bei 22 kDa. n = 4 (MCCL-3), n = 3 (MCCL-5, MCCL-6, MCCL-7, MCCL-8, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-15, MKL-1).

4.2.2 Occludin in MCCL

Das Transmembranprotein Occludin wurde ebenso wie die Claudine auf mRNA und auf Proteinebene in den MCCL untersucht. Auf RNA-Ebene wird in der rt-PCR bei den Linien MCCL-9, MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-8 und MKL-1 überall ein Signal detektiert (Abb. 4.31 A). In der qRT-PCR werden aber Unterschiede in der Menge der exprimierten mRNA sichtbar (Abb. 4.31 B). Die stärkste Occludin Expression zeigen die Zelllinien MCCL-3 und MCCL-9. Die δ CT-Werte dieser beiden Linien liegen bei 12,7 bzw. bei 12,9. Im Gegensatz dazu findet man eine geringe Occludin Expression bei MCCL-6 und MKL-1. Hier liegen die δ CT-Werte bei 16,1 und 15,9. Der δ CT-Werte der Linie MCCL-5 liegt bei 14,4.

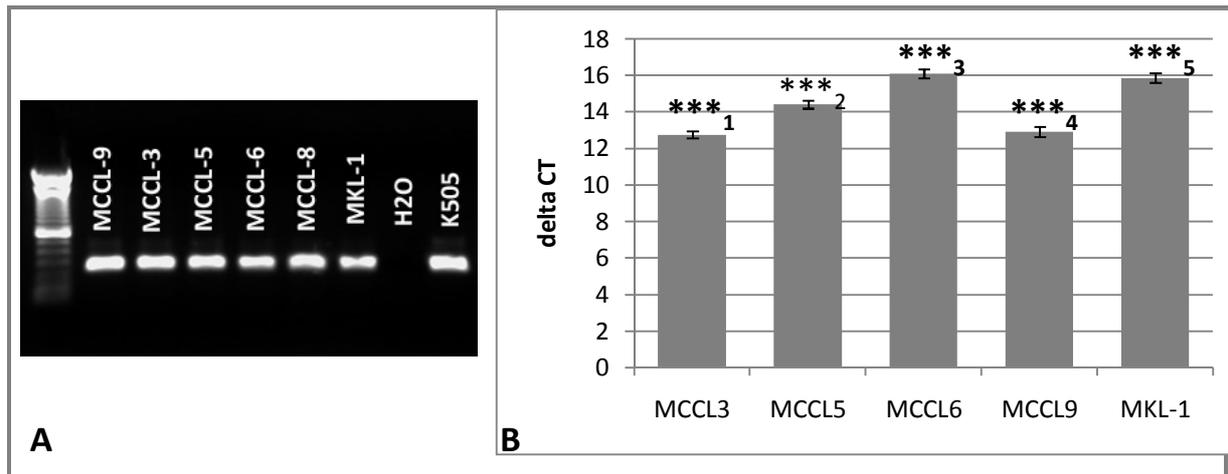


Abbildung 4.31: Occludin mRNA Expression der MCCL

(A) Agarosegel einer Occludin PCR bei den Zelllinien MCCL-9, -3, -5, -6, -8 und MKL-1 (n=3). Die Keratinozytenkultur K505 wurde als Positivkontrolle benutzt. Die Bande entspricht der erwarteten Größe des amplifizierten cDNA-Abschnitts von 229 bp. (B) qRT-PCR für Occludin bei den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -9 und MKL-1. Gezeigt sind die absoluten δ CT-Werte normalisiert auf das *Housekeeping*-Gen 18S. n = 3; ***: p \leq 0,005; Mittelwerte \pm SEM; ***₁: signifikant zu MCCL-5, MCCL-6, MKL-1; ***₂: signifikant zu MCCL-3, MCCL-6, MCCL-9, MKL-1; ***₃: signifikant zu MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9; ***₄: signifikant zu MCCL-5, MCCL-6, MKL1; ***₅: signifikant zu MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9.

Der Westernblot zeigt, dass die Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9, MCCL-15 und MKL-1 das Occludin Protein synthetisieren, wobei die Bande bei MKL-1 deutlich schwächer ist als die der übrigen Linien (Abb. 4.32). Interessant ist die Beobachtung, dass, ähnlich wie auch schon bei Cldn-5 in Kapitel 4.2.1 gezeigt wurde, nur die Zelllinien Occludin bilden, die zu den Typ I Zelllinien gehören und in Kultur feste dreidimensionale Sphäroide bilden.

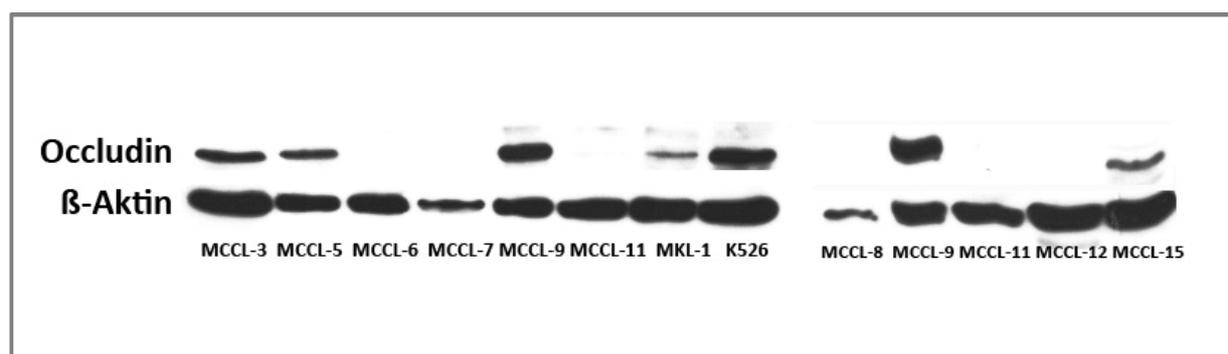


Abbildung 4.32: Occludin Westernblotanalyse der MCCL

Beispielhafte Analyse der Occludin Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -7, -9, -11, MKL-1 (linker Blot) sowie MCCL-8, -9, -11, -12 und -15 (rechter Blot). Die Keratinozytenkultur K526 diente als Positivkontrolle für die Occludin Färbung des Blots. Von jeder Zelllinie wurden 30 μ g Protein für den Westernblot benutzt. Die Größe des Proteins liegt wie erwartet bei 66 kDa. n = 5 (MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9, MCCL-11), n = 4 (MCCL-6, MKL-1), n = 3 (MCCL-7, MCCL-8, MCCL-12, MCCL-15).

Dieses Ergebnis kann auch durch die immunhistochemischen Färbungen der Zellen mit Antikörpern gegen Occludin bestätigt werden (Abb.4.33). Bei MCCL-3 ist die Occludin-Färbung vor allem an den Zellgrenzen lokalisiert ist. Dasselbe zeigt die Färbung der Linie MCCL-5, wobei hier die Färbung in allen Zellen deutlich stärker ist als bei MCCL-3. Auch bei MCCL-9 ist Occludin eindeutig an den Zellgrenzen lokalisiert. Etwas schwächer ist die Färbung der Linie MCCL-15, aber die Lokalisation des Proteins ist deutlich an den Zellgrenzen zu erkennen. Im Gegensatz zum Westernblot ist die Färbung der Linie MKL-1 negativ. Eventuell ist die Proteinmenge zu gering um in der Immunfluoreszenz detektiert zu werden. Eine leichte Färbung für Occludin ist auch bei der Linie MCCL-8 zu sehen, die im Westernblot keine Bande zeigt. Die Färbung ist aber bei dieser Zelllinie nicht ausschließlich an den Zellgrenzen lokalisiert. Der Westernblot zeigt mit dem verwendeten Occludin Antikörper keine unspezifischen Banden, die für eine Kreuzreaktion des Antikörpers sprechen und somit die Färbereaktion erklären könnten.

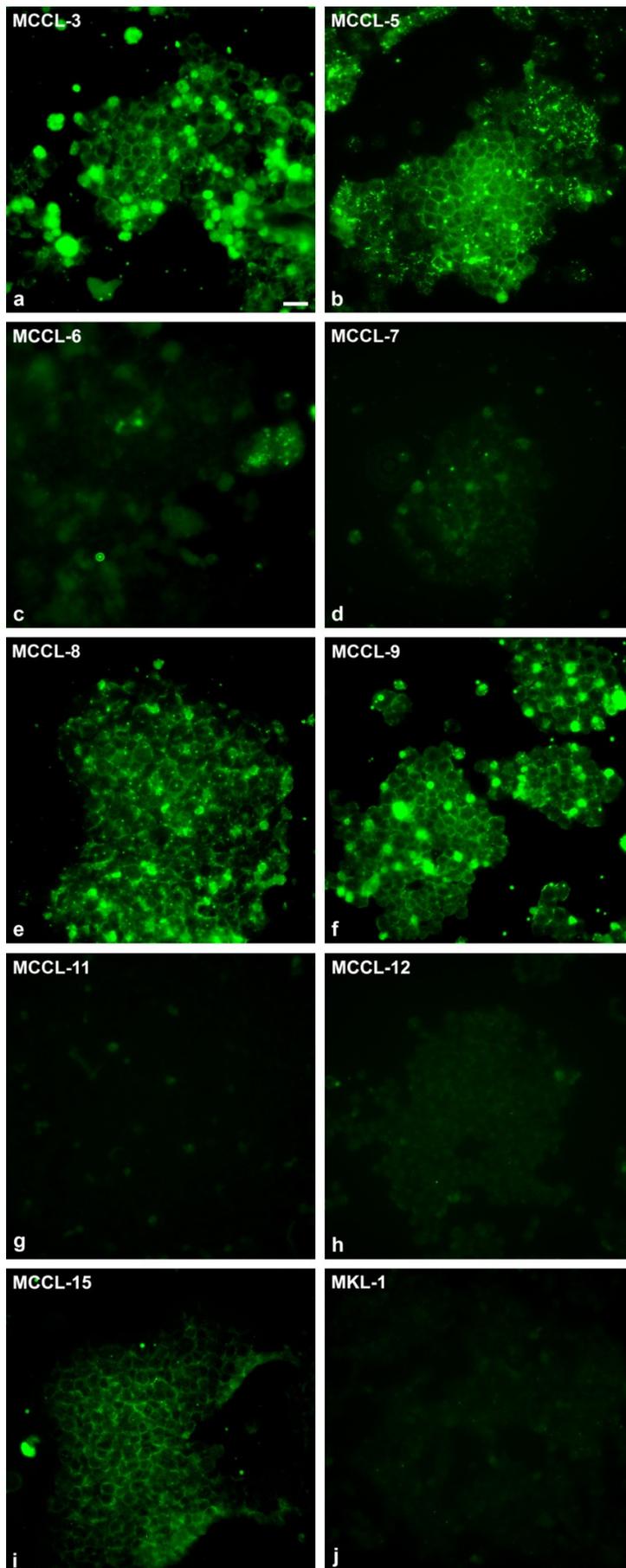


Abbildung 4.33: Immunhistochemische Färbung von Occludin in MCCL.

Cytospins von zehn verschiedenen MCCL wurden auf die Lokalisation von Occludin (grün) untersucht. Die Zelllinien MCCL-3, MCCL5, MCCL9 und MCCL-15 zeigen eine typische Occludin Färbung an den Zellgrenzen. Die Zelllinien MCCL-6, MCCL-7, MCCL-1, MCCL-12 und MKL-1 sind hingegen Occludin negativ. MCCL-8 zeigt ein eher untypisches Färbemuster für Occludin. Maßstab: 50 μ m.

4.2.3 JAM-A in MCCL

Ein weiteres TJ Transmembranprotein, auf welches die MCCL untersucht wurden, ist JAM-A. Die höchste JAM-A mRNA Expression findet man bei den Linien MCCL-3 und MKL-1, der δ CT-Wert der Linie MCCL-9 liegt aber auch nur unwesentlich höher, so dass es zwischen diesen drei Linien keine signifikanten Unterschiede gibt. Eine signifikant geringere JAM-A Expression im Vergleich zu den eben genannten Linien findet man aber bei MCCL-5 und MCCL-6, wobei die Expression bei MCCL-6 noch geringer ist als die von MCCL-5 (Abb. 4.34).

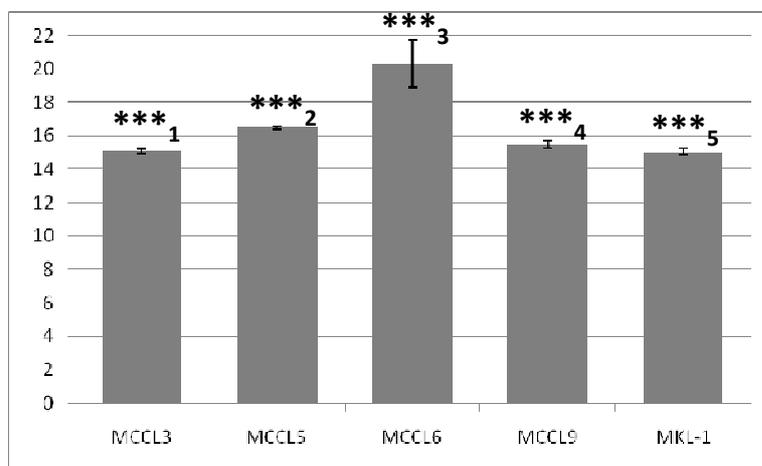


Abbildung 4.34: JAM-A mRNA Expression der MCCL

qRT-PCR für JAM-A bei den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -9 und MKL-1. Gezeigt sind die absoluten δ CT-Werte normalisiert auf das *Housekeeping*-Gen 18S. n = 3; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$; Mittelwerte \pm SEM; ***₁: signifikant zu MCCL-5, MCCL-6; ***₂: signifikant zu MCCL-3, MCCL-9, MKL-1; **₂: signifikant zu MCCL-6; ***₃: signifikant zu MCCL-3, MCCL-9, MKL-1; **₃: signifikant zu MCCL-5; ***₄: signifikant zu MCCL-5, MCCL-6; ***₅: signifikant zu MCCL-5, MCCL-6.

Die auf RNA Ebene gefundenen Unterschiede der JAM-A Expression sind auf Proteinebene nicht zu sehen. Der Westernblot zeigt bei allen zehn untersuchten MCCL eine gleichmäßige Proteinverteilung (Abb. 4.35), wobei die unterschiedlichen Proteinmengen im Westernblot nur schwer vergleichbar sind. Doppelbanden könnten auf Glykosylierungen von JAM-A zurück zu führen sein (Bazzoni 2003).



Abbildung 4.35: JAM-A Westernblotanalyse der MCCL

Beispielhafte Westernblotanalyse der JAM-A Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-7, MCCL-9, MCCL-11, MKL-1 (linker Blot, n = 3) sowie MCCL-8, MCCL-15 und MCCL-3 (rechter Blot, n = 2). Die Keratinozytenkultur K526 diente als Positivkontrolle für die JAM-A Färbung des Blots. Von jeder Zelllinie wurden 30 µg Protein für den WB benutzt. Die Größe des Proteins liegt bei 32 kDa.

Auch in der Immunfärbung der Zellen, die in Abbildung 4.36 a-j zu sehen ist, findet man bei allen Zelllinien eine starke JAM-A Färbung an den Zellgrenzen. Nur die Färbung der Linie MCCL-6 zeigt eine unspezifische Färbung für JAM-A. Diese Linie ist aber besonders empfindlich gegenüber der Färbeprozedur, so dass man generell nur selten ein schönes Färbemuster für MCCL-6 erhält.

Diese Ergebnisse zeigen, dass alle MCCL JAM-A positiv sind, wobei es Unterschiede in den mRNA-Expressionsmengen gibt. Die Typ I MCCL haben höhere JAM-A Level als die Typ IV Zelllinie MCCL-6.

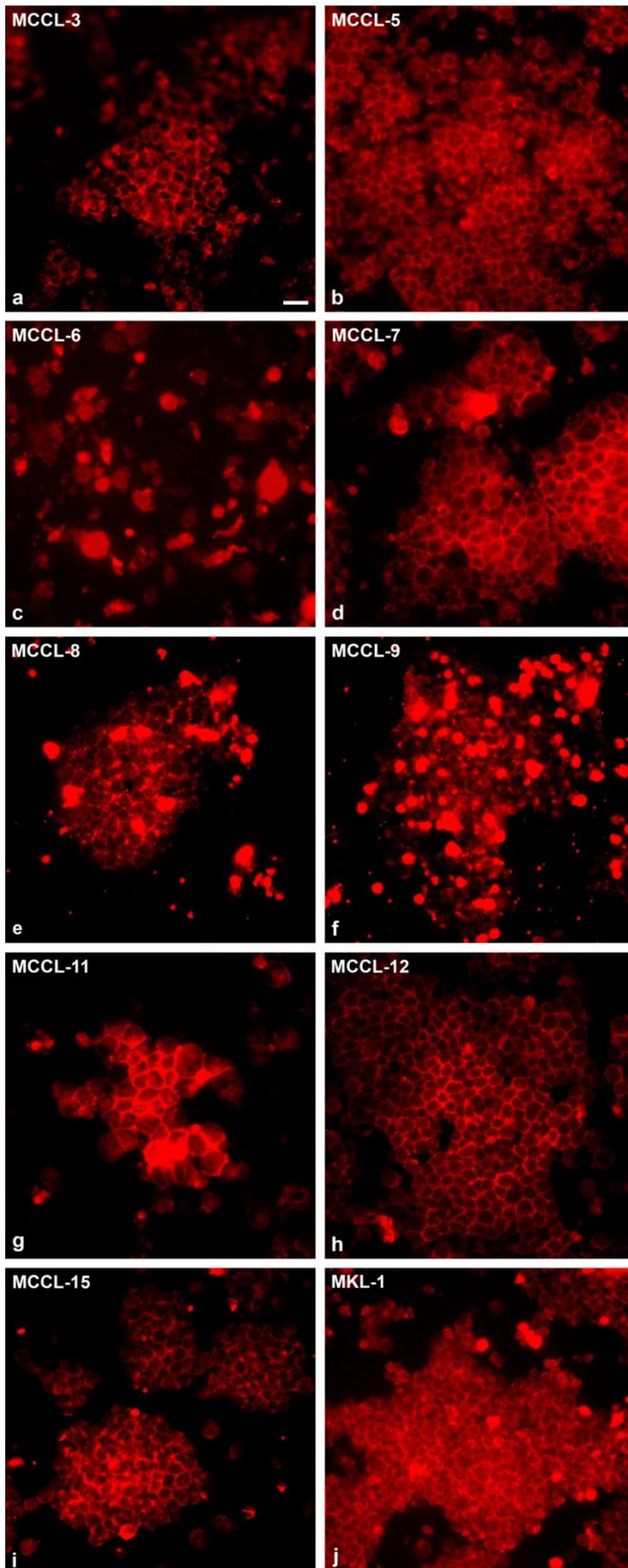
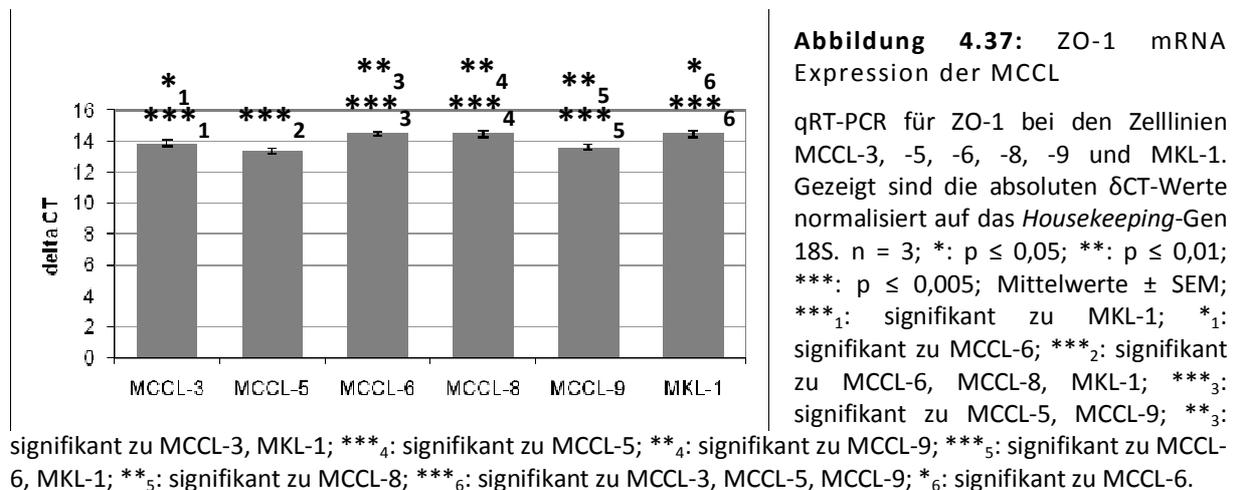


Abbildung 4.36: Immunhistochemische Färbung von JAM-A in MCCL.

Cytospins von zehn verschiedenen MCCL wurden auf die Lokalisation von JAM-A (rot) untersucht. Alle untersuchten Zelllinien zeigen eine typische JAM-A Färbung an den Zellgrenzen mit Ausnahme der Linie MCCL-6, bei der nur eine unspezifische Färbung der Zellen zu sehen ist. Maßstab: 50 μ m.

4.2.4 Zonula Occludens (ZO-) Proteine in MCCL

Die TJ assoziierten ZO-Proteine, zu denen ZO-1, -2 und -3 zählen, spielen eine wichtige Rolle innerhalb der TJs, da sie diese mit dem Aktinskelett der Zelle verbinden. Aber auch in der Tumorgenese ist insbesondere ZO-1 sehr gut untersucht und könnte die Proliferation und Invasivität von Zellen beeinflussen. Normalerweise geht man davon aus, dass ZO-1 als Tumorsuppressorprotein fungiert und über die Bindung des Transkriptionsfaktors ZONAB die Proliferation negativ beeinflusst. Interessanterweise ist ZO-1 in einigen Tumoren wie dem Melanom (Smalley et al. 2005), den Adenokarzinom des Magens (Resnick *et al.* 2005), dem Pankreaskarzinom (Kleeff et al. 2001) und dem Plattenepithelkarzinom (Morita *et al.* 2004) überexprimiert. Beim Melanom führt die experimentelle Herunterregulation von ZO-1 zu einem weniger adhäsiven und invasiven Phänotyp der Melanomzellen (Smalley et al. 2005) und beim invasiven Brustkrebs ist ZO-1 in Signalwege involviert, die die Zellmigration und -invasion fördern (Polette *et al.* 2005).



Die MCCL wurden auf die ZO-Proteine -1 und -2 untersucht. In der qRT-PCR wurde zunächst bei den Linien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-8, MCCL-9 und MKL-1 die ZO-1 RNA Expression bestimmt und verglichen. In Abbildung 4.37 sieht man, dass es nur geringe Unterschiede in den δ CT-Werten zwischen den Linien gibt. Die Werte liegen zwischen 12,4 und 15, wobei man die stärkste ZO-1 RNA Expression bei der Zelllinie MCCL-5 und die geringste bei MCCL-6 findet. Die ZO-1 Expression von MCCL-5 ist um das 1,2-fache höher als

die von MCCL-6. Dies zeigt, wie nahe die Expressionswerte der einzelnen Linien zusammen liegen. Signifikante Unterschiede gibt es zwischen MCCL-3, -5 und -9 nicht. Diese Linien exprimieren aber signifikant mehr ZO-1 RNA als die Linien MCCL-6, -8 und MKL-1. Bei der Korrelation der ZO-1 Ergebnisse mit der Morphologie der Zelllinien stellt sich heraus, dass Zelllinien des Typ I, mit Ausnahme von MKL-1, mehr ZO-1 exprimieren als die Typ II bzw. Typ IV Zelllinien MCCL-6 und MCCL-8.

Die Westernblotanalyse zeigt, dass auch die ZO-1 Proteinlevel in allen untersuchten Linien sehr ähnlich sind (Abb. 4.38). Das ZO-1 Protein wird von allen MCCL gebildet. Bei der Untersuchung der ZO-1 Lokalisation durch immunhistochemische Färbungen des Proteins (Abb. 4.39) zeigen, dass ZO-1 bei den Linien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-7, MCCL-9 und MCCL-15 klar an den Zellgrenzen lokalisiert ist (Abb. 4.38 a, b, d, f und i). Bei MCCL-6, MCCL-8 und MKL-1 ist die ZO-1 Färbung mehr perinukleär als an den Zellgrenzen zu finden, wobei sich insbesondere bei MKL-1 die Färbung nur auf einen punktförmigen Bereich innerhalb des Zytoplasmas der Zelle konzentriert (Abb. 4.39 j).

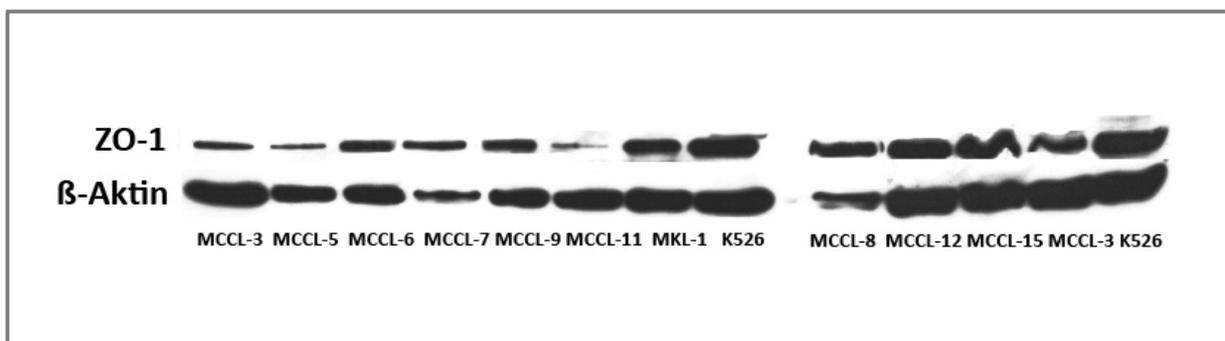


Abbildung 4.38: ZO-1 Westernblotanalyse der MCCL

Beispielhafte Westernblotanalyse der ZO-1 Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -7, -9, -11, MKL-1 (linker Blot) sowie MCCL-8, -12, -15 und -3 (rechter Blot). Die Keratinozytenkultur K526 diente als Positivkontrolle für die ZO-1 Färbung des Blots. Von jeder Zelllinie wurden 30 µg Protein für den Westernblot eingesetzt. Die Größe des Proteins liegt bei 220 kDa. n = 6 (MCCL-3, MCCL-5), n = 5 (MCCL-6, MCCL-9), n = 4 (MCCL-7, MCCL-11, MKL-1), n = 3 (MCCL-8, MCCL-12, MCCL-15).

Bei den Zelllinien MCCL-11 und -12 scheint die Lokalisation von ZO-1 nicht nur an den Zellgrenzen, sondern auch zytoplasmatisch zu sein (Abb. 4.39 g und h). Auffällig ist insbesondere bei MCCL-11, dass die ZO-1 Färbung nur selten die gesamte Zelle umschließt (Abb. 4.39 g).

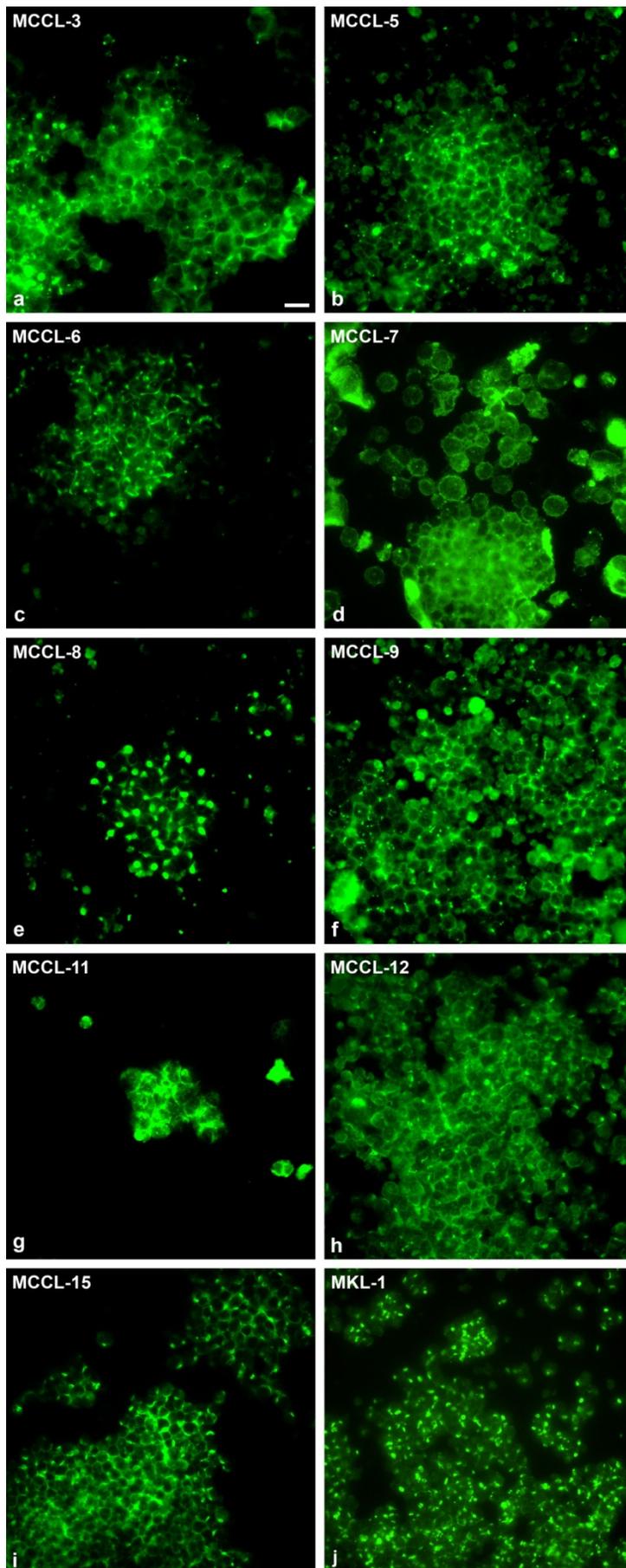


Abbildung 4.39: Immunhistochemische Färbung von ZO-1 in MCCL.

Cytopins von zehn verschiedenen MCCL wurden auf die Lokalisation von ZO-1 (grün) untersucht. Die Zelllinien MCCL-3 (a), -5 (b), -7 (d), -9 (f) und -15 (i) zeigen eine TJ-typische ZO-1 Färbung an den Zellgrenzen. Bei MCCL-6 (c), -8 (e) und MKL-1 (j) ist die Färbung mehr perinukleär. Bei MCCL-11 (g) und -12 (h) scheint ZO-1 sowohl an den Zellgrenzen als auch zytoplasmatisch lokalisiert zu sein. Der Größenbalken entspricht einer

Größe von 50 µm.

ZO-2 wurde in den MCCL nur auf Proteinebene untersucht. Im Westernblot sind alle Zelllinien, ebenso wie für ZO-1, ZO-2 positiv (Abb. 4.40).

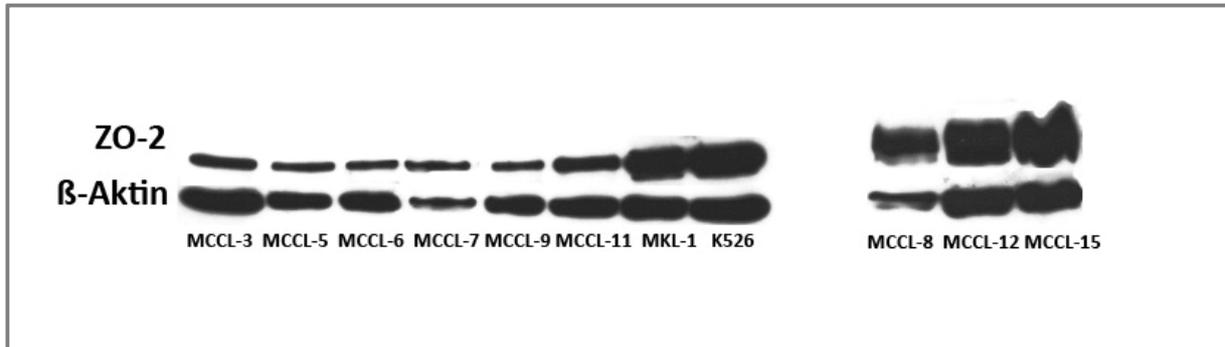


Abbildung 4.40: ZO-2 Westernblotanalyse der MCCL

Exemplarische Westernblotanalyse der ZO-2 Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -7, -9, -11, MKL-1 (linker Blot) sowie MCCL-8, -12 und -15 (rechter Blot). Die Keratinozytenkultur K526 diente als Positivkontrolle für die ZO-2 Färbung des Blots. Von jeder Zelllinie wurden 30 µg Protein für den Westernblot eingesetzt. Die Größe des Proteins liegt bei 160 kDa. n = 3 (MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9, MKL-1), n = 2 (MCCL-7, MCCL-8, MCCL-11, MCCL-12, MCCL-15).

Die immunhistochemische Färbung zeigt, dass das ZO-2 Protein bei den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-12, MCCL-15 und MKL-1 (Abb. 4.41 a-h) immer an den Zellgrenzen lokalisiert ist. In Abwesenheit von ZO-3 sind entweder ZO-1 oder ZO-2 für die Barrierebildung notwendig. Da ZO-1 nicht in allen MCCL an den Zellgrenzen lokalisiert ist, könnte hier ZO-2 diese Funktion bei den Zelllinien, die TJs bilden, erfüllen.

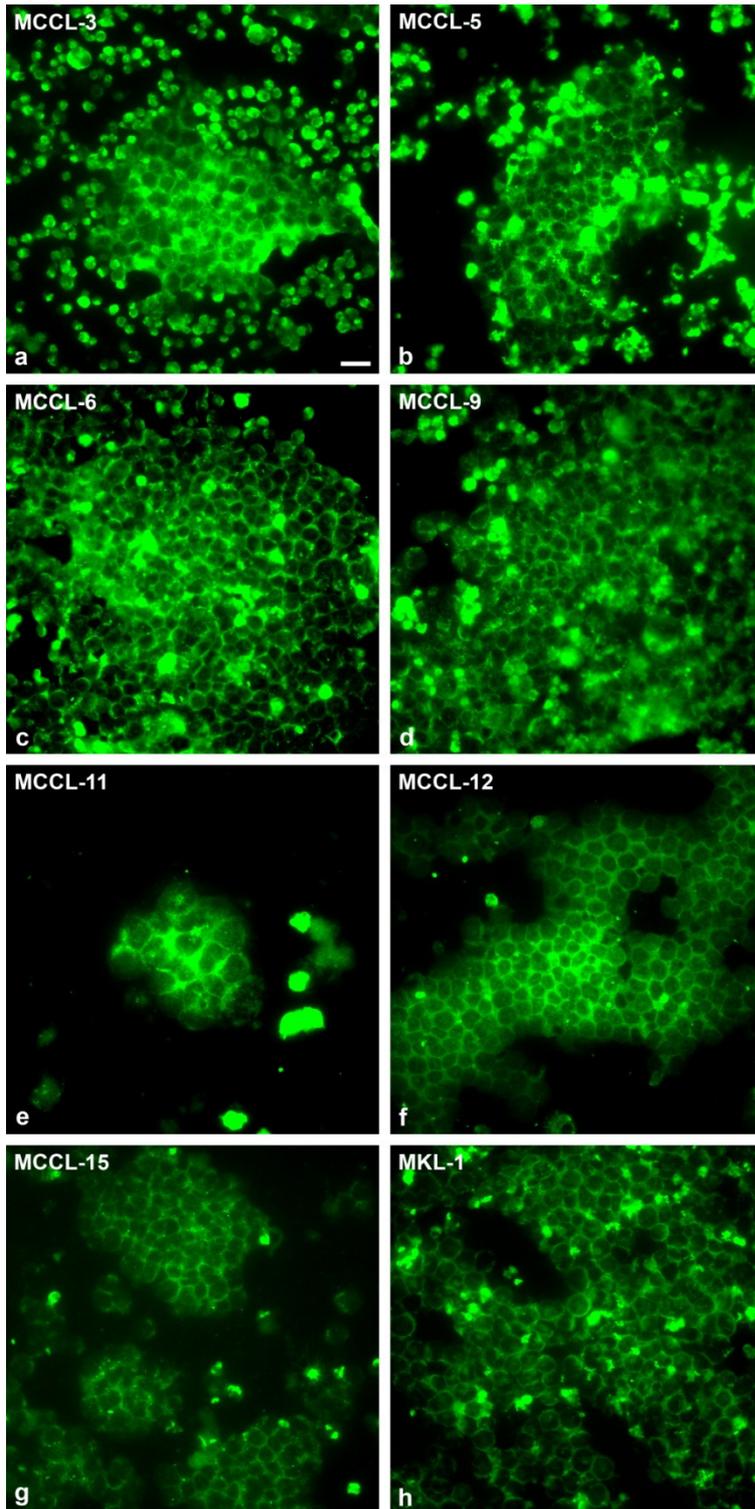


Abbildung 4.41 Immunhistochemische Färbung von ZO-2 in MCCL.

Cytopins von acht verschiedenen MCCL wurden auf die Lokalisation von ZO-2 (grün) untersucht. Alle MCCL zeigen eine TJ-typische Färbung an den Zellgrenzen. Maßstab: 50 μ m.

4.2.5 Korreliert die Expression von TJ-Proteinen mit dem Wachstumsverhalten der Zelllinien?

In den Untersuchungen der MCCL auf die TJ-Proteine Cldn-1 bis -5, Occludin, JAM-A sowie ZO-1 und -2 hat sich gezeigt, dass alle untersuchten MCCL ZO-1, -2 und JAM-A exprimieren. Die Expression der Claudine und Occludin hingegen variiert zwischen den einzelnen MCCL. Es scheint, dass die Sphäroid bildenden Typ I MCCL besonders viele TJ-Proteine bilden und auch höhere ZO-1 und JAM-A Level als die anderen MCCL aufweisen. Die einzige Ausnahme ist MKL-1. Sie ist neben ZO-1, ZO-2 und JAM-A nur positiv für Cldn-5 und Occludin. Im Gegensatz zu den Typ I MCCL exprimiert beispielsweise die Typ IV Zelllinie MCCL-6 weder eines der untersuchten Claudine noch Occludin. Die Typ II MCCL-7 exprimiert Cldn-1, -3 und -4, die Typ III MCCL-11 nur die TJ-Proteine Cldn-3 und -4.

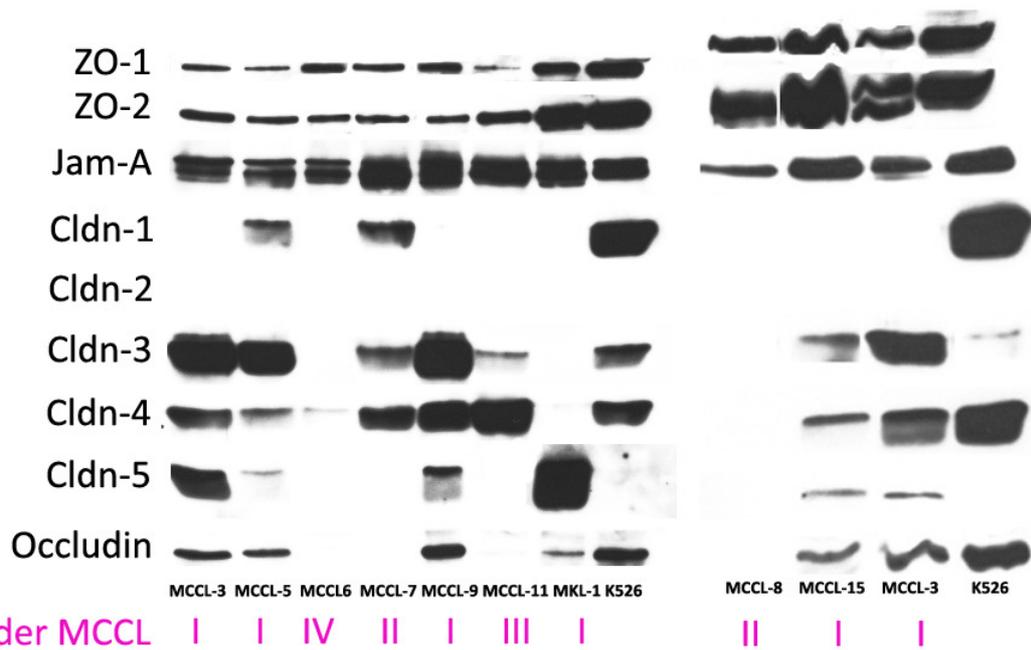


Abbildung 4.42: Übersicht über das TJ-Proteinmuster aller MCCL und Korrelation zu ihrem morphologischen Subtyp

Zusammenstellung aller Westernblotanalysen der TJ-Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -7, -9, -11, MKL-1 sowie MCCL-8, -12, -15 und -3. Die Keratinozytenkultur K526 diente als Kontrolle. Des Weiteren ist der morphologische Subtyp der Zelllinien angegeben, der zeigt, dass es eine Korrelation zwischen dem Subtyp und der Expression von TJ-Proteinen in den MCCL geben könnte.

Besonders interessant ist die Proteinexpression von Cldn-5 und Occludin, die ausschließlich auf die Typ I MCCL (MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9, MCCL-15 und MKL-1) beschränkt ist (Abb. 4.42). Um die Hypothese, dass die Bildung von Sphäroiden vom Typ I mit der Anwesenheit bestimmter TJ-Proteine korreliert zu überprüfen, wurden die Zelllinien, die nach langer Kultivierung ohne *Feederlayer* ihre Morphologie verändert haben (s. Kapitel 4.1.2), ebenfalls auf Cldn-5 und Occludin in der Westernblotanalyse untersucht. Die Zellen dieser Zelllinien wachsen teilweise adhärent am Boden des Kulturgefäßes, teilweise wachsen sie aber auch in Suspension und bilden lockere Sphäroide. Die Proteine der Suspensionszellen und der adhären Zellen wurden getrennt isoliert, ihre Cldn-5 und Occludin Proteinlevel bestimmt und mit den alten Proteinproben der MCCL, die isoliert worden waren bevor die Zelllinien ihre Morphologie verändert hatten, und somit noch Typ I MCCL widerspiegeln, verglichen. Bei den Zelllinien MCCL-5 und MCCL-9 waren die Occludin Proteinmengen in den Boden- und Suspensionsproben tatsächlich geringer als in den Proben der „alten“ Typ I Zelllinien. Bei beiden Zelllinien sind die Proteinlevel in den adhären Zellen aber höher als in den Suspensionszellen (s. Abb. 4.43 B und C). Bei MCCL-9 trifft das auch für die Cldn-5 Proteinlevel zu, bei MCCL-5 sind die Cldn-5 Proteinlevel aber zu gering um Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen festzustellen. Allerdings ist bei MCCL-3 die Cldn-5 und Occludin Proteinexpression in den neuen Proben nicht geringer als in den alten Proteinextrakten von Typ I MCCL-3. Bei dieser Zelllinie sind die Cldn-5 und Occludin-Expressionen in den Suspensionszellen am höchsten und in der Probe der adhären Zellen in etwa mit der alten, Sphäroid-haltigen Probe vergleichbar.

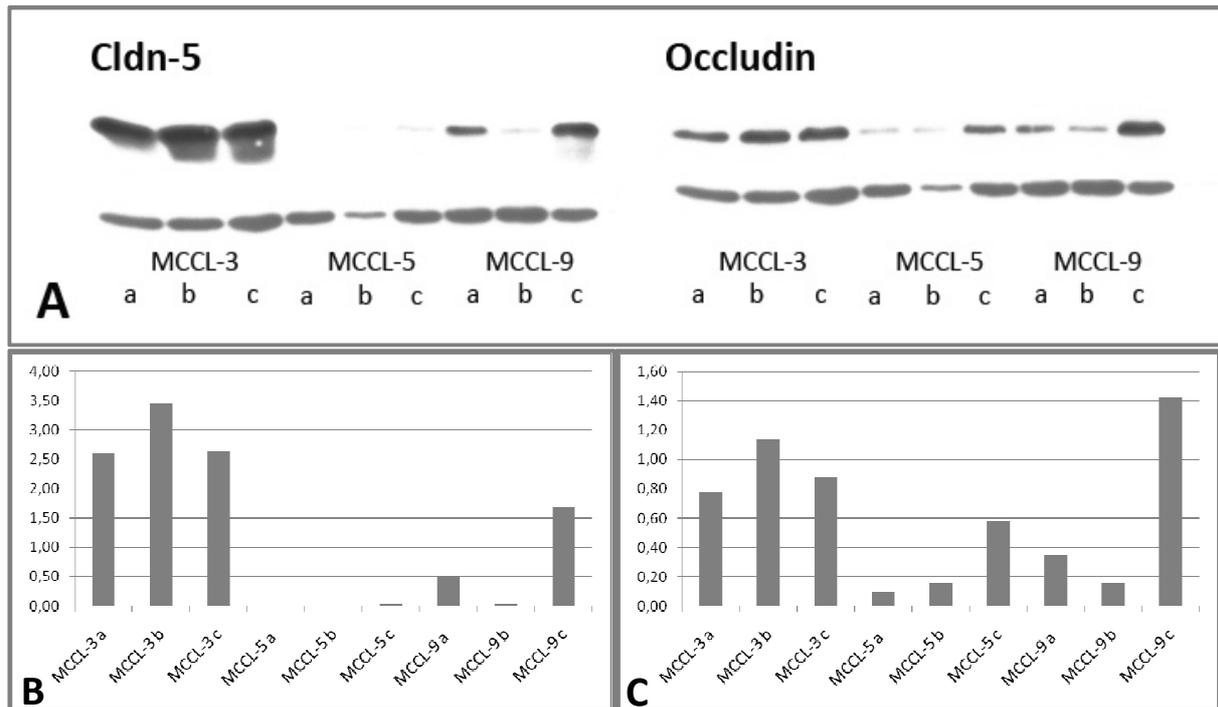


Abbildung 4.43: Cldn-5 und Occludin Westernblotanalyse der Zelllinien mit veränderter Morphologie

Die Proteinfractionen vom Boden der Zellkulturschalen (a), den Suspensionszellen (b) und im Vergleich Proben von Zellen mit klassischer Typ I Morphologie (c) der Zelllinien MCCL-3, MCCL-5 und MCCL-9 wurden auf die TJ-Proteine Cldn-5 und Occludin untersucht (A). Des Weiteren sind die Intensitätsauswertungen der Westernblotbanden normiert auf die β -Aktinbanden der jeweiligen Proben für Cldn-5 (B) und Occludin (C) gezeigt.

Die Morphologie der MCCL bzw. die Anwesenheit von Sphäroiden scheinen somit nicht mit der Expression der TJ-Proteine Cldn-5 und Occludin zu korrelieren. Deshalb muss die Rolle der TJ-Proteine bei der Sphäroidbildung von MCCL noch weiter aufgeklärt werden.

4.2.6 Par-Polaritätskomplexproteine Par3 und aPKC in MCCL

Da beim Aufbau von TJs der Par-Polaritätskomplex eine wichtige Rolle spielt, wurden die MCCL auf die zu diesem Komplex gehörenden Proteine, Par3 und aPKC untersucht. aPKC ζ wird in allen MCCL exprimiert (Abb. 4.44) und auch die Isoform *iota/lamda* der aPKC wird von allen MCCL exprimiert (Daten nicht gezeigt). Par3 kommt in drei unterschiedlichen *splice*-Varianten vor, die die Größe 180, 150 und 100 kDa haben. Die Banden der beiden größeren Isoformen sind im Westernblot deutlich bei den Zelllinien MCCL-3, MCCL-6, MCCL-

9, MKL-1 und MCCL-5 zu sehen. Bei MCCL-15 ist die 150 kDa Bande etwas schwächer, bei MCCL-11 sind beide Banden deutlich schwächer als bei den anderen Zelllinien. Die 100 kDa Bande fehlt bei allen untersuchten MCCL, nur in der Keratinozytenkontrolle ist sie eindeutig zu sehen (Abb. 4.44). Da die 100 kDa Isoform aber keine aPKC-Bindestelle besitzt, ist es möglich, dass diese beim Aufbau der TJs keine Rolle spielt. Die Zelllinien MCCL-3, MCCL-6, MCCL-9, MCCL-15, MKL-1 und evt. auch MCCL-11 sind somit positiv für die aPKC und Par3. Dies könnte ein Hinweis auf den Aufbau von funktionellen TJs in MCCL sein. Auch hier findet man keine Korrelation zum Wachstumsverhalten (Subtyp) der MCCL.

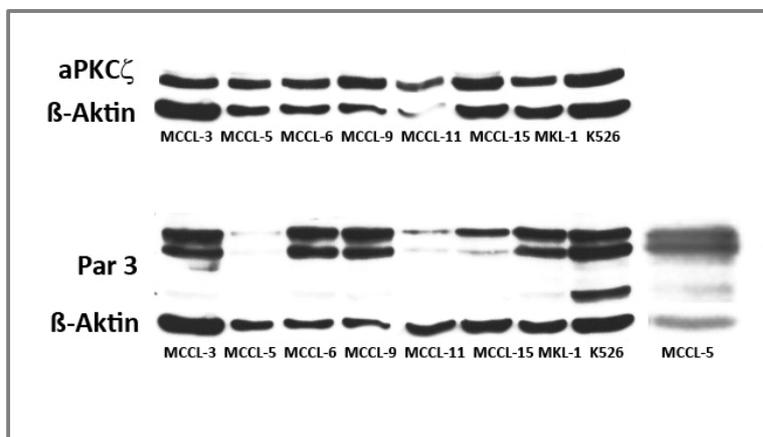


Abbildung 4.44: Westernblot-analyse der Polaritätskomplexproteine aPKC ζ und Par 3.

Analyse der aPKC ζ - und Par3-Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9, MCCL-11, MCCL-15 und MKL-1. Die Keratinozytenkultur K526 diente als Positivkontrolle für beide Westernblots. Die zusätzlichen Par3-Banden für MCCL-5 ganz rechts wurde in einem anderen Blot untersucht und ist deshalb getrennt von den anderen

Banden dargestellt. Sie zeigt, dass MCCL-5 auch alle Par-3 Isoformen exprimiert, obwohl sie im gezeigten Blot nur schwach zu sehen sind. Als Kontrolle wurden in diesem Blot die Zelllinien MCCL-3, MCCL-9 und MCCL-15 verwendet, die das gleiche Ergebnis wie in dem gezeigten Blot lieferten. Von jeder Zelllinie wurden 30 μ g Protein für den Westernblot eingesetzt.

4.3 Adhärenzverbindungsproteine in MCCL

Neben den TJs sind auch Proteine der Adhärenzverbindungen (AJs) für die Bildung von epithelialen Barrieren verantwortlich (u.a. Macara 2004, Matter & Balda 2003, Mertens et al. 2006). Dabei spielen besonders die Cadherine E- und P-Cadherin, eine entscheidende Rolle bei der TJ-Bildung (Tinkle *et al.* 2008). Um zu testen, welche MCCL die Voraussetzungen für die Bildung von TJs erfüllen, wurden diese Cadherine auf Proteinebene in den Zelllinien untersucht. Darüber hinaus wurde auch die Anwesenheit von N-Cadherin getestet.

Alle MCCL sind N-Cadherin positiv, aber keine der Linien exprimiert E-Cadherin. Für P-Cadherin sind die Zelllinien MCCL-6, MCCL-8, MCCL-11, MCCL-12, MCCL-15 und MKL-1 positiv. Die Westernblots sind in Abbildung 4.45 zusehen. Diese Ergebnisse bestätigen die an Tumorgewebe des MCC beobachteten Ergebnisse, allerdings ist E-Cadherin in MCC-Tumoren nicht komplett abwesend (Werling et al. 2011). Da in MCC Tumoren kein VE-Cadherin exprimiert wird, wurde dieses Cadherin auch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

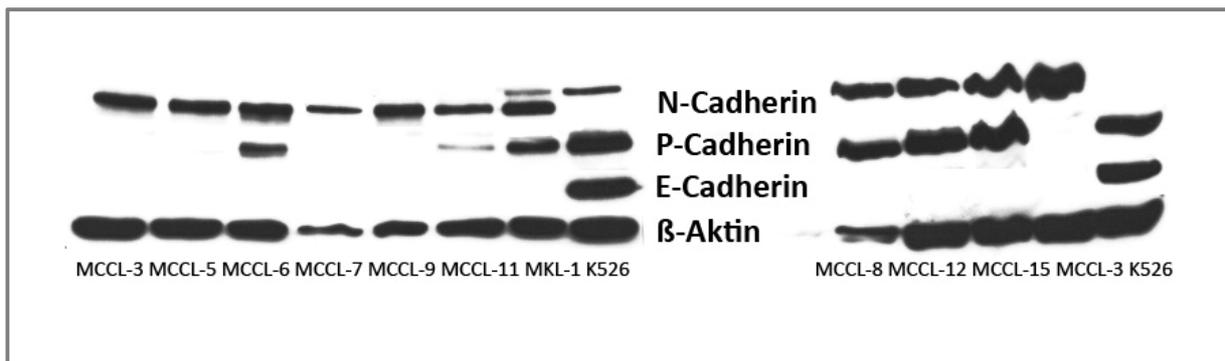


Abbildung 4.45: Westernblotanalyse von N-, P- und E-Cadherin in MCCL

Analyse der N-, P- und E-Cadherin Proteinlevel in den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -7, -9, -11, MKL-1 (linker Blot) sowie MCCL-8, -12, -15, -3 (rechter Blot). Die Keratinozytenkultur K526 diente als Positivkontrolle für die E- und P-Cadherin Färbung sowie als Negativkontrolle für die N-Cadherinfärbung des Blots. Von jeder Zelllinie wurden 30 µg Protein für den Westernblot eingesetzt.

N-Cadherin wurde zusätzlich zu den Westernblots auch immunhistochemisch auf die Lokalisation dieses Proteins in den MCCL untersucht. Auch bei dieser Methode sind alle MCCL N-Cadherin positiv und N-Cadherin ist immer an den Zell-Zellgrenzen lokalisiert (Abb. 4.46).

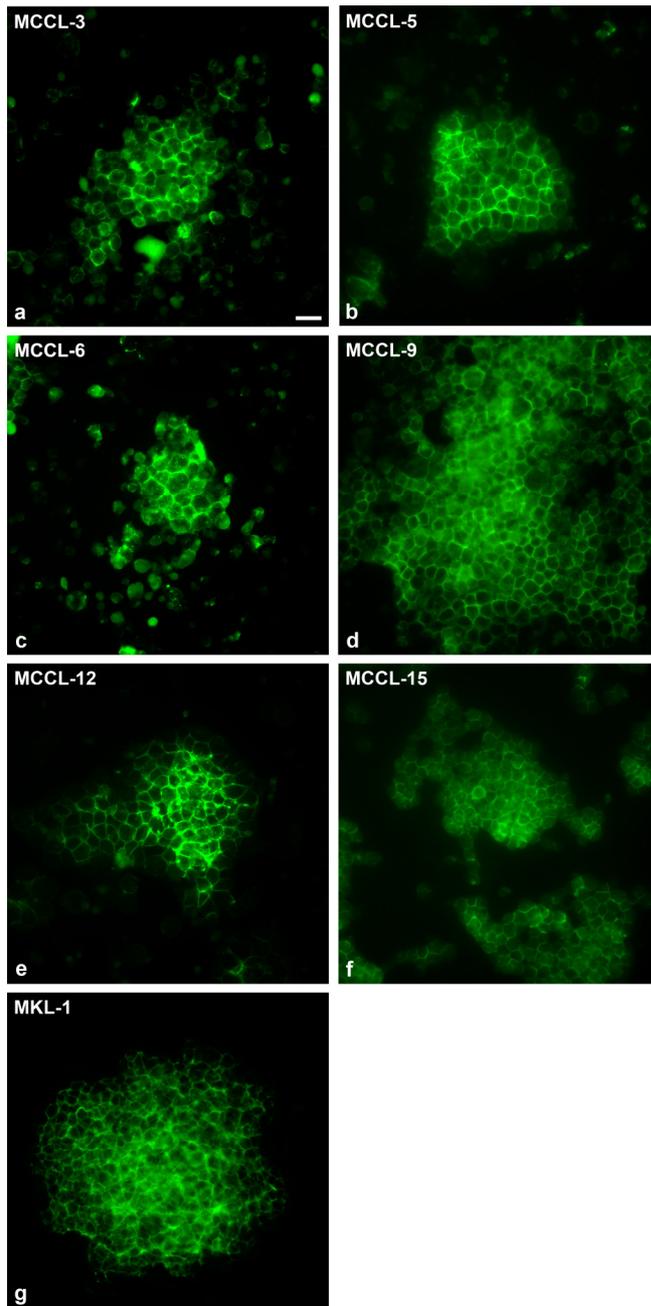


Abbildung 4.46: Lokalisation von N-Cadherin in MCCL

Epifluoreszenzlokalisationen von N-Cadherin in den Zelllinien MCCL-3 (a), MCCL-5 (b), MCCL-6 (c), MCCL-9 (d), MCCL-12 (e), MCCL-15 (f) und MKL-1 (g). Maßstab: 50µm.

Das Cadherin assoziierte AJ-Protein β -catenin ist unerlässlich für die adhäsive Funktion der Cadherine. Um zu prüfen, ob die MCCL nur Cadherine, oder auch andere AJ-Proteine exprimieren, wurde die Expression und Lokalisation von β -catenin in acht MCCL untersucht. In allen MCCL konnte β -catenin, genauso wie N-Cadherin, an den Zell-Zellgrenzen nachgewiesen werden (Abb. 4.47).

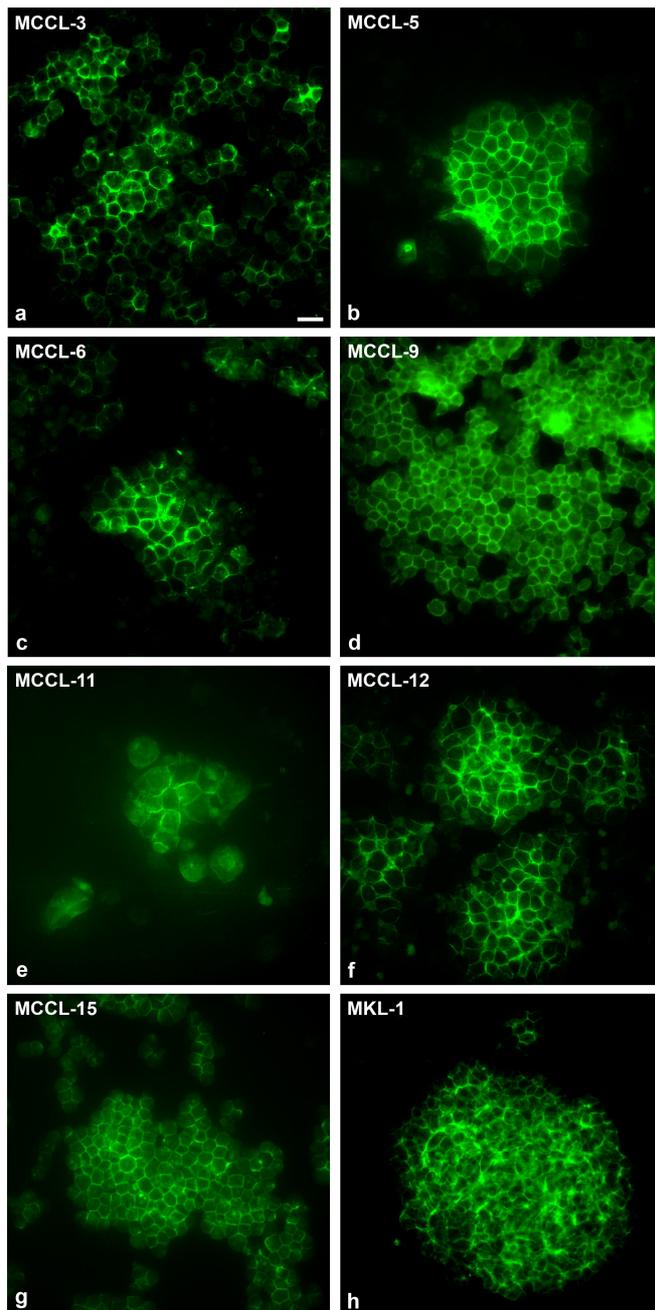


Abbildung 4.47: Lokalisation von β -catenin in MCCL

Epifluoreszenzlokalisationen von β -catenin in den Zelllinien MCCL-3 (a), MCCL-5 (b), MCCL-6 (c), MCCL-9 (d), MCCL-11 (e), MCCL-12 (f), MCCL-15 (g) und MKL-1 (h). Maßstab: 50 μ m.

Die Untersuchungen der MCCL auf AJ-Proteine zeigen, dass diese Verbindungen auch in MCCL vorhanden sein könnten. Im Gegensatz zu klassischen epithelialen Geweben und auch den heterotypischen Zellverbindungen zwischen Merkelzellen und Keratinozyten exprimieren alle MCCL N-Cadherin. Dies deutet auf einen *Cadherin-switch* hin, der auch schon im Tumorgewebe dieses Karzinoms beobachtet werden konnte (Werling et al. 2011). Da einige Zelllinien E- und P-Cadherin negativ sind und diese Proteine am Aufbau von TJs beteiligt sind, ist es fraglich, ob diese MCCL funktionelle TJs ausbilden können. Dies soll in den nächsten Kapiteln dieser Arbeit untersucht werden.

4.4 TJs in MCCL Sphäroiden

Die Untersuchung von TJ-Proteinen in MCCL auf RNA- und Proteinebene zeigt, dass ähnlich wie im Tumorgewebe des MCC viele TJ-Proteine in den Zelllinien zu finden sind. Zusätzlich werden in diesen Zelllinien die Proteine des Par-Polaritätskomplexes gebildet, was ein Hinweis auf die Bildung von funktionellen TJs in diesen Zellen sein könnte. Ob in den Sphäroiden dieser MCCL tatsächlich funktionelle TJs gebildet werden, oder ob diese Proteine andere Funktionen innerhalb der Zellen ausüben, wurde nun weiter untersucht.

4.4.1 Die Typ I MCCL zeigen im elektronenmikroskopischen Gefrierbruch typische TJ Stränge

Mit der Gefrierbruch Elektronenmikroskopie kann man TJ-Stränge darstellen. In der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Fromm des Instituts für klinische Physiologie der Charité Berlin wurden von Dr. Susanne Krug die Sphäroide von MCCL-9 und MKL-1 mit dieser Methode untersucht. Die Sphäroide beider Zelllinien zeigen typische TJ-Stränge, wobei die TJ-Stränge von MCCL-9 dichter sind als die von MKL-1 (Abb. 4.48). Auch die Kontinuität der Stränge unterscheidet sich zwischen den beiden Linien. MCCL-9 hat ausschließlich kontinuierlich verlaufende Stränge, wohingegen die Stränge von MKL-1 acht Mal häufiger kleine Unterbrechungen der Stränge zeigen (persönliche Kommunikation Dr. Krug).

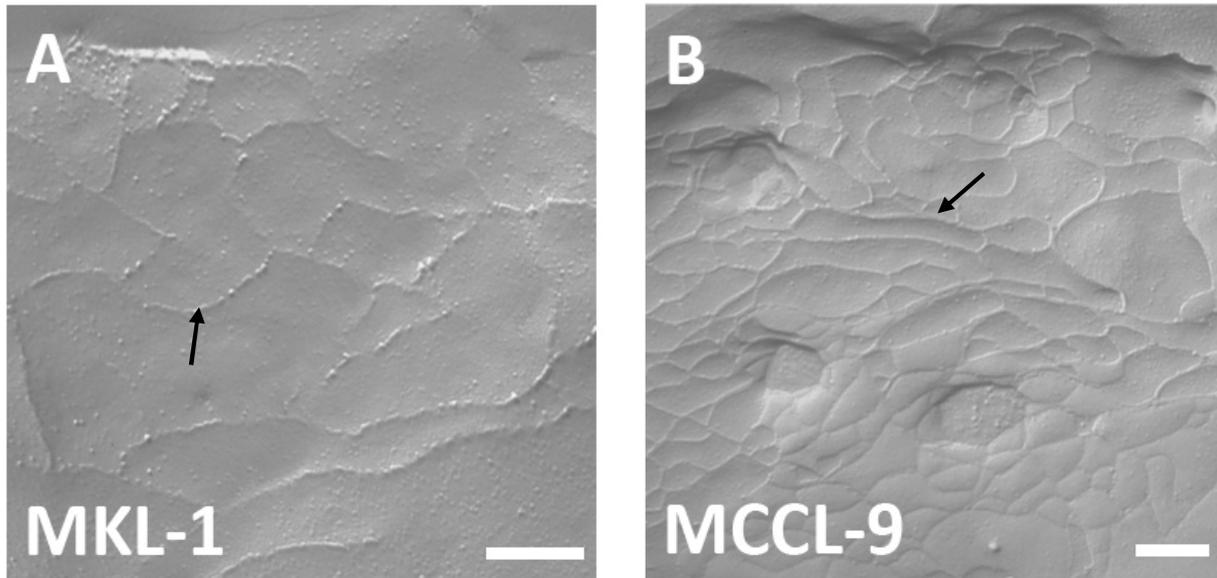


Abbildung 4.48: Gefrierbruch Elektronenmikroskopie der Sphäroide von MKL-1 und MCCL-9

In der Gefrierbruch Elektronenmikroskopie zeigen die Sphäroide der Zelllinien MKL-1 (A) und MCCL-9 (B) typische TJ-Stränge (schwarzer Pfeil). Maßstab: 200 nm. Zur Verfügung gestellt von Dr. Susanne Krug, Charité Berlin.

4.4.2 TJ-Barrierefunktion in MCCL-Sphäroiden

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der MCCL-Sphäroide zeigen die Bildung von TJs in diesen Sphäroiden. Ob diese TJs auch eine funktionelle Barriere ausbilden können, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht. Die TJ-Barrierefunktion für niedermolekulare Moleküle kann mittels eines 557 Da *Tracers* (Biotinylierungsreagenz, BR) ermittelt werden. Dabei diffundiert das BR soweit auf parazellulärem Weg in ein Gewebe, bis es an TJs gestoppt wird. Sphäroide der Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9 und MKL-1 wurden für 1 Std. in BR inkubiert und anschließend kryokonserviert. Das Biotin wurde in 6 µm dicken Schnitten der Sphäroide mit einem Streptavidin-*Texas Red* Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Als Kontrolle für eine nicht eingeschränkte Diffusion des BR in ein Sphäroid wurden Sphäroide der Melanomzelllinie WM1205 Lu, die von Claudia Bohner charakterisiert wurde und nur die TJ-Proteine ZO-1 und ganz schwach JAM-A bildet, hergestellt und genauso wie die MCCL Sphäroide biotinyliert.

Die Ergebnisse des Versuchs zeigen, dass das BR nicht in MCCL-Sphäroide eindringen kann, sondern schon am Rand der Sphäroide durch TJs gestoppt wird (Abb. 4.49 A-E). Die TJs sind exemplarisch für die Linie MCCL-9 durch die Anfärbung von Occludin (grün) in Abbildung

4.49 E dargestellt. Man sieht deutlich, dass das BR nicht durch die TJs in das Sphäroid gelangen kann. Nur in tote Zellen, die überwiegend am Rand der Sphäroide liegen (weiße Pfeile) kann das BR eindringen, es kann aber nicht auf parazellulärem Weg in das Gewebe diffundieren. Im Gegensatz zu den MCCL Sphäroiden, die eine Barriere für den 557 Da *Tracer* bilden, kann das BR aber ungehindert in das Melanomsphäroid eindringen (Abb. 4.49 F). Man sieht deutlich, dass die Färbung ausschließlich an den Zellgrenzen verläuft (weiße Pfeilspitzen) und der *Tracer* nicht transzellulär in das Sphäroid diffundiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Sphäroide der Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MKL-1 und MCCL-9 eine funktionelle Barriere für den 557 Da *Tracer* bilden. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass die Bildung von funktionellen TJs in MCCL nicht von der Anwesenheit von E- oder P-Cadherin abhängig ist (s. Kapitel 4.3) und dass somit eventuell N-Cadherin ihre Funktionen für den TJ-Aufbau übernehmen kann.

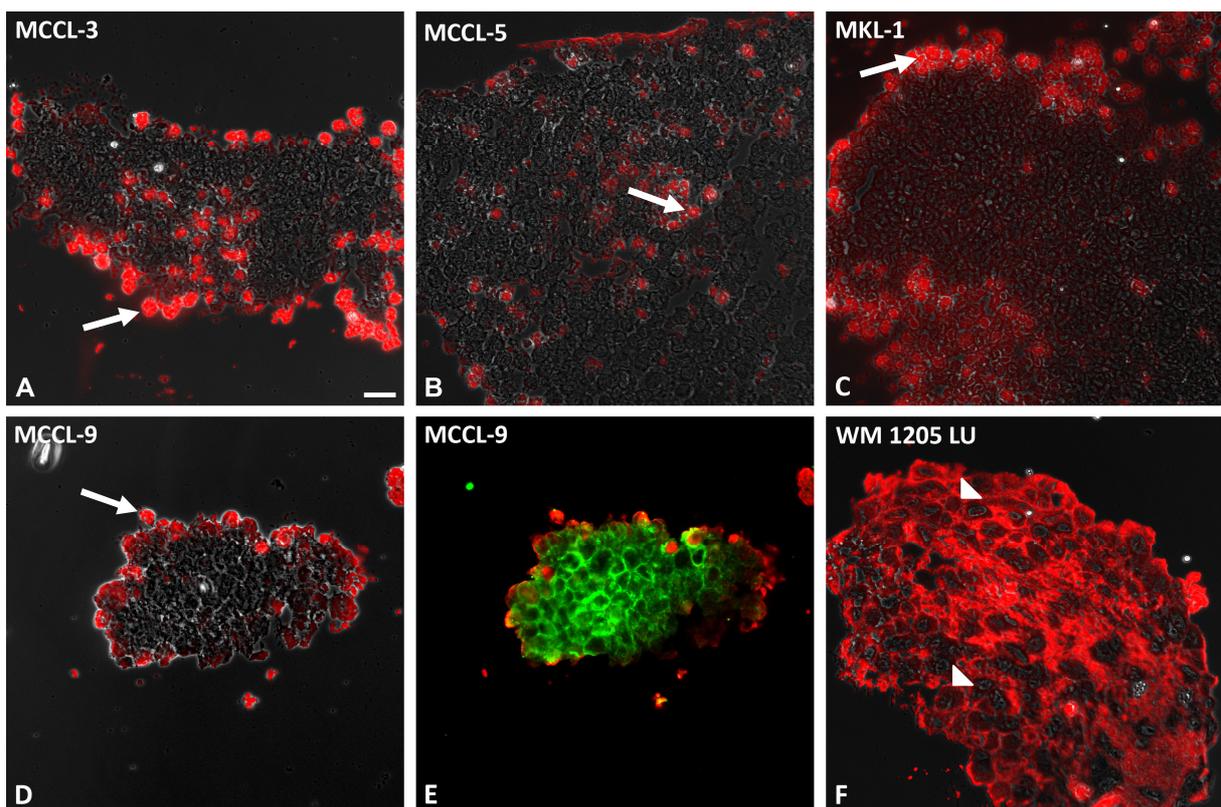


Abbildung 4.49: Barriere Biotin Assay bei MCCL Sphäroiden

MCCL (A-E) und Melanom (F) Sphäroide wurden 1 Std. mit Biotin inkubiert. Auf Schnitten der Sphäroide wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung die Diffusion des *Tracers* markiert. Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen (A - D und F) bzw. Überlagerung von Epifluoreszenzaufnahmen (E). rot: Biotin; grün: Occludin; Pfeile zeigen das Eindringen von Biotin in tote Zellen der Sphäroide; Pfeilspitzen zeigen die parazelluläre Diffusion des 557 Da *Tracers* bei der Kontrolle; Maßstab: 20 µm.

4.4.3 Calcium ist essentiell für die Barrierefunktion in MCCL

Da TJs Calcium-abhängig sind, stellte sich nun die Frage, ob die beobachtete Barrierefunktion in den Sphäroiden der MCCL bestehen bleibt, wenn den Zellen das Calcium entzogen wird. Dazu wurden die MCCL Sphäroide vor der Biotinylierung für 2 Std. in 0,5% Ethylendiamintetraacetat (EDTA) inkubiert und anschließend für 1 Std. wie schon zuvor beschreiben mit Biotin behandelt. EDTA ist ein Komplexbildner, der besonders stabile Chelatkomplexe mit Kationen bildet. Calcium wird so in den Komplexen gebunden und steht den Zellen in der Kultur nicht mehr zur Verfügung.

In vielen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung mit EDTA zu einer Verminderung des transepithelialen Widerstands (TER) und zur Dislokation von TJ-Proteinen führt (u.a. Liang *et al.* 2000, Nakamura *et al.* 2007). Als Kontrolle ob nicht schon allein die Abwesenheit des Kulturmediums zu einer verminderten Barrierefunktion führt, wurden Sphäroide für 2 Std. nur in PBS kultiviert. Die Abbildung 4.50 zeigt, dass durch die Behandlung der Sphäroide mit EDTA die Barrierefunktion aufgehoben wird und das Biotin parazellulär in das Sphäroid eindringt (Abb. 4.50 A, B, C). Werden die Sphäroide aber nach der EDTA-Behandlung für weitere 2 Std. wieder in ihrem Calcium haltigen Kulturmedium (MCC-Medium) kultiviert und anschließend biotinyliert, ist die Barriere für den 557 Da *Tracer* Biotin wieder intakt (Abb. 4.50 A', B', C').

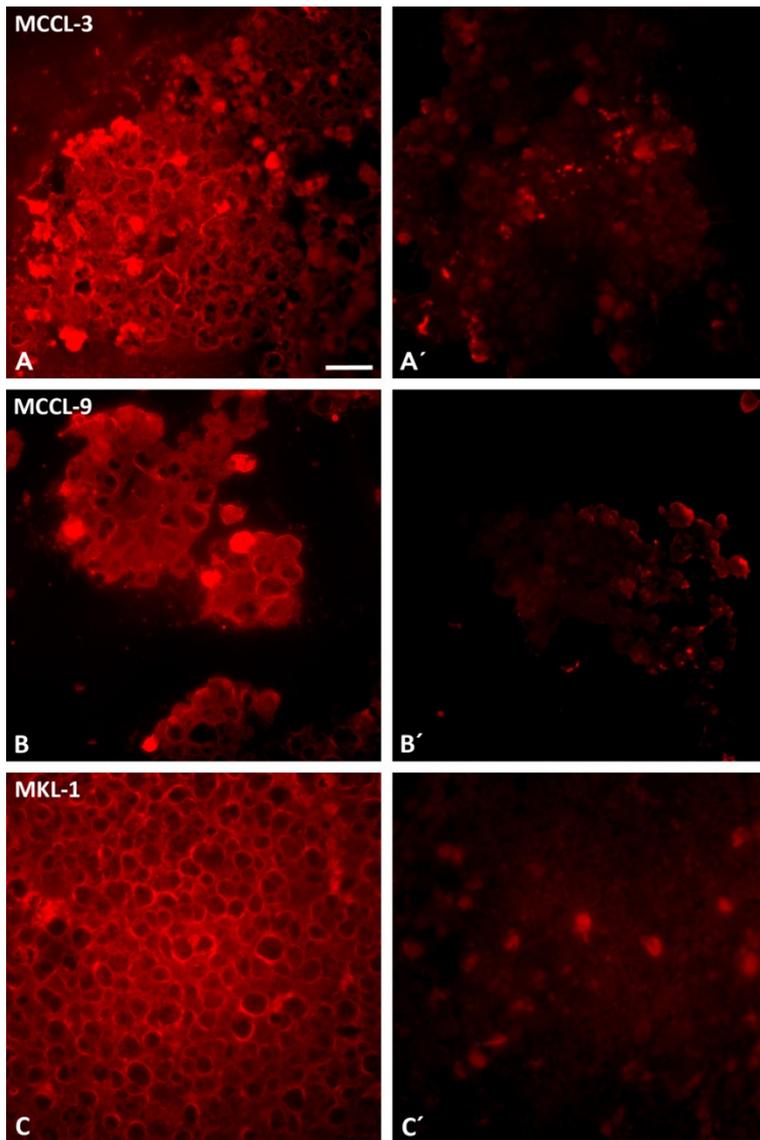


Abbildung 4.50: Einfluss von Calcium auf die Barrierefunktion in MCCL Sphäroiden

Sphäroide der Zelllinien MCCL-3 (A, A'), MCCL-9 (B, B') und MKL-1 (C, C') wurden für 2 Std. mit EDTA behandelt und anschließend 1 Std. biotinyliert (A, B, C). Durch die EDTA-Behandlung ist die Barriere aufgehoben und das Biotin kann parazellulär in das Sphäroid diffundieren. Werden die Sphäroide nach der EDTA-Behandlung wieder mit Calcium-haltigem MCC-Medium inkubiert und danach biotinyliert (A', B', C'), ist die Barriere für das Biotin wieder hergestellt. Maßstab: 20 µm.

4.4.4 Cldn-4 ist nicht an der Barrierebildung für niedermolekulare Moleküle beteiligt

Als nächstes stellte sich die Frage, welche TJ-Proteine an der Barrierefunktion in den MCCL Sphäroiden beteiligt sind. Dazu wurde die über das TJ-Protein Cldn-4 vermittelte Barriere spezifisch ausgeschaltet, denn das Cldn-4 Protein wird von fast allen MCCL gebildet und eignet sich somit gut als Ziel für diese Untersuchung. Das bakterielle Toxin *Clostridium Perfringens* Enterotoxin (CPE) ist ein kleines Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, welches bei Menschen Nahrungsmittelvergiftungen hervorruft (McClane et al. 1988).

Der N-terminale Teil des Polypeptids (nCPE) ist die zytotoxische Region, während das C-terminale Fragment des Polypeptids (cCPE) das Rezeptorbindende Fragment ist (Katahira et al. 1997). cCPE kann an die Claudine 3, 4, 6, 7, 8 und 14 binden, wobei die Cldn-4 Bindung am stärksten ist (Fujita *et al.* 2000). Für Cldn-4 konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung von cCPE zu einer Dislokation dieses Proteins von den TJ-Strängen und zu einer gestörten Barrierefunktion in Cldn-4 abhängigen TJs führt (Sonoda *et al.* 1999). Für Cldn-3 und die anderen Claudine konnte eine Beeinflussung der Barrierefunktion noch nicht gezeigt werden.

Für diesen Versuch wurde das C-terminale Fragment des CPEs (Aminosäuren 194-319) mit einem Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag) verwendet, welches uns von Dr. Jörg Piontek (Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie) zur Verfügung gestellt wurde. Als Kontrolle diente ein GST-Kontrollpeptid (GST). Die Sphäroide der MCCL wurden für 20 Std. in 20 µg/ml cCPE bzw. GST, verdünnt in MCC-Medium, inkubiert und anschließend biotinyliert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Öffnung der TJs wurden parallel Sphäroide derselben MCCL für 2 Std. mit EDTA und anschließend mit Biotin behandelt. Die Biotinfärbung von MCCL-3, MCCL-9 und MKL-1 zeigt keine Veränderung der Barrierefunktion für niedermolekulare Moleküle nach der Behandlung mit cCPE (Abb. 4.51). Das BR kann, ebenso wie auch bei der GST-Kontrolle, nicht in das Gewebe des Sphäroids eindringen. Eine erfolgreiche Barriestörung mit parazellulär verteiltem Biotin zeigen aber die EDTA-Kontrollen aller drei Zelllinien. Im Vergleich zu den Kontrollen GST und EDTA ist aber die Lokalisation von Cldn-4 nach der cCPE-Behandlung bei MCCL-3 und MCCL-9 verändert. Man sieht einen leichten Verlust des Proteins an den Zellgrenzen, was für eine erfolgreiche cCPE-Behandlung spricht. Die Zelllinie MKL-1 ist Cldn-4 negativ. Auch hier konnte, die Barrierefunktion durch die CPE- und GST-Behandlung nicht gestört werden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, diente aber gleichzeitig als Kontrolle für die spezifische Funktion des cCPEs.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die TJ-Barrierefunktion für niedermolekulare Moleküle in den MCCL Sphäroiden Cldn-4 unabhängig ist und über andere TJ-Transmembranproteine vermittelt werden muss.

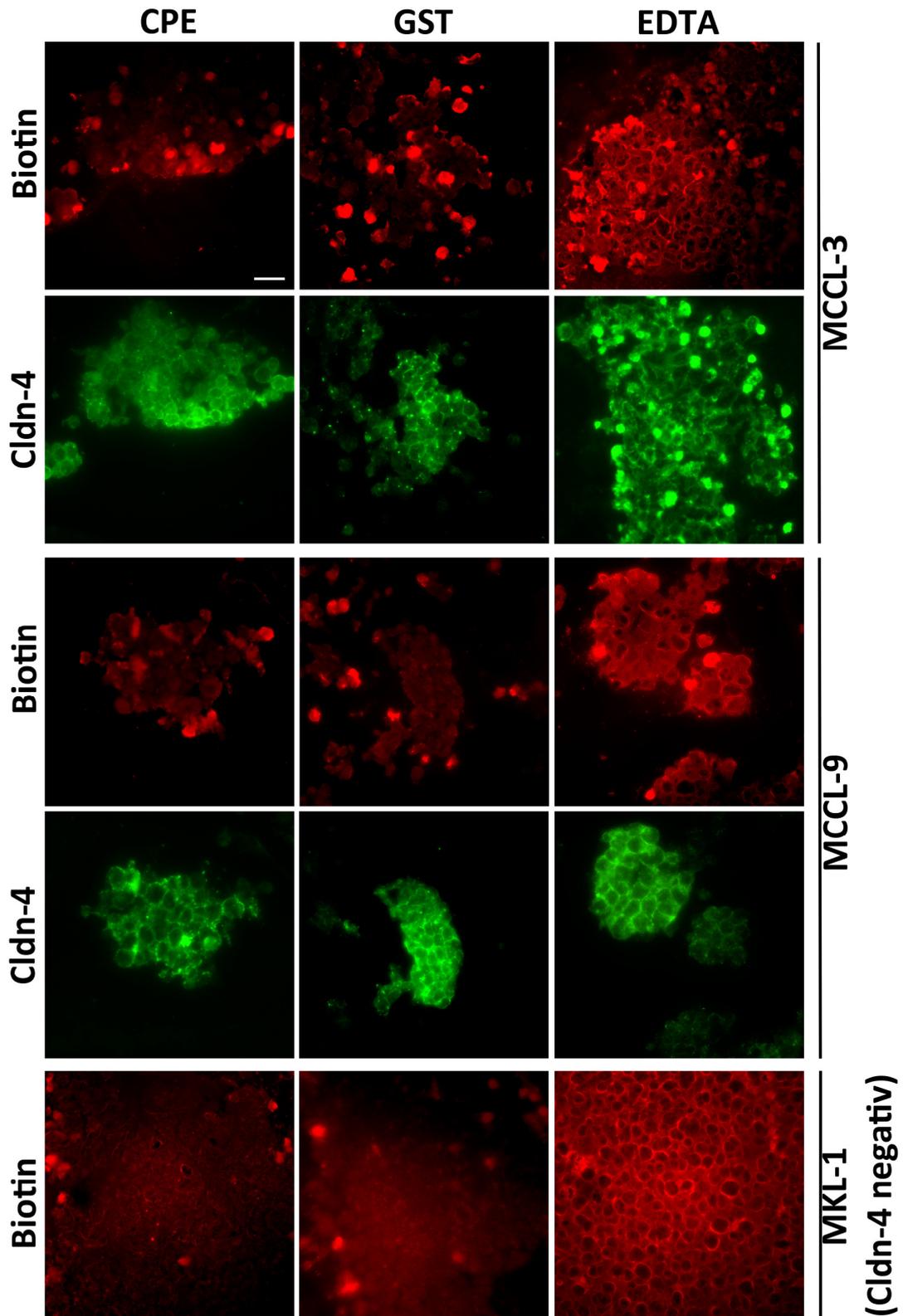


Abbildung 4.51: Einfluss von cCPE auf die Barrierefunktion in MCCL Sphäroiden und auf die Lokalisation von Cldn-4

Epifluoreszenzaufnahmen von biotinylierten Sphäroiden und Cldn-4 der Zelllinien MCCL-3, MCCL-9 und MKL-1 nach Behandlung mit cCPE, dem Kontrollpeptid GST und EDTA. Rot: Biotin; grün: Cldn-4. Maßstab: 20 µm.

4.5 Andere mögliche Funktionen von TJ-Proteinen

Neben der TJ-Barriere können TJ-Proteine auch in andere zelluläre Prozesse, wie der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Migration oder dem Vesikeltransport involviert sein. Insbesondere von ZO-1 und ZO-2 weiß man, dass ihre veränderte Lokalisation mit onkogener Transformation und Zellproliferation einhergeht (Gottardi *et al.* 1996, Islas *et al.* 2002). Auch die Invasivität von Zellen wird durch ZO-1 beeinflusst. Beispielsweise ist beim malignen Melanom die Invasivität der Tumorzellen bei ZO-1 Hochregulation verstärkt, wobei ZO-1 in diesem Tumor nur an AJs und nicht an TJs lokalisiert ist.

Bei denen in dieser Arbeit untersuchten MCCL wurden viele TJ-Proteine gefunden, die auch an anderen Funktionen außer der Barrierebildung innerhalb der Zelle beteiligt sein können. Es zeigte sich aber, dass es keine Korrelationen zwischen den Expressionsleveln der TJ-Proteine ZO-1, JAM-A, Occludin, Cldn-1 oder Cldn-4 und der Proliferationsrate der Zellen gibt. Des Weiteren gibt es auch keine Korrelation zwischen den Expressionsleveln aller untersuchten TJ-Proteine und der MCPyV-Infektion der Zelllinien, obwohl insbesondere TJ-Transmembranproteine für viele Viren Zielproteine sind um in die Wirtszellen zu gelangen (Burlone & Budkowska 2009). Eine Aussage über den Einfluss von TJ-Proteinen auf die Invasivität von MCCL kann aufgrund der heterogenen Invasionsexperimente nicht gemacht werden.

Tabelle 4.2: Übersicht über die Expression der einzelnen TJ-Proteine in den MCCL (auf Proteinebene) im Vergleich zur Proliferation und zur MCPYV-Infektion der Zelllinien. +: positiv, -: negativ; n.t.: nicht getestet; xxx starke Proliferation, xx: mittelstarke Proliferation; x schwache Proliferation; ¹: nur in der immunhistochemischen Färbung untersucht; (+)²: sehr schwache Bande im Westernblot; ³: < 1 Kopie viraler DNA pro Zelle.

	MCCL-3	MCCL-5	MCCL-6	MCCL-7	MCCL-8	MCCL-9	MCCL-11	MCCL-12	MCCL-15	MKL-1
MCPyV	+	+/- ³	-	+/- ³	+	-	+	+	+	+
LT-Antigen	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Proliferation	xxx	xx	x	n.t.	n.t.	xxx	n.t.	n.t.	n.t.	xx
Cldn-1	+/-	+	-	+	-	-	-	- ¹	-	-
Cldn-2	-	-	-	n.t.	n.t.	-	-	n.t.	-	-
Cldn-3	+	+	-	n.t.	-	+	(+) ²	n.t.	+	-
Cldn-4	+	+	(+) ²	+	-	+	+	n.t.	+	-
Cldn-5	+	+	-	-	-	+	-	n.t.	+	+
Ocludin	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
JAM-A	+	+	+	+	+	+	+	+ ¹	+	+
ZO-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZO-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5 Diskussion

5.1 Allgemeine Charakterisierung humaner Zelllinien des MCC

5.1.1 Klassifizierung der MCCL

Das Merkelzellkarzinom (MCC) ist ein zwar seltenes, aber dafür höchst aggressives Karzinom der Haut. Aufgrund seiner niedrigen Prävalenz und der Tatsache, dass es häufig nicht als MCC diagnostiziert wird, ist die Erforschung des MCC schwierig und nur eingeschränkt möglich. Die Verwendung von Zelllinien dieses Tumors kann die Forschung an MCC erleichtern, vor allem können auch dynamische Prozesse der Zellen untersucht werden. Insgesamt ist das MCC ein sehr heterogener Tumor, was seine Diagnose und Therapie zusätzlich erschwert. Diese Heterogenität spiegelt sich auch in den in unserem Labor etablierten Zelllinien wider. Deshalb wurden zunächst die neun vorhandenen Zelllinien charakterisiert und auf Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten untersucht. Zwischen den einzelnen Zelllinien gibt es sehr große morphologische Unterschiede, die sowohl die Zellgröße, die Zellform und ihr Wachstum in Kultur betreffen. Unterschiede zwischen den Zelllinien gibt es darüber hinaus auch bei ihrer Kultivierungsart, die Linien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6 und MCCL-9 wachsen auch ohne *Feederlayer*, die anderen Zelllinien können ausschließlich mit *Feederlayer* kultiviert werden. Die Linie MKL-1, die wir von Herrn Prof. Spelemann erhalten haben und deren Wachstum und Klassifizierung bereits in der Literatur beschrieben wurde (Rosen et al. 1987), wurde zum Vergleich verwendet. Sie wuchs wie bereits beschrieben.

Die Klassifizierung von MCCL (s. Kapitel 1.2.4) wurde vom kleinzelligen Bronchialkarzinom (*small cell lung cancer* = SCLC) übernommen, einem Tumor, der dem MCC sehr ähnlich ist, und dient zur groben Einteilung dieser sehr heterogenen Zelllinien (Leonard et al. 1993, Leonard et al. 1995). Dabei gibt die biochemische Charakterisierung an, ob die Zellen neuroendokrine Granula besitzen. Alle MCCL sind im Westernblot positiv für NSE, aber bei

der CRGA-Expression gibt es Unterschiede zwischen den Zelllinien. Insgesamt sind acht Linien klassisch, nur eine variant und bei einer MCCL ist eine eindeutige Klassifizierung nicht möglich. Da alle MCCL NSE positiv sind, wurde die Klassifizierung ausschließlich anhand der CRGA-Färbung durchgeführt. Dieser Marker gilt als sehr zuverlässig bei der Bestimmung von klassischen und varianten MCCL, die elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellen auf neurosekretorische Granula kann das Ergebnis zusätzlich noch belegen (Leonard et al. 1993). Diese Anwendung war technisch leider nicht möglich, weshalb die Klassifizierung ausschließlich anhand der CRGA-Expression erfolgte.

Des Weiteren wurden die Zelllinien anhand ihrer Morphologie charakterisiert. Allerdings gehört eine Zelllinie nicht dauerhaft einem Subtyp an, weshalb die Charakterisierung nur eine „Momentaufnahme“ ist. Zum Zeitpunkt der Charakterisierung gehörten vier der neun MCCL zum Subtyp I und bildeten dichte dreidimensionale Sphäroide. Auch MKL-1 zeigte sich als Typ I Zelllinie. Zum Ende dieser Arbeit änderten die Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9 und MKL-1 allerdings bei Kultivierung ohne *Feederlayer* ihren Phänotyp und setzten sich auf dem Boden der Kulturschale ab, wo sie einen adhären, teilweise einschichtigen, teilweise auch mehrschichtigen Zellrasen bildeten und morphologisch mehr den Typ IV Zelllinien entsprachen. Auch die Form der Zellen änderte sich. Einige der vorher runden Zellen bekamen eine längliche, mehr dendritische Form. Einfrieren und erneutes Auftauen der Zellen führte nur kurzfristig zu einer Rückführung der Morphologie in den Ursprungszustand. Eine solche Veränderung des Subtyps wurde auch schon von der Arbeitsgruppe um H. Leonard 1995 beschrieben. Nach Änderung der Kulturbedingungen durch Verwendung einer neuen FCS-Charge verloren die Typ I MCCL ihre Sphäroide und setzten sich auf dem Boden des Kulturgefäßes ab, wo sie dann als *Monolayer* wuchsen. Nach Trypsinierung der Zellen konnte die Typ I Morphologie kurzzeitig wieder hergestellt werden, aber schon nach kurzer Zeit änderten die Zellen wieder ihr Wachstumsverhalten und bildeten einen *Monolayer* (Leonard et al. 1995). Weshalb diese morphologischen Veränderungen in unseren Experimenten auftreten, ist bisher unklar. Möglicherweise ist nicht nur das FCS dafür verantwortlich, denn bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde die FCS-Charge nicht gewechselt. Auch der Ursprung der Zelllinien scheint keinen Einfluss auf ihr Wachstumsverhalten zu haben. Leonard et al. beschreiben zwei Zelllinien die aus einem

Tumor isoliert wurden und deren Zellen eine unterschiedliche Morphologie und auch leichte Unterschiede in ihren Proteinmustern zeigen (Leonard et al. 1995). Auch für die Linie MKL-1 sind Unterschiede in der Morphologie bereits beschrieben. In der Erstbeschreibung der Zelllinie 1987 wurde sie als Zelllinie mit dreidimensionalen Zellaggregaten beschrieben, was einer Typ I oder Typ II Zelllinie entspricht (Rosen et al. 1987). 1990 wurde dieselbe Zelllinie von einer anderen Arbeitsgruppe als adhärente Zelllinie mit Zellen, die ein Fibroblasten-ähnliches Aussehen zeigen, charakterisiert, was einer Typ IV Zelllinie entspricht (English *et al.* 1990).

Die in der vorliegenden Arbeit als Typ IV charakterisierten Zelllinien MCCL-6 und MCCL-12 wachsen nur mit Feederlayer adhärent. Sie wachsen dabei als runde Einzelzellen. Ohne Feederlayer wächst die Linie MCCL-6 in Suspension, die Linie MCCL-12 ist gar nicht ohne Feederlayer kultivierbar. Dadurch unterscheiden sie sich von den von Leonard *et al.* (1995) beschriebenen Typ IV Zelllinien, die ohne Feederlayer adhärent wachsen und eine längliche Form annehmen. Man müsste diese Zellen somit ggf. als Typ IVb klassifizieren.

Generell ist die Einteilung von MCCL in unterschiedliche Gruppen sehr sinnvoll, denn die Zelllinien sind sowohl in Bezug auf ihre Morphologie als auch auf die Proteinexpression sehr heterogen. Eine Einteilung der Zelllinien sollte meines Erachtens auch einen Bezug zum Ursprungsgewebe, in diesem Fall das MCC, herstellen. Die Parameter sollten nicht nur innerhalb der unterschiedlichen Gruppen der Zelllinien, sondern auch mit den Tumoren vergleichbar sein. Insbesondere der morphologische Subtyp ist eine sehr variable Komponente der Klassifizierung dieser Zelllinien und hat keinen Bezug zu den Ursprungstumoren des MCC. Deshalb wäre eine Klassifizierung der MCCL anhand von Parametern, die die Tumore mit einbeziehen, sinnvoller, so dass sich leichter Rückschlüsse von den *in vitro* Experimenten auf die *in vivo* Situation des Tumors ziehen lassen. Eine mögliche Klassifizierung könnte auf der Infektion der Zellen mit dem MCPyV basieren.

5.1.2 MCPyV in MCCL

Die Tatsachen, dass das neue humane Polyomavirus in einem Großteil aller MCC gefunden werden konnte (Becker J. C. et al. 2009b, Feng et al. 2008, Foulongne et al. 2008, Garneski et

al. 2009, Kassem et al. 2008, Shuda et al. 2008), die klonale Integration des Virus in die Tumorzellen (Shuda et al. 2008) sowie die Erkenntnisse, dass Primärtumoren und Metastasen dasselbe Integrationsmuster der viralen DNA tragen, zeigen, dass das MCPyV eine wichtige Rolle in der Tumorgenese des MCC spielt. Die MCCL sind gute Werkzeuge zum *in vitro* Studium dieser Tumorgeneseaspekte. Die Häufigkeit der MCPyV-Infektion in den von uns untersuchten MCCL liegt bei acht von zehn MCCL, d.h. bei 80%. Dies entspricht dem Prozentsatz, der auch in diversen Studien an MCC Tumoren gefunden wurde (u.a. Becker J. C. et al. 2009b, Feng et al. 2008, Foulongne et al. 2008, Garneski et al. 2009, Kassem et al. 2008, Shuda et al. 2008), was die MCCL weiter als gutes Werkzeug für die Erforschung dieses Virus qualifiziert. Zuvor haben Shuda *et al.* (2008) vier MCCL auf das Virus getestet, wobei nur eine dieser MCCL, die auch in dieser Arbeit als Kontrolle verwendete MKL-1, positiv für das MCPyV ist. MKL-1 ist klassisch (Rosen et al. 1987), wohingegen Zelllinien, die negativ auf virale DNA getestet worden waren, zu den varianten Zelllinien gehören (Shuda et al. 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse stellten Shuda *et al.* die Hypothese auf, variante MCCL seien MCPyV negativ und klassische Zelllinien MCPyV positiv. Die vorliegende Arbeit zeigt aber, dass die Klassifizierung der MCCL nicht mit der MCPyV-Infektion korreliert, obwohl die Tatsache, dass variante MCCL MCPyV grundsätzlich negativ sind nicht ausgeschlossen werden kann, da nur eine unserer MCCL variant ist und diese Virus-negativ ist. Klassische Zelllinien waren aber sowohl Virus-negativ als auch positiv. Da nur eine klassische MCCL MCPyV-negativ ist, ist es eventuell möglich, dass klassische Zellen häufiger von dem Virus infiziert werden als variante.

Die Tatsache dass MCCL unterschiedliche Kopienzahlen der viralen DNA besitzen ist bemerkenswert, die funktionellen Folgen davon sind bisher aber noch unbekannt. Fischer *et al.* konnten zeigen, dass MCCL-12 klonal integrierte Konkatomere des Virus besitzt (Fischer et al. 2010), was zuvor auch schon für MKL-1 beschrieben wurde (Shuda et al. 2008). Die anderen Zelllinien, die mehrere Kopien des viralen Genoms pro Zelle haben, wurden nicht im Southernblot untersucht, so dass episomale Kopien des MCPyV-Genoms nicht ausgeschlossen werden können. Bei den Zelllinien MCCL-5 und MCCL-7 konnten nur schwache Signale der MCPyV-DNA detektiert werden. Es zeigte sich, dass die Kopienzahl der viralen DNA bei MCCL-7 nur etwa bei einer Kopie pro 50 Zellen liegt. Eine Erklärung dafür

könnten mehrere Zellpopulationen im Ursprungstumor, aus dem die Zelllinie angelegt wurde, sein, so dass MCPyV-positive und -negative Zellen zu einer Kultur heranwachsen. Zwei unterschiedliche Zelltypen aus einem MCC wurden bereits beschrieben (Leonard et al. 1993). Eine alternative Erklärung könnte der Abbau von viraler DNA in einigen Tumorzellen während der *in vitro* Kultivierung sein. Ist dies der Fall gäbe es einen Selektionsdruck in einzelnen MCCL gegen das Virus. Für das afrikanische Green Monkey Polyomavirus konnte eine permanente Verringerung der Kopienzahl des ins Wirtsgenom integrierten viralen Genoms bei der *in vitro* Kultivierung beobachtet werden (von Hoyningen-Huene *et al.* 1992). Es sind aber zwingend noch weitere Versuche notwendig, die auf molekularbiologischer Ebene zeigen, wie es zu den unterschiedlichen Kopienzahlen der viralen DNA in den Zellen der MCCL kommt.

Shuda und seine Kollegen beschrieben auch Mutationen im MCPyV-Genom, die zu spontanen Stoppkodons und somit zu Verkürzungen der LT-Antigen Helikase-Domäne in MCC Gewebe und MKL-1 Zellen führen (Shuda et al. 2008). Die LT-Antigene der in dieser Arbeit untersuchten MCCL zeigen im Westernblot ebenfalls ein kleineres Protein. Interessanterweise sind nicht alle MCPyV-positiven MCCL auch auf Proteinebene positiv für das LT-Antigen. Das Protein ist nur bei den Zelllinien MCCL-8, MCCL-12, MCCL-15 und MKL-1 zu finden. Ein Grund dafür könnte eine andere Faltung des Proteins durch die Verkürzung sein, so dass das Epitop für den Antikörper nicht mehr zugänglich ist. Möglicherweise wird das Protein aber auch gar nicht mehr gebildet. RT-PCR Analysen sollten hier klären, ob das LT-Antigen erst gar nicht transkribiert wird, oder ob die mRNA in diesen Zellen abgebaut und somit nicht translatiert wird. Bei den Zelllinien MCCL-3, MCCL-11 und MCCL-12 konnten durch Sequenzierungen die Mutationen nachgewiesen werden, die zu spontanen Stoppkodons führen und somit das LT-Antigen verkürzen. Die Stoppkodons liegen zwischen den Rb-bindenden Regionen und der *Origin-binding* Domäne des LT-Antigens (Fischer et al. 2010). D.h. alle LT-Antigene haben noch ihre Rb-Bindefunktion. Da die p53-Bindestelle hinter den Stoppkodons liegt, geht diese durch die Mutationen verloren. Studien an Polyomaviren haben gezeigt, dass durch die Bindung des LT-Antigens an Tumorsuppressorproteine die Zelltransformation induziert werden kann. Da beim MCC der Mechanismus, der zur Tumorgenese führt, noch nicht geklärt ist, wurde untersucht, ob sich die Rb- und p53

Proteinlevel in MCPyV positiven MCCL von denen in MCPyV negativen MCCL unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit konnte aber kein Zusammenhang zwischen MCPyV-DNA und Rb- oder p53-Proteinleveln gefunden werden. Wenn man nur die MCCL betrachtet, bei denen man im Westernblot tatsächlich das LT-Antigen nachweisen kann, zeigen diese Zelllinien keine geringeren Level des Tumorsuppressorproteins p53. Allerdings sind die Proteinmengen von Rb bei den LT-Antigen exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu allen anderen Zelllinien leicht erhöht. Möglicherweise kommt die Hochregulation von Rb dadurch zustande, dass die Wirtszelle versucht den Verlust von Rb, das durch die Bindung an das LT-Antigen der Zellen nicht mehr zur Verfügung steht, auszugleichen. Rb ist normalerweise für die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F verantwortlich (u.a. Lodish 2003). Steht der Zelle aber durch die Bindung des LTA-Antigens nicht genügend Rb zur Verfügung, könnte die Rb-Expression in der Zelle gesteigert werden um den Funktionsverlust des Proteins zu kompensieren.

Eine Arbeit von 2010 bestätigt, dass die Proteinlevel von Rb und auch von phosphoryliertem Rb in MCPyV-positiven und –negativen MCC vergleichbar sind (Houben *et al.* 2010a). In dieser Arbeit wurde aber nicht untersucht, ob die MCPyV-positiven Zelllinien das LT-Antigen bilden. Immunpräzipitationsstudien könnten hier Aufschluss über die Interaktion von Rb und LT-Antigen geben und die Untersuchung des Transformationspotentials der verkürzten LT-Antigene im Vergleich zu Vollängenproteinen sollte klären, ob die verkürzten LT-Antigene die Transformation zu Tumorzellen fördern.

5.1.3 Wachstumsgeschwindigkeiten der MCCL

Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde mit dem WST-1 Assay ermittelt und ist sehr unterschiedlich zwischen den einzelnen Linien. In diesem Versuch konnten nur Zelllinien untersucht werden, die auch ohne *Feederlayer* wachsen, d.h. MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9 und MKL-1. Am schnellsten wächst die Linie MCCL-9, wobei es bis zum Zeitpunkt fünf Tage noch keinen Unterschied zu der Wachstumsgeschwindigkeit von MCCL-3 gibt. MCCL-5, MCCL-6 und MKL-1 wachsen deutlich langsamer als die anderen beiden MCCL. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit noch die Proliferation mittels BrdU-Elisa und der Anteil apoptotischer Zellen der Kulturen ermittelt. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die

Wachstumskurven der MCCL. Wachstumsgeschwindigkeiten von MCCL wurden schon von vielen Arbeitsgruppen ermittelt und publiziert. Die Verdopplungszeiten der Typ I-III Suspensionszelllinien MCC1 – MCC6 und der Typ IV Zelllinien MCC13 – MCC15 wurde mit dem MTT-Assay ermittelt. Sie liegen bei den Zelllinien MCC1 – MCC6 zwischen sechs und 10,5 Tagen, bei MCC13 –MCC15 zwischen einem und fünf Tagen. Dies zeigt, dass adhärente Typ IV MCCL deutlich schneller wachsen als Suspensionszelllinien. Die Wachstumskurven zeigen zusätzlich, dass Suspensionszelllinien nur dann wachsen, wenn sie in der für sie idealen Dichte ausgesät werden, wohingegen Typ IV MCCL viel unempfindlicher gegenüber Schwankungen in der Zelldichte sind (Leonard et al. 1993, Leonard et al. 1995). Englisch (1990) beschrieb eine Verdopplungszeit seiner MCCL von 48 Stunden. Die Zellen dieser Linie nahmen nach 49 Tagen ein Fibroblasten-ähnliches Aussehen an, was auf eine adhärente Typ IV MCCL schließen lässt und die schnelle Verdopplungszeit erklärt. Zu dieser Zeit waren die Unterschiede zwischen den morphologischen Subtypen der Zelllinien noch nicht bekannt. Die Verdopplungszeiten der Zelllinien MC-MA1 und MC-MA2 liegen bei 84 Stunden in den ersten acht Monaten, danach steigen sie an (Moll I. *et al.* 1994). Es scheint, als würden die Zelllinien schneller wachsen, wenn sie morphologisch den Typ IV MCCL entsprechen. Für die anderen Subtypen scheint es aber keine Korrelationen zwischen Subtyp und Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien zu geben. Auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten MCCL zeichnet sich ab, dass es die Wachstumsgeschwindigkeit nicht mit dem Subtyp der Zelllinien korreliert. Generell ist die Bestimmung der Verdopplungszeiten keine besonders geeignete Methode um Zelllinien untereinander zu vergleichen, da die Wachstumskurven der Zellen nicht linear verlaufen und somit, je nachdem welche Zeitpunkte zur Ermittlung der Verdopplungszeiten herangezogen werden, diese stark variieren. Zum Vergleich der Zelllinien untereinander ist die direkte Gegenüberstellung der Wachstumskurven, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde, aussagekräftiger. Insgesamt ist die Proliferation der Zellen verglichen mit anderen Tumorzelllinien, z.B. Melanomzelllinien, sehr langsam. Obwohl die Zellen teilweise auf *Feederlayern* wachsen, könnten den Zellen wichtige Faktoren aus dem Gewebe fehlen, so dass ihre Proliferation eingeschränkt ist. Ein Charakteristikum des MCC *in vivo* ist nämlich ein sehr schnelles Wachstum des Tumors.

Warum die Wachstumsgeschwindigkeiten der MCCL stark variieren ist bisher unklar. Einen Einfluss könnte die Infektion der Zellen mit dem MCPyV haben. Die Untersuchungen der Zelllinien zeigten allerdings, dass es keine Korrelationen zwischen den Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien und der MCPyV-Infektion bzw. der LT-Antigen Expression gibt. Am schnellsten wächst die MCPyV-negative Zelllinie MCCL-9. Dieses Ergebnis ist überraschend, denn eine höhere Proliferationsrate in Virus positiven Zelllinien wäre durch die Bindung von LT-Antigen an Rb, wodurch E2F aktiviert wird und die Transkription von S-Phase Genen eingeleitet wird, zu erwarten gewesen. Stattdessen scheint die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen MCCL völlig unabhängig vom Virusstatus der Zelllinien zu sein. Die Virus-positive Zelllinie MCCL-3 wächst fast genauso schnell wie MCCL-9, wohingegen die ebenfalls Virus-positive Linie MKL-1, die negative Linie MCCL-6 und MCCL-5, die nur in einigen Zellen die virale DNA trägt, sehr langsam wachsen. Die Arbeitsgruppe um J. Becker konnte vor kurzem zeigen, dass ein *knockdown* der T-Antigen Expression in MCPyV-positiven MCCL zu Wachstumsarrest der Zelllinien und/oder zum Zelltod führt, wohingegen MCPyV-negative MCCL unbeeinflusst bleiben (Houben *et al.* 2010b). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Wachstum MCPyV-positiver MCCL von der LT-Antigen Expression abhängig ist, das Wachstum der Virus negativen Zelllinien muss hingegen von anderen Faktoren abhängen. Wahrscheinlich entstehen MCPyV-positive und -negative Tumore auf völlig unterschiedliche Art. Außer der viralen Infektion wird die Proliferation der Tumorzellen noch durch viele andere Faktoren beeinflusst, weshalb der einfache Vergleich der Proliferation zwischen MCPyV positiven und negativen Zelllinien nicht ausreicht. Größere Untersuchungen von zwei Studien konnten zeigen, dass Patienten, die MCPyV positive Tumore haben, in Bezug auf die Überlebensrate im Vergleich zu Patienten mit MCPyV negativen Tumoren begünstigt sind (Bhatia *et al.* 2010, Sihto *et al.* 2009). Auch diese Ergebnisse belegen, dass nicht ausschließlich die Proliferation Tumorwachstum und Überlebensrate beeinflussen, sondern die Tumorgenese und -progression multifaktorielle Prozesse sind. Bei dem Vergleich der Aggressivität Virus positiver und negativer Tumore *in vivo* könnte das Immunsystem eine entscheidende Rolle spielen, in dem es beispielsweise Zellen MCPyV positiver Tumore besser erkennen und bekämpfen kann als Zellen MCPyV negativer Tumore. Vergleiche der Proliferationsgeschwindigkeiten *in vitro* sind aber dennoch

ein wichtiges Hilfsmittel um den Einfluss weiterer Faktoren auf die Proliferation der Tumorzellen zu untersuchen.

5.2 Charakterisierung der MCCL bezüglich TJs und TJ-Proteinen

Tight Junctions (TJs) sind die am weitesten apikal liegenden Zell-Zellverbindungen von Epithelien. Schon lange weiß man, dass Prozesse wie die Veränderung der epithelialen Barriere und der Verlust der Zellpolarität stark in die Tumorbilologie involviert sind (Martin and Jiang 2009, Miyoshi and Takai 2005). Mit ihrer Barrierefunktion sind sie unter anderem für die Trennung bestimmter Faktoren in der Umgebung der Zelle verantwortlich, so dass jede quantitative und qualitative Dysregulation von TJs theoretisch das normale Gleichgewicht der Zelle beeinflussen und zu einer abnormalen Zellphysiologie führen kann. Eine Veränderung der Barriere kann beispielsweise zu einem Verlust der natürlichen Barriere zwischen Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren führen und somit die Tumorentstehung fördern (Zeng et al. 2009). Der Verlust der Barrierefunktion von TJs und die damit einhergehenden Veränderungen der Permeabilitätseigenschaften werden mit Krankheiten wie Nierenfunktionsstörungen, Lungenödemen, Diarrhöe und Gelbsucht in Verbindung gebracht (Bronstein et al. 2000, Huber et al. 2001, Sawada et al. 2003, Wolburg et al. 2001). Intakte Zell-Zell-Verbindungen und Verbindungen von Zellen mit extrazellulären Matrixproteinen sind für die normale Funktion epithelialer Zellen unerlässlich.

Eine verminderte Expression von TJ-Proteinen kann zu einer gestörten Barriere- und Polaritätsfunktion in Geweben führen und so, wie eben beschrieben, die Tumorentstehung fördern. Es ist aber bekannt, dass auch eine erhöhte Expression von TJ-Proteinen zur Tumorentstehung und -progression führen kann. Man geht davon aus, dass auch die gesteigerte Proteinexpression die Barriereeigenschaften aus dem Gleichgewicht bringt und es dadurch zu einem Verlust der normalen TJ-Funktionen kommt (als Übersichtartikel s. Singh et al. 2010). Eine weitere Hypothese ist die Bildung von funktionellen TJs in Tumoren, durch die sich Tumore oder bestimmte Bereiche der Tumore gegenüber ihrer Umwelt abkapseln und somit für das Immunsystem und Chemotherapeutika unerreichbar sind. Dies

könnte das Überleben der Tumorzellen sichern (Langbein *et al.* 2003). Außerdem sind TJ-Proteine auch an genregulatorischen Mechanismen beteiligt, und können die Zellproliferation, -differenzierung und -polarität beeinflussen (Matter *et al.* 2005).

5.2.1 Funktionelle TJs in MCCL

Klassische Merkelzellen sind negativ für die TJ-Proteine Cldn-1 bis -5, Occludin und ZO-1. Es gibt allerdings bisher erst eine Untersuchung von TJ-Proteinen in Merkelzellen, die ausschließlich an Schnitten humaner Fußsohle durchgeführt wurden. Es ist aber bekannt, dass Merkelzellen verschiedener Lokalisationen unterschiedliche Proteine exprimieren können (Eispert *et al.* 2009), so dass eine Expression von TJ-Proteinen in Merkelzellen in anderen Lokalisationen nicht ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zu den Merkelzellen findet man in Tumoren des MCCs die Expression vieler TJ-Proteine, die, wie schon in Kapitel 1.3.3 beschrieben, sehr heterogen in den Tumoren exprimiert werden. In MCCL wurden TJ-Proteine bisher noch nicht untersucht, aber interessanterweise wurden schon rudimentäre Zellverbindungen (English *et al.* 1990) bzw. TJs (Leonard *et al.* 1995) in adhärennten Typ IV MCCL beschrieben. Diese Daten beruhen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Sphäroide der Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9 und MKL-1 funktionelle TJs haben. Sie bilden eine Barriere für einen 557 Da *Tracer*, die durch Entzug von Calcium durch EDTA reversibel aufgehoben werden kann. Calcium ist essentiell für den Cadherin vermittelten Aufbau der TJs. Dies zeigen u.a. Experimente mit primären Keratinozytenkulturen. Bei diesen Zellen kommt zu einem Anstieg des TERs, wenn dem Kulturmedium ausreichend Calcium zugesetzt wird (Yuki *et al.* 2007). Durch die erneute Zugabe von Calcium-haltigem Kulturmedium zu den mit EDTA behandelten MCCL Sphäroiden wird die Barrierefunktion innerhalb der Sphäroide wieder hergestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Barriere in den Sphäroiden reversibel zu öffnen ist. Ob auch MCCL, die keine oder nur lockere Sphäroide bilden, TJs haben, konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Die Zellcluster der Typ II und III Zelllinien sind nicht groß genug um an ihnen Biotinylierungs-Assays durchzuführen. Die Zellen der Typ IV Zelllinien

wachsen nur einzellig, wodurch man eine Bildung von TJs ausschließen kann. Interessant wäre die Untersuchung von TJs der Zelllinien mit veränderten Morphologien, die adhären auf dem Boden der Kulturschale sitzen und teilweise dendritische Formen annehmen. Leider war der Nachweis von TJ-Proteinen durch immunhistochemische Färbungen der Zellen nicht möglich, da sie sich nicht auf Objektträgern kultivieren ließen. Auch TER-Messungen ließen sich nicht durchführen, da die Zellen keinen gleichmäßigen Monolayer bilden, sondern teilweise einschichtig und teilweise mehrschichtig wachsen und der Gefäßboden nicht gleichmäßig bewachsen ist. Die Ergebnisse der Westernblotuntersuchungen und die EM-Aufnahmen anderer MCCL in der Literatur lassen aber auf TJ-Stränge in adhären Typ IV Zelllinien schließen (English et al. 1990, Leonard et al. 1995). Weitere Untersuchungen müssen hier klären, ob diese TJs auch funktionell sind.

Neben den Biotinylierungsexperimenten, die zeigen, dass MCCL Sphäroide eine funktionelle Barriere bilden, liefern auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Sphäroide von MCCL-9 und MKL-1 einen weiteren Hinweis auf die Bildung von TJs in den MCCL-Sphäroiden. Sie zeigen klassische TJ-Stränge, wobei die Dichte der TJ-Stränge bei MCCL-9 höher ist als bei MKL-1. Dies könnte mit der Kombination der exprimierten Claudine beider Zelllinien zusammen hängen. MCCL-9 bildet sehr dichte TJ-Stränge und ist gleichzeitig auf Proteinebene positiv für die TJ-Transmembranproteine Cldn-3, -4, -5 und Occludin. MKL-1 hat weniger dichte TJ-Stränge und ist auf Proteinebene nur für die TJ-Transmembranproteine Cldn-5 und Occludin positiv.

In Tumorgewebe wurden TJ-Stränge bereits beim kolorektalen Karzinom (de Oliveira et al. 2005), hepatozellulären Karzinom (Swift et al. 1983) und Schilddrüsenkarzinomen (Kerjaschki et al. 1979) beschrieben. Allerdings werden TJ-Proteine in allen drei Geweben auch schon vor der Tumorbildung exprimiert. Beim kolorektalen Karzinom sind die Claudine 1-4 hochreguliert aber trotzdem sind die TJ-Stränge dieser Tumore weniger dicht als die in der normalen kolorektalen Mucosa. Auch die Permeabilität dieser TJs ist gegenüber dem gesunden Gewebe erhöht (de Oliveira et al. 2005, Soler et al. 1999). Das heißt bei diesem Tumor kommt es zu einer Reduktion der Barrierefunktion im Gegensatz zu der neu gebildeten Barrierefunktion in MCCL Sphäroiden, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Beim kolorektalen Karzinom wird vermutet, dass die TJ-Funktion durch die

Herunterregulation von Occludin und ZO-1 beeinträchtigt wird. Gleichzeitig konnte bei diesen Tumoren eine Herunterregulation von E-Cadherin beobachtet werden (de Oliveira et al. 2005). Ob andere Cadherine wie N- oder P-Cadherin stattdessen exprimiert werden, wurde nicht untersucht. Auch beim hepatozellulären Karzinom kann eine Dysorganisation von TJ-Strängen im elektronenmikroskopischen Gefrierbruch beobachtet werden (Swift et al. 1983), obwohl die Claudine-1, -2 und -7 vermehrt exprimiert werden (als Übersichtsartikel s. Singh et al. 2010). Eine verstärkte TJ-Funktion gegenüber dem Ursprungsgewebe oder die Anwesenheit, ggf. sogar die Neubildung von funktionellen TJs während der Tumorgenese konnte bisher in noch keinem Tumor gezeigt werden und wird somit in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben.

Dies könnte für den Tumor ein entscheidender Vorteil im Kampf gegen Therapeutika und die Abwehrmechanismen des Wirtes sein. Es ist bekannt, dass Tumorzellen, die in Sphäroiden wachsen, eine geringe Sensitivität gegenüber nahezu allen Chemotherapeutika zeigen (Durand & Sutherland 1972). Das Phänomen wird multizelluläre Resistenz (MCR) genannt und tritt auf, wenn Tumorzellen mit ihren Nachbarzellen in Kontakt kommen, beispielweise wenn die Zellen als Sphäroide kultiviert werden (Bates *et al.* 1994, Graham *et al.* 1994). Die Zellen sekretieren dann mehr extrazelluläre Matrix (Glimelius *et al.* 1988). Diese Kontakt abhängige Resistenz ist reversibel und endet wenn die Zellen ihre Zellverbindungen verlieren. Zusammen mit dem Verschluss des parazellulären Raums durch TJs könnte dies ein sehr wirksamer Mechanismus der Tumorzellen sein, um sich vor Therapeutika und dem Immunsystem des Wirts zu schützen. Dabei könnte der gesamte parazelluläre Raum des Tumors durch TJs verschlossen werden, oder es könnten sich kleine Bereiche im Tumorgewebe abkapseln um die darin liegenden Zellen vor äußeren Einflüssen zu schützen. Für die Abkapselung kleiner Bereiche im Tumor spricht auch das zuerst gute Ansprechen von MCC-Patienten auf Chemotherapeutika, und die anschließend schnelle Bildung von Rezidiven (Becker J. et al. 2008). Denkbar ist eine Ausbreitung von Zellclustern nach der Chemotherapie, die sich vorher innerhalb des Tumors durch TJs abgekapselt haben und aus denen nun neue Tumoren hervorgehen. Mit diesem Wissen könnte sich die Behandlung von MCC deutlich verbessern, denn es könnten zusätzliche TJ-Modulatoren eingesetzt werden, die eine gleichmäßige Verteilung von Chemotherapeutika in MCC gewährleisten würden.

5.2.2 Welche Moleküle sind für die Ausbildung von funktionellen TJs verantwortlich

Beim Aufbau von TJs spielen auch AJ-Proteine eine entscheidende Rolle. Die Bildung von TJs wird über Cadherine vermittelt, welche eine initiale Adhäsion zwischen zwei Zellen hervorrufen. Im Verlauf der Reifung werden TJ-Proteine sowie der Par-Polaritätskomplex, der von Par3, Par6 und der atypischen Proteinkinase C (aPKC) gebildet wird, rekrutiert und es kommt zur Bildung distinkter TJs und AJs (Ebnet *et al.* 2001, Macara 2004, Ohno 2001, Suzuki *et al.* 2002). Der Par3/Par6/aPKC-Komplex bleibt an den TJs lokalisiert und wird sowohl beim Aufbau der TJs auch bei ihrer Aufrechterhaltung benötigt (Izumi *et al.* 1998, Joberty *et al.* 2000). Da die Funktionalität von TJs nicht in allen MCCL im *Tracer*-Assay oder auf elektronenmikroskopischer Ebene untersucht werden konnte, wurde in dieser Arbeit getestet, welche der zehn MCCL die Voraussetzungen für den Aufbau funktioneller TJs erfüllen. Zunächst wurden die Proteine des Par-Polaritätskomplexes in den MCCL untersucht. Die Isoformen zeta und iota/lamda (Daten nicht gezeigt) der atypischen Proteinkinase C werden von allen MCCL gebildet. Par3 kommt in drei unterschiedlichen Isoformen vor, die die Größe 180, 150 und 100 kDa haben. Der Nachweis von Par3 auf Proteinebene zeigt, dass die 180 und 150 kDa Isoformen bei den Zelllinien MCCL-3, -5, -6, -9 und MKL-1 vorhanden sind, die 100 kDa Isoformen hingegen fehlen bei allen MCCL. Da diese Isoform aber keine aPKC-Bindestelle besitzt, ist diese wahrscheinlich für den Aufbau der TJs nicht von Bedeutung, da während dieses Prozesses Par3 ebenso wie Par6 mit den Isoformen zeta und iota/lambda der aPKC interagiert (als Übersichtsartikel s. Paris *et al.* 2008). MCCL-5 war bisher in einem Westernblot negativ, im zweiten Blot jedoch positiv für Par3. Da für MCCL-5 in dieser Arbeit im Biotinylierungsexperiment aber eine funktionelle Barriere nachgewiesen werden konnte, ist es gut möglich, dass der erste Westernblot ein falsch negatives Ergebnis für Par3 zeigt. Jedoch könnte bei dieser Zelllinie auch der Crumbs/PALS1/PATJ-Komplex, der auch an der Barriere- und Zellpolaritätserhaltung von Epithelzellen beteiligt ist, diese Funktion übernehmen (Roh & Margolis 2003, Roh *et al.* 2003). Normalerweise findet man diesen Komplex in Verbindung mit dem Par3/Par6/aPKC-Komplex, die genaue Rolle von Crumbs/PALS1/PATJ bei der TJ-Regulation ist aber noch nicht bekannt (Hurd *et al.* 2003). Im Gegensatz zu den beiden bisher beschriebenen Komplexen

scheint der mLgl/aPKC/Par6-Komplex das TJ-Aufbau zu unterdrücken, indem mLgl mit Par3 um die Bindung von Par6 und aPKC konkurriert (Yamanaka *et al.* 2003). Die Expression insbesondere von Par3 ist ein wichtiger Beweis für die TJ-Bildung in den MCCL. In MDCK-Zellen beispielsweise führt ein Verlust von Par3 zur Zerstörung der TJs (Chen & Macara 2005).

Wie schon zu Beginn dieses Kapitels erwähnt wurde, sind für den initialen Kontakt zwischen Zellen Cadherine verantwortlich. Insbesondere E-Cadherin spielt beim Aufbau von epithelialen TJs eine wichtige Rolle. Eine Herunterregulation von E-Cadherin führt zu einem Verlust von TJs und der Barriere (Tunggal *et al.* 2005). *In vivo* Studien an E- und P-Cadherin *knockout*-Mäusen haben aber gezeigt, dass die Barrierefunktion der Epidermis nur gestört ist, wenn beide epidermalen Cadherine fehlen. Der Verlust der Proteine resultiert in der Delokalisation von TJ- und AJ-Proteinen von der Membran (Tinkle *et al.* 2008). Bisher wird nur E- und P-Cadherin die Funktion der Induktion des Aufbaus von TJs zugeschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen aber vermuten, dass auch N-Cadherin die TJ-Bildung vermitteln kann, denn die TJ-bildenden Zelllinien MCCL-3, MCCL-5 und MCCL-9 exprimieren weder E- noch P-Cadherin. Dies ist eine völlig neue Erkenntnis und sollte in weiteren Untersuchungen unbedingt verfolgt werden. Dafür sollte insbesondere eine nur sehr schwache E-Cadherin Expression in den MCCL, die eventuell im Westernblot nicht detektiert werden kann, durch sensitivere Methoden ausgeschlossen werden.

Des Weiteren konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass es im Vergleich zum Ursprungsgewebe bei MCC-Tumoren zu einer Hochregulation von N-Cadherin kommt, E- und P-Cadherin werden hingegen nur von einigen Tumoren gebildet (Han *et al.* 2000, Tanaka *et al.* 2004, Werling *et al.* 2011). Diese Studien deuten auf einen Cadherin-*switch* bei MCCs hin, der auch in den MCCL zu beobachten ist. Alle untersuchten MCCL sind N-Cadherin positiv und die Färbung ist ausschließlich an den Zellgrenzen lokalisiert. MCCL-6, MCCL-8, MCCL-11, MCCL-12, MCCL-15 und MKL-1 exprimieren zusätzlich auch noch P-Cadherin. Ein Cadherin-*switch* ist ein häufiges Ereignis in der Tumorgenese, bei dem das für Epithelzellen charakteristische E-Cadherin ganz oder teilweise durch das für mesenchymale Zellen typische N-Cadherin ersetzt wird. Dieses soll im Zuge der Invasion und Metastasierung die Interaktion mit neuen, mesenchymalen Nachbarzellen wie Fibroblasten und Endothelzellen

von Blut- und Lymphgefäßen erleichtern. Das Verhältnis von E- zu N-Cadherin beeinflusst das Verhalten von Zellen auf vielfältige Weise, wobei N-Cadherin die Motilität, Invasivität und das Überleben von Zellen fördert, während E-Cadherin in den meisten Situationen als Tumorsuppressor wirkt (Birchmeier & Behrens 1994).

Neben Cadherinen und dem Polaritätskomplex sind auch JAM-A und Zonula Occludens Proteine bei der TJ-Bildung von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass durch Ausschalten von ZO-1 oder ZO-2 und in Abwesenheit von ZO-3 die TJ-Bildung blockiert ist. Dies resultiert in einem kompletten Verlust der TJ-Stränge, anderer TJ-Proteine und der Barrierefunktion (Umeda et al. 2006). Sowohl ZO-1, ZO-2 als auch JAM-A werden von allen untersuchten MCCL gebildet, wobei mindestens eins der Proteine ZO-1 oder ZO-2 an den Zellgrenzen lokalisiert ist. JAM-A ist ausschließlich an den Zellgrenzen zu finden. Die mRNA-Level von ZO-1 und JAM-A sind in den TJ-bildenden Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-9 und MKL-1 aber höher als bei der Zelllinie MCCL-6, bei der die Bildung von TJs wegen des einzelligen Wachstums ausgeschlossen ist. Möglicherweise haben diese Proteine noch andere Funktionen innerhalb der MCC-Zellen, bei den TJ-bildenden Zelllinien könnten die Proteine aber zusätzlich in Zellverbindungen involviert sein, was die erhöhte Transkription dieser Gene erklären könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Zelllinien MCCL-3, MCCL-5, MCCL-6, MCCL-9 und MKL-1 viele Proteine bilden, die für den Aufbau funktioneller TJs notwendig sind. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob das TJ-Transmembranprotein Cldn-4 an der Barrierebildung in den MCCL beteiligt ist. Cldn-4 wird in fast allen MCCL exprimiert und spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Barrierebildung vieler Epithelien. In der vorliegenden Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass Cldn-4 für die 557 Da-Barriere in MCCL-Sphäroiden nicht wichtig ist. Durch die Behandlung mit cCPE kann die Barriere der Sphäroide für den 557 Da Tracer nicht aufgehoben werden. Der C-terminale Teil von CPE (cCPE) bindet spezifisch an Cldn-4, wodurch dieses aus den TJs gelöst wird und es zu einem Abbau von TJ-Strängen und zum Verlust der Barrierefunktion kommt (Sonoda et al. 1999). CPE kann auch an Cldn-3, -6, -7, -8 und -14 binden, der Effekt ist bei diesen Claudinen aber schwächer als bei Cldn-4 (Kondoh *et al.* 2006). Die Barrierefunktion in den MCCL scheint also

nicht Cldn-4 abhängig zu sein. Dafür spricht auch die Barriere in den Cldn-3 und -4 negativen MKL-1 Sphäroiden. Diese Ergebnisse schließen aber nur eine Beteiligung von Cldn-4 an der Barriere für 557 Da große Moleküle aus. Für Moleküle anderer Größen könnte Cldn-4 durchaus noch eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass hauptsächlich die Claudine an der Bildung Ionen-selektiver Poren in den TJs beteiligt sind und durch die Zusammensetzung der Claudine in den TJs die Permeabilität von Molekülen beeinflusst werden kann (Tang V. W. & Goodenough 2003). Bis auf wenige Ausnahmen sind die TJs in Epithelien Kationen selektiv (Powell 1981). Eine Cldn-4 Überexpression in MDCK II Zellen führt beispielsweise zu dichteren TJ-Strängen und einer verminderten parazellulären Leitfähigkeit, was hauptsächlich auf eine schlechtere Na^+ Permeabilität zurückzuführen ist (Van Itallie *et al.* 2001). So könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der Claudine in den MCCL auch zur Permeabilität unterschiedlicher Moleküle führen. Die Barrierefunktion für den verwendeten 557 Da Tracer wird in unseren Versuchen durch das Ausschalten von Cldn-4 durch cCPE nicht beeinflusst, möglicherweise steigt aber die Permeabilität anderer Moleküle, insbesondere von Kationen. Dass Cldn-4 an der Bildung dichterer TJ-Stränge beteiligt ist, könnte erklären, warum die TJ-Stränge in der Cldn-4 negativen Zelllinie MKL-1 weniger dicht sind als in der Cldn-4 positiven Zelllinie MCCL-9.

TJ-Transmembranproteine gelten als interessante Targets für die Therapie von TJ-Protein bildenden Tumoren. Insbesondere cCPE gilt als mögliches Therapeutikum für Cldn-4 exprimierende Tumore. Durch die Behandlung mit diesem Toxin konnte bereits eine spezifische Zytolyse von Brust-, Pankreas-, Eierstock- und Prostatakrebszellen bewirkt werden (Kominsky *et al.* 2004, Long *et al.* 2001, Michl *et al.* 2001, Santin *et al.* 2005). cCPE wird auch zur Steigerung der Aufnahme von Medikamenten im Darm verwendet, da es dort die Permeabilität des Epithels erhöht (Kondoh & Yagi 2007, Kondoh *et al.* 2005). Da die Barriere der MCCL-Sphäroide durch die Behandlung mit cCPE nicht beeinflusst werden konnte, kommt diese Therapie für das MCC nicht in Frage. Möglich wäre aber eine Therapie mit Antikörpern oder Modulatoren, die gegen andere TJ-Proteine oder Peptide, die die TJ-Proteinfunktionen blockieren, gerichtet sind.

Da Cldn-5 und Occludin in allen MCCL gefunden werden, die funktionelle TJs bilden, könnten sie eine wichtige Rolle in der Barrierefunktion für niedermolekulare Moleküle spielen. Bislang können TJs in den anderen Zelllinien aber nicht ausgeschlossen werden, weshalb Cldn-5 und Occludin nicht ohne weiteres die Barriere-bildende Funktion zugeschrieben werden kann. Um dies genauer zu untersuchen sollten in zukünftigen Studien noch weitere TJ-Modulatoren eingesetzt werden, die gegen Occludin und Cldn-5 gerichtet sind. Beispielsweise konnte an einer *Xenopus* Nierenepithelzelllinie gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit einem synthetischen Peptid gegen Occludin zu einer gestörten transepithelialen Permeabilitätsbarriere führt (Wong & Gumbiner 1997). Es wäre interessant zu sehen, ob die Modulation von Occludin auch zu einem Barriereverlust in MCCL Sphäroiden führt. Auch die Herunterregulation der Cldn-5-Translation, beispielsweise mit siRNA oder antisense Oligonukleotiden würde entscheidende Hinweise liefern, ob dieses Protein an der Barrierebildung in MCCL-Sphäroiden beteiligt ist. Bisher waren Transfektionsstudien der MCCL zur Untersuchung der Funktion von Occludin bei der Barrierefunktion nicht erfolgreich. Die Transfektion von MCCL ist allerdings auch sehr schwierig, so dass sie schon im Jahre 1993 als Zellen mit einer sehr geringen Klonierungseffizienz beschrieben wurden (Leonard et al. 1993).

Ebenso interessant wie die Untersuchung von Occludin und Cldn-5 wäre das spezifische Ausschalten der TJ-Proteine ZO-1, ZO-2 und JAM-A, die alle verstärkt in TJ-bildenden MCCL exprimiert werden. Auch eine Beteiligung anderer Claudine, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, an der Barrierebildung ist nicht ausgeschlossen und sollte in zukünftigen Studien untersucht werden. Möglicherweise ist aber auch eine spezielle Kombination verschiedener Claudine und nicht nur die Expression einzelnen Proteine für die Barriere wichtig.

5.3 Korrelation der Expression von TJ-Proteinen mit Eigenschaften der MCCL

5.3.1 Korrelation der TJ-Proteine mit der Morphologie

Generell sind die TJ-Proteine in MCCL sehr heterogen exprimiert. Insbesondere nach Betrachtung der Typ I Zelllinien, die nach längerer Kultivierung ihrem Subtyp verändert haben, ist zu erkennen, dass es keine Korrelation zwischen TJ-Proteinen und der Morphologie der Zelllinien gibt.

Allerdings ist zu erkennen, dass Zelllinien, die ausschließlich einzellig wachsen, nur sehr wenige TJ-Proteine exprimieren und solche, die im Zellverbund wachsen, viele verschiedene TJ-Proteine exprimieren. Zu diesen Zelllinien gehören u.a. die Zelllinien mit veränderter Morphologie nach längerer Kultivierung, denn diese Typ IV Zelllinien unterscheiden sich stark von den Typ IV Zelllinien MCCL-6 und MCCL-12, die ausschließlich als Einzelzellen wachsen. Ob die TJ-Proteine die Morphologie der Zellen beeinflussen oder ob die TJ-Proteinbildung durch die Morphologie anregt wird, muss in weiteren Versuchen, vor allem in den Zelllinien mit den veränderten Morphologien, noch untersucht werden.

5.3.2 Korrelation der TJ-Proteine mit Proliferation und Invasion

TJ-Proteine werden in vielen Tumoren nicht nur als Zellverbindungsproteine, sondern auch als Proteine, die die Zellproliferation, Invasion und Differenzierung beeinflussen, diskutiert (Matter et al. 2005). Da alle untersuchten TJ-Proteine, mit Ausnahme von JAM-A, welches in Merkelzellen noch nicht vollständig untersucht wurde, nicht von Merkelzellen gebildet werden, sind diese Proteine im MCC hochreguliert. Eine Korrelation zwischen erhöhter Cldn-Expression und Proliferation konnte bei den MCCL nicht beobachtet werden, obwohl solche Auswirkungen schon in vielen Tumoren beschrieben wurden: Beispielsweise wurde eine Überexpression dieses Proteins wurde beim ovarialen Adenokarzinoms gefunden. Cldn-5 ist bei diesem Tumor mit einer höheren Aggressivität und einer schlechteren Überlebensrate der Patienten assoziiert, was auf eine stärkere Proliferation der Tumorzellen schließen lässt.

Occludin ist in den meisten bisher untersuchten Tumoren herunter reguliert (Busch *et al.* 2002, Kimura *et al.* 1997, Morita *et al.* 2004, Tobioka *et al.* 2002). Die Herunterregulation scheint eine Folge der Tumorgenese zu sein. Der Zusammenhang zwischen der Herunterregulation von Occludin und der onkogenen Transformation wurde an Speicheldrüsen Epithelzellen gezeigt. Die Transfektion des onkogenen Raf-1 in diese Zellen führte zu einer verminderten Expression von Occludin (Li D. & Mrsny 2000). Gleichzeitig konnte in diversen Zelllinien von humanen Zervixkarzinomen, von murinen Melanomen, von murinen und humanen Mammakarzinomen und humanen Gliomen gezeigt werden, dass die verstärkte Expression von Occludin die Sensitivität gegenüber Faktoren, die die Apoptose induzieren, erhöht, wodurch die Invasivität, die Motilität und das metastatische Potential kanzerogener Zellen inhibiert werden (Osanaï *et al.* 2006). In kanzerogenen Geweben nimmt die Occludin-Expression mit fortschreitender Erkrankung ab (Busch *et al.* 2002, Kimura *et al.* 1997, Tobioka *et al.* 2004a). Diese Tatsachen könnten Occludin sogar zu einem Kandidat als Tumorsuppressorgen machen. Eine Hochregulation von Occludin wurde bisher in noch keinem Tumor beschrieben. Eindeutig ist aber die Hochregulation dieses Proteins in den MCCL. Allerdings konnte in dieser Arbeit keine veränderte Proliferation der Occludin positiven Zellen gegenüber den anderen Zelllinien beobachtet werden. Ob die Invasion durch die Occludin-Expression verändert ist, konnte aufgrund der nicht aussagekräftigen Invasionsexperimente nicht ermittelt werden.

Ist ZO-1 nicht an der Membran lokalisiert, kann es in Signalkaskaden, die die Zellmigration und -invasion beeinflussen, beteiligt sein. ZO-1 kann den Transkriptionsfaktor ZONAB, der normalerweise die Proliferation kontrolliert, binden und ihn somit inhibieren (Balda & Matter 2000, Balda *et al.* 2003), was zu einer gesteigerten Zellproliferation führen kann. Bei MCCL-6, MCCL-8, MCCL-11, MCCL-12 und MKL-1 ist ZO-1 nicht nur an den Zellgrenzen, sondern auch zytoplasmatisch lokalisiert. Die Proliferation wurde bei diesen MCCL nur bei MCCL-6 und MKL-1 untersucht. Diese Zelllinien zeigen aber keine vermehrte Proliferation im Vergleich zu den Zelllinien, bei denen ZO-1 ausschließlich an der Zellmembran lokalisiert ist. Die Beeinflussung der Proliferation durch ZO-1 und ZONAB scheint aber Zelllinien-abhängig zu sein, denn auch von anderen Zelllinien wurde berichtet, dass das Ausschalten von ZO-1 die Proliferation nicht beeinflusst (Umeda *et al.* 2004).

ZO-2 hat ebenfalls eine Funktion außerhalb der TJs. Es kann in proliferierenden Zellen in den Zellkern wandern und dort mit dem hnRNP Protein SAF-B interagieren und so die Transkriptionsfaktoren AP-1 und C/EBP inhibieren (Betanzos *et al.* 2004, Traweger *et al.* 2003). ZO-2 ist in einigen Adenokarzinomen herunter reguliert (Chlenski *et al.* 2000), möglicherweise weil sein Effekt auf die Transkription eine wichtige Rolle bei der Regulation der epithelialen Proliferation und Differenzierung ist. In den MCCL ist ZO-2 immer an den Zell-Zellgrenzen lokalisiert, was auf eine Funktion dieses Proteins an TJs oder AJs schließen lässt. Eine Korrelation der ZO-2 Expression und der Proliferation wurden in den MCCL nicht beobachtet.

5.3.3 Korrelation zwischen MCPyV-Infektion und TJ-Protein Expressionen

TJ-Transmembranproteine sind häufige Targets für Viren um in ihre Wirtszellen einzudringen. Beispielsweise zielen verschiedene Reoviren, wie das Coxsackie Virus B3 (CVB3), das humane Adenovirus Ad2/5 (Greber & Gastaldelli 2007) und das Hepatitis C Virus (HCV) (Evans *et al.* 2007, Liu *et al.* 2009, Ploss *et al.* 2009) auf diese Proteine ab. Für das HCV konnten die TJ-Proteine Cldn-1 und Occludin als essentielle Rezeptoren bzw. Corezeptoren für den Eintritt des Virus in die Zelle identifiziert werden (Evans *et al.* 2007, Liu *et al.* 2009). Da auch das MCC teilweise mit einem Virus infiziert ist, könnten TJ-Proteine auch für das MCPyV als Target für die Infektion dienen, denn der Mechanismus der Infektion von Zellen durch dieses Virus ist bisher noch nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte aber kein Zusammenhang zwischen der Expression von Cldn-1 und Occludin und auch nicht der anderen untersuchten TJ-Proteine und der Infektion mit dem MCPyV der Zellen festgestellt werden. Auch das kleine T-Antigen (ST-Antigen) könnte mit TJ-Proteinen in Verbindung stehen. Das ST-Antigen vom SV40-Virus interagiert mit der endogenen Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2A (PP2A) (Mungre *et al.* 1994, Sontag *et al.* 1993). In epithelialen Zellen rekrutiert die regulatorische $\beta\alpha$ -Untereinheit der Phosphatase PP2A zu den TJ-Komplexen, wo es die Dephosphorylierung von TJ-Proteinen wie ZO-1, Occludin und Cldn-1 induziert (Nunbhakdi-Craig *et al.* 2002). Nach Infektion mit dem SV40-Virus bildet das ST-Antigen mit den A- und C-Untereinheiten einen Komplex, die $\beta\alpha$ -Untereinheit wird dadurch

verdrängt (Pallas *et al.* 1992, Ruediger *et al.* 1992). In MDCK-Zellen führt das zu morphologischen Veränderungen und Mehrschichtigkeit, einem ungeordneten Zytoskelett und schweren Defekten in der Biogenese und Barrierefunktion der TJs. Die Bildung von AJs ist aber nicht gestört (Nunbhakdi-Craig *et al.* 2002). In den untersuchten MCCL gibt es aber bisher keine Korrelation zwischen der MCPyV Infektion und der Barrierefunktion der Zelllinien. Es sollte jedoch untersucht werden, welche Zelllinien das ST-Antigen exprimieren.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit neun Zelllinien klassifiziert und auf ihre Proliferation und die Infektion mit dem MCPyV untersucht und es wurde eine neue Einteilung der Zelllinien, basierend auf der Viruslast der Tumorzellen, vorgeschlagen. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MCCL typische TJ-Stränge formen und dass sie eine funktionelle TJ Barriere für niedermolekulare Moleküle bilden. Ähnlich wie in Tumorgewebe des MCC, werden die einzelnen TJ-Proteine in den Zelllinien sehr heterogen exprimiert. Diese *in vitro*-Ergebnisse lassen auch auf funktionelle TJs in Tumorgewebe von MCC schließen. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit N-Cadherin als mögliches Protein, das am Aufbau von TJs beteiligt ist identifiziert. Diese Funktion wurde bisher nur E- und P-Cadherin zugeschrieben.

Zusammenfassung

Das Merkelzellkarzinom (MCC) ist ein seltener, aber sehr aggressiver, neuroendokriner Tumor der Haut über dessen Ursprung und Pathogenese bisher noch sehr wenig bekannt ist. Das MCC zeichnet sich durch große Heterogenität aus. Dies und sein seltenes Auftreten gestalten die Erforschung des Tumors sehr schwierig. Deshalb ist die Verwendung von Zelllinien, insbesondere für funktionelle Studien, unerlässlich.

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur sehr wenige Merkelzellkarzinom-Zelllinien (MCCL) beschrieben. Deshalb wurden im ersten Teil dieser Arbeit neun MCCL charakterisiert. Die Charakterisierung der sehr heterogenen Zelllinien erfolgte anhand der bereits bestehenden Klassifikationskriterien für MCCL, sowie ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und der Infektion der Zellen mit dem Merkelzellpolyomavirus (MCPyV). Dieses Virus wurde erst im Jahre 2008 entdeckt und kommt in ca. 80% aller MCC vor. Inwieweit es für die Pathogenese des Tumors verantwortlich ist, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Bei allen Versuchen wurde die bereits charakterisierte Zelllinie MKL-1 als Kontrolle verwendet. MCCL werden über den Nachweis neuroendokriner Granula in klassische und variante Zelllinien unterteilt, wobei in klassischen MCCL Granula nachweisbar sind und in varianten nicht. Von den neun untersuchten MCCL sind sieben klassisch, nur eine variant und eine konnte nicht eindeutig einer Klasse zugeordnet werden. Des Weiteren kann man die Zelllinien anhand von morphologischen Merkmalen in 4 Subtypen unterteilen. Vier der neun untersuchten Zelllinien gehören zu den Typ I MCCL, die in Kultur dichte dreidimensionale Sphäroide bilden. Zwei MCCL gehören zum Subtyp II und bilden lockerere dreidimensionale Sphäroide. Eine Zelllinie bildet zweidimensionale Zellaggregate und gehört deshalb zum Typ III der MCCL. Zwei der Zelllinien wachsen einzellig und werden als Typ IV MCCL bezeichnet. Die DNA des MCPyV tragen sieben der neun untersuchten MCCL, aber die Kopien der viralen DNA pro Zelle zwischen den einzelnen Linien variieren stark. Im Gegensatz dazu kann das große T-Antigen (LT-Antigen) des MCPyV im Westernblot nur in drei der sieben Virus-positiven MCCL detektiert werden. Wieso es nicht von allen Zellen gebildet wird oder warum es nicht detektiert werden kann ist bisher noch unklar. Entgegen der Veröffentlichung einer Studie, in der behauptet wurde klassische MCCL seien MCPyV-positiv und variante MCPyV-negativ, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Klassifizierung nicht mit der MCPyV-Infektion korreliert. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt dass sich der Subtyp der einzelnen MCCL verändern kann, weshalb eine Einteilung der Zelllinien anhand dieses Kriteriums nicht geeignet ist. Stattdessen könnte die Einteilung der MCCL anhand der MCPyV-Infektion erfolgen. Die Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen den einzelnen MCCL

unterscheiden sich sehr deutlich, es gibt jedoch keine direkte Korrelation zwischen den Wachstumsgeschwindigkeiten und dem Subtyp, der MCPyV-Infektion oder der LT-Antigen Expression der Zelllinien.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die nun charakterisierten MCCL auf die Expression von TJ-Proteinen untersucht. TJ-Proteine wurden bereits in vielen Tumoren beschrieben und sind häufig Reste funktioneller TJs vom Ursprungsgewebe des Tumors. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal *in vitro* gezeigt, dass auch Tumorzellen, deren Ursprungszellen keine TJs bilden, TJ-Proteine exprimieren, durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie identifizierbare typische TJ-Strukturen ausbilden und eine funktionelle parazelluläre Permeabilitäts-Barriere aufweisen. Dies konnte anhand von Tracer-Experimenten gezeigt werden, bei denen eine parazelluläre Barrierefunktion gegen ein 557 Da-Molekül in den Sphäroiden der Typ I MCCL nachgewiesen wurde. Durch Vorbehandlung der Sphäroide mit EDTA, welches das für den Aufbau von TJs essentielle Ca^{2+} komplexiert, wird diese Barriere aufgehoben, kann aber durch erneute Zugabe von Ca^{2+} wieder hergestellt werden. Im Gegensatz zu den TJ-assoziierten Proteinen ZO-1 und ZO-2 sowie dem Transmembranprotein JAM-A, die in allen MCCL gefunden werden konnten, werden die die Claudine und Occludin sehr heterogen von den MCCL gebildet. Dabei scheint das Muster der TJ-Proteine die Dichte der TJ-Stränge zu beeinflussen. Welches der TJ-Proteine für die Barriere gegenüber dem 557 Da *Tracer* verantwortlich ist, ist bisher noch unbekannt. Cldn-4 konnte aber mit Hilfe von CPE-Modulation dieses Proteins als essentielles Protein für die Barrierebildung ausgeschlossen werden.

Auch Adhärenzverbindungen (AJ) werden zwischen den Zellen der MCCL gebildet. Dabei wurde N-Cadherin als einziges Cadherin in allen MCCL gefunden. Im Gegensatz dazu sind alle Zelllinien E-Cadherin negativ, P-Cadherin wird nur von einigen Zelllinien exprimiert. Da funktionelle TJs auch in E- und P-Cadherin negativen MCCL gefunden werden konnten und Cadherine für die initiale TJ-Bildung notwendig sind, könnte N-Cadherin den Aufbau der TJs vermitteln.

Es konnte in dieser Arbeit somit gezeigt werden, dass nicht nur das MCC, sondern auch Zelllinien dieses Tumors sehr heterogen sind. Diese Heterogenität betrifft auch die Expression von TJ-Proteinen. In MCCL-Sphäroiden bilden diese Proteine eine funktionelle, Calcium abhängige, Barriere. Die Bildung von TJs in MCC Tumoren könnte in Zukunft ein wichtiger Ansatzpunkt bei der Therapie dieses Tumors sein, denn durch die Barrierebildung sind möglicherweise Teile des Tumors für Therapeutika unerreichbar.

Literaturverzeichnis

Aberle H, Schwartz H, Kemler R. 1996. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 61: 514-523.

Ahsan N, Shah KV. 2006. Polyomaviruses and human diseases. *Adv Exp Med Biol* 577: 1-18.

Aijaz S, Balda MS, Matter K. 2006. Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol* 248: 261-298.

Anderson JM. 2001. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci* 16: 126-130.

Arrate MP, Rodriguez JM, Tran TM, Brock TA, Cunningham SA. 2001. Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. *J Biol Chem* 276: 45826-45832.

Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA. 2001. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276: 2733-2741.

Balda MS, Anderson JM. 1993. Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *Am J Physiol* 264: C918-924.

Balda MS, Matter K. 2000. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J* 19: 2024-2033.

Balda MS, Garrett MD, Matter K. 2003. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160: 423-432.

Bates RC, Buret A, van Helden DF, Horton MA, Burns GF. 1994. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol* 125: 403-415.

Bazzoni G. 2003. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15: 525-530.

Becker J, Mauch C, Kortmann RD, Keilholz U, Bootz F, Garbe C, Hauschild A, Moll I. 2008. Short German guidelines: Merkel cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges* 6 Suppl 1: S15-16.

Becker JC, Schrama D, Houben R. 2009a. Merkel cell carcinoma. *Cell Mol Life Sci* 66: 1-8.

Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pfohler C, Schrama D. 2009b. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol* 129: 248-250.

Becker S. 2007. Merkel cell carcinoma: a rare, aggressive cancer of the skin. *Jaapa* 20: 18, 21-13.

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

- Bertolotti R, Rutishauser U, Edelman GM.** 1980. A cell surface molecule involved in aggregation of embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 4831-4835.
- Berx G, Van Roy F.** 2001. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 3: 289-293.
- Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Azuara E, Amerena J, Gonzalez-Mariscal L.** 2004. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res* 292: 51-66.
- Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, Preiss L, Ayers LW.** 2010. Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. *Int J Cancer* 126: 2240-2246.
- Bichakjian CK, Lowe L, Lao CD, Sandler HM, Bradford CR, Johnson TM, Wong SL.** 2007. Merkel cell carcinoma: critical review with guidelines for multidisciplinary management. *Cancer* 110: 1-12.
- Birchmeier W, Behrens J.** 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198: 11-26.
- Bordea C, Wojnarowska F, Millard PR, Doll H, Welsh K, Morris PJ.** 2004. Skin cancers in renal-transplant recipients occur more frequently than previously recognized in a temperate climate. *Transplantation* 77: 574-579.
- Boulais N, Misery L.** 2007. Merkel cells. *J Am Acad Dermatol* 57: 147-165.
- Boyle F, Pendlebury S, Bell D.** 1995. Further insights into the natural history and management of primary cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 315-323.
- Broers JL, Carney DN, de Ley L, Vooijs GP, Ramaekers FC.** 1985. Differential expression of intermediate filament proteins distinguishes classic from variant small-cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4409-4413.
- Buell JF, Trofe J, Hanaway MJ, Beebe TM, Gross TG, Alloway RR, First MR, Woodle ES.** 2002. Immunosuppression and Merkel cell cancer. *Transplant Proc* 34: 1780-1781.
- Burlone ME, Budkowska A.** 2009. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 90: 1055-1070.
- Busch C, Hanssen TA, Wagener C, B OB.** 2002. Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Hum Pathol* 33: 290-298.
- Caracciolo V, Reiss K, Khalili K, De Falco G, Giordano A.** 2006. Role of the interaction between large T antigen and Rb family members in the oncogenicity of JC virus. *Oncogene* 25: 5294-5301.
- Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW, Zweig MH, Minna JD.** 1985. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res* 45: 2913-2923.
- Cerroni L, Kerl H.** 1997. Primary cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma in association with squamous- and basal-cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 19: 610-613.

- Chen X, Macara IG.** 2005. Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat Cell Biol* 7: 262-269.
- Chlenski A, Ketels KV, Korovaitseva GI, Talamonti MS, Oyasu R, Scarpelli DG.** 2000. Organization and expression of the human zo-2 gene (tjp-2) in normal and neoplastic tissues. *Biochim Biophys Acta* 1493: 319-324.
- Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J.** 1988. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* 333: 272-276.
- Cunningham SA, Arrate MP, Rodriguez JM, Bjercke RJ, Vanderslice P, Morris AP, Brock TA.** 2000. A novel protein with homology to the junctional adhesion molecule. Characterization of leukocyte interactions. *J Biol Chem* 275: 34750-34756.
- Cunningham SC, et al.** 2006. Claudin-4, mitogen-activated protein kinase kinase 4, and stratifin are markers of gastric adenocarcinoma precursor lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 281-287.
- de Oliveira SS, de Oliveira IM, De Souza W, Morgado-Diaz JA.** 2005. Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett* 579: 6179-6185.
- Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK, Beauchamp RD.** 2005. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 115: 1765-1776.
- Durand RE, Sutherland RM.** 1972. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Exp Cell Res* 71: 75-80.
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S, Vestweber D.** 2001. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J* 20: 3738-3748.
- Eispert AC, Fuchs F, Brandner JM, Houdek P, Wladykowski E, Moll I.** 2009. Evidence for distinct populations of human Merkel cells. *Histochem Cell Biol* 132: 83-93.
- Engels EA, Frisch M, Goedert JJ, Biggar RJ, Miller RW.** 2002. Merkel cell carcinoma and HIV infection. *Lancet* 359: 497-498.
- English KB, Hammond EH, Stayner N.** 1990. Primary culture of cells arising from a neuroendocrine skin carcinoma. *Am J Dermatopathol* 12: 589-597.
- Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM.** 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801-805.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM.** 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273: 29745-29753.
- Fantini F, Johansson O.** 1995. Neurochemical markers in human cutaneous Merkel cells. An immunohistochemical investigation. *Exp Dermatol* 4: 365-371.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319: 1096-1100.

Feun LG, Savaraj N, Legha SS, Silva EG, Benjamin RS, Burgess MA. 1988. Chemotherapy for metastatic Merkel cell carcinoma. Review of the M.D. Anderson Hospital's experience. *Cancer* 62: 683-685.

Fischer N, Brandner J, Fuchs F, Moll I, Grundhoff A. 2010. Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus. *Int J Cancer* 126: 2133-2142.

Foulongne V, Kluger N, Dereure O, Brieu N, Guillot B, Segondy M. 2008. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France. *Emerg Infect Dis* 14: 1491-1493.

Fradette J, Larouche D, Fugere C, Guignard R, Beauparlant A, Couture V, Caouette-Laberge L, Roy A, Germain L. 2003. Normal human Merkel cells are present in epidermal cell populations isolated and cultured from glabrous and hairy skin sites. *J Invest Dermatol* 120: 313-317.

Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S. 2000. Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett* 476: 258-261.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141: 1539-1550.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-1788.

Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156: 1099-1111.

Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, Nghiem P. 2009. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol* 129: 246-248.

Gazdar AF, Carney DN, Nau MM, Minna JD. 1985a. Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res* 45: 2924-2930.

Gazdar AF, Carney DN, Becker KL, Deftos LJ, Liang V, Go W, Marangos PJ, Moody TW, Wolfsen AR, Zweig MH. 1985b. Expression of peptide and other markers in lung cancer cell lines. *Recent Results Cancer Res* 99: 167-174.

Giepmans BN, Moolenaar WH. 1998. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr Biol* 8: 931-934.

Glimelius B, Norling B, Nederman T, Carlsson J. 1988. Extracellular matrices in multicellular spheroids of human glioma origin: increased incorporation of proteoglycans and fibronectin as compared to monolayer cultures. *APMIS* 96: 433-444.

- Gollard R, Weber R, Kosty MP, Greenway HT, Massullo V, Humberson C.** 2000. Merkel cell carcinoma: review of 22 cases with surgical, pathologic, and therapeutic considerations. *Cancer* 88: 1842-1851.
- Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S, Garay E.** 2007. Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog Histochem Cytochem* 42: 1-57.
- Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D.** 1996. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10779-10784.
- Graham CH, Kobayashi H, Stankiewicz KS, Man S, Kapitan SJ, Kerbel RS.** 1994. Rapid acquisition of multicellular drug resistance after a single exposure of mammary tumor cells to antitumor alkylating agents. *J Natl Cancer Inst* 86: 975-982.
- Greber UF, Gastaldelli M.** 2007. Junctional gating: the achilles' heel of epithelial cells in pathogen infection. *Cell Host Microbe* 2: 143-146.
- Gu J, Polak JM, Tapia FJ, Marangos PJ, Pearse AG.** 1981. Neuron-specific enolase in the Merkel cells of mammalian skin. The use of specific antibody as a simple and reliable histologic marker. *Am J Pathol* 104: 63-68.
- Haag ML, Glass LF, Fenske NA.** 1995. Merkel cell carcinoma. Diagnosis and treatment. *Dermatol Surg* 21: 669-683.
- Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M.** 2005a. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 18: 150-159.
- Haass NK, Houdek P, Wladykowski E, Moll I, Brandner JM.** 2005b. Expression Patterns of Tight Junction Proteins in Merkel Cell Carcinoma in Bauman KI, Halata Z, Moll I, eds. *The Merkel Cell*.
- Haeberle H, Fujiwara M, Chuang J, Medina MM, Panditrao MV, Bechstedt S, Howard J, Lumpkin EA.** 2004. Molecular profiling reveals synaptic release machinery in Merkel cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14503-14508.
- Haegerstrand A, Jonzon B, Dalsgaard CJ, Nilsson J.** 1989. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5993-5996.
- Halata Z, Grim M, Bauman KI.** 2003. Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 271: 225-239.
- Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S.** 2002. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277: 455-461.
- Han AC, Soler AP, Tang CK, Knudsen KA, Salazar H.** 2000. Nuclear localization of E-cadherin expression in Merkel cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 124: 1147-1151.

- Handschuh G, et al.** 1999. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18: 4301-4312.
- Hartschuh W, Weihe E, Yanaihara N, Reinecke M.** 1983. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the Merkel cell. *J Invest Dermatol* 81: 361-364.
- Hewitt JB, Sherif A, Kerr KM, Stankler L.** 1993. Merkel cell and squamous cell carcinomas arising in erythema ab igne. *Br J Dermatol* 128: 591-592.
- Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ.** 2006. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 6: 186.
- Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM.** 2001. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by Rho-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 276: 10423-10431.
- Hitchcock CL, Bland KI, Laney RG, 3rd, Franzini D, Harris B, Copeland EM, 3rd.** 1988. Neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin. Its natural history, diagnosis, and treatment. *Ann Surg* 207: 201-207.
- Hoefler H, Kerl H, Rauch HJ, Denk H.** 1984. New immunocytochemical observations with diagnostic significance in cutaneous neuroendocrine carcinoma. *Am J Dermatopathol* 6: 525-530.
- Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ.** 1998. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol* 153: 1767-1773.
- Houben R, Schrama D, Alb M, Pfohler C, Trefzer U, Ugurel S, Becker JC.** 2010a. Comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus-positive and negative Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* 126: 796-798.
- Houben R, Shuda M, Weinkam R, Schrama D, Feng H, Chang Y, Moore PS, Becker JC.** 2010b. Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol* 84: 7064-7072.
- Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M.** 1996. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1: 188-194.
- Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M.** 2000. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 156: 1515-1525.
- Hunter AW, Gourdie RG.** 2008. The second PDZ domain of zonula occludens-1 is dispensable for targeting to connexin 43 gap junctions. *Cell Commun Adhes* 15: 55-63.
- Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B.** 2003. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5: 137-142.
- Iacobuzio-Donahue CA, et al.** 2002. Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. *Am J Pathol* 160: 1239-1249.

- Iacocca MV, Abernethy JL, Stefanato CM, Allan AE, Bhawan J.** 1998. Mixed Merkel cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. *J Am Acad Dermatol* 39: 882-887.
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S.** 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171: 939-945.
- Islas S, Vega J, Ponce L, Gonzalez-Mariscal L.** 2002. Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res* 274: 138-148.
- Itoh M, Morita K, Tsukita S.** 1999. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* 274: 5981-5986.
- Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S.** 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138: 181-192.
- Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, Hirai S, Nagashima Y, Fujimoto T, Tabuse Y, Kempfues KJ, Ohno S.** 1998. An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J Cell Biol* 143: 95-106.
- Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG.** 2000. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2: 531-539.
- Jung E.** 1995. *Dermatologie - Duale Reihe* (3. Auflage). Hippokrates Verlag Stuttgart.
- Kaihara T, et al.** 2003. Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 22: 117-123.
- Kanitakis J, Joly MO, Chouvet B, Euvrard S, Claudy A.** 2006a. Merkel cell carcinoma in immunocompetent and organ-transplant recipients do not harbor HPV. *Eur J Dermatol* 16: 445-446.
- Kanitakis J, Euvrard S, Chouvet B, Butnaru AC, Claudy A.** 2006b. Merkel cell carcinoma in organ-transplant recipients: report of two cases with unusual histological features and literature review. *J Cutan Pathol* 33: 686-694.
- Kassem A, Schopflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M, Zur Hausen A.** 2008. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res* 68: 5009-5013.
- Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N.** 1997. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Cell Biol* 136: 1239-1247.
- Kerjaschki D, Krisch K, Sleyter UB, Umrath W, Jakesz R, Depisch D, Kokoschka R, Horandner H.** 1979. The structure of tight junctions in human thyroid tumors. A systematic freeze-fracture study. *Am J Pathol* 96: 207-226.
- Kimura Y, et al.** 1997. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *Am J Pathol* 151: 45-54.

- Kinkel** I, **Stucky CL**, **Koltzenburg M**. 1999. Postnatal loss of Merkel cells, but not of slowly adapting mechanoreceptors in mice lacking the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* 11: 3963-3969.
- Kirschner N**, **Houdek P**, **Fromm M**, **Moll I**, **Brandner JM**. 2010. Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol*.
- Kleeff J**, **Shi X**, **Bode HP**, **Hoover K**, **Shrikhande S**, **Bryant PJ**, **Korc M**, **Buchler MW**, **Friess H**. 2001. Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer. *Pancreas* 23: 259-265.
- Koch PJ**, **Franke WW**. 1994. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 6: 682-687.
- Kominsky SL**, **Vali M**, **Korz D**, **Gabig TG**, **Weitzman SA**, **Argani P**, **Sukumar S**. 2004. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 164: 1627-1633.
- Kondoh M**, **Yagi K**. 2007. Tight junction modulators: promising candidates for drug delivery. *Curr Med Chem* 14: 2482-2488.
- Kondoh M**, **Takahashi A**, **Fujii M**, **Yagi K**, **Watanabe Y**. 2006. A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator. *Biol Pharm Bull* 29: 1783-1789.
- Kondoh M**, **Masuyama A**, **Takahashi A**, **Asano N**, **Mizuguchi H**, **Koizumi N**, **Fujii M**, **Hayakawa T**, **Horiguchi Y**, **Watanabe Y**. 2005. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol Pharmacol* 67: 749-756.
- Kramer F**, **White K**, **Kubbies M**, **Swisshelm K**, **Weber BH**. 2000. Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum Genet* 107: 249-256.
- Kurokawa M**, **Nabeshima K**, **Akiyama Y**, **Maeda S**, **Nishida T**, **Nakayama F**, **Amano M**, **Ogata K**, **Setoyama M**. 2003. CD56: a useful marker for diagnosing Merkel cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 31: 219-224.
- Lacour JP**, **Dubois D**, **Pisani A**, **Ortonne JP**. 1991. Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis. *Br J Dermatol* 125: 535-542.
- Laemmli UK**. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Langbein L**, **Pape UF**, **Grund C**, **Kuhn C**, **Praetzel S**, **Moll I**, **Moll R**, **Franke WW**. 2003. Tight junction-related structures in the absence of a lumen: occludin, claudins and tight junction plaque proteins in densely packed cell formations of stratified epithelia and squamous cell carcinomas. *Eur J Cell Biol* 82: 385-400.
- Lanigan F, et al.** 2009. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer* 124: 2088-2097.
- Leech SN**, **Kolar AJ**, **Barrett PD**, **Sinclair SA**, **Leonard N**. 2001. Merkel cell carcinoma can be distinguished from metastatic small cell carcinoma using antibodies to cytokeratin 20 and thyroid transcription factor 1. *J Clin Pathol* 54: 727-729.

- Lemmers C, Michel D, Lane-Guermonprez L, Delgrossi MH, Medina E, Arsanto JP, Le Bivic A.** 2004. CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* 15: 1324-1333.
- Leonard JH, Bell JR, Kearsley JH.** 1993. Characterization of cell lines established from Merkel-cell ("small-cell") carcinoma of the skin. *Int J Cancer* 55: 803-810.
- Leonard JH, Dash P, Holland P, Kearsley JH, Bell JR.** 1995. Characterisation of four Merkel cell carcinoma adherent cell lines. *Int J Cancer* 60: 100-107.
- Li D, Mrsny RJ.** 2000. Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. *J Cell Biol* 148: 791-800.
- Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M.** 2001. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 61: 3819-3825.
- Liang TW, et al.** 2000. Characterization of huJAM: evidence for involvement in cell-cell contact and tight junction regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1733-1743.
- Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T.** 2009. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83: 2011-2014.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lodish B, Matsudaira, Kaiser, Kieger, Scott, Zipursky, Darnell.** 2003. *Molecular Cell Biology*.
- Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG.** 2001. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res* 61: 7878-7881.
- Macara IG.** 2004. Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 220-231.
- Maricich SM, Wellnitz SA, Nelson AM, Lesniak DR, Gerling GJ, Lumpkin EA, Zoghbi HY.** 2009. Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science* 324: 1580-1582.
- Martin-Padura I, et al.** 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142: 117-127.
- Matter K, Balda MS.** 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 225-236.
- Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS.** 2005. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17: 453-458.
- McClane BA, Hanna PC, Wnek AP.** 1988. Clostridium perfringens enterotoxin. *Microb Pathog* 4: 317-323.
- Mertens AE, Pegtel DM, Collard JG.** 2006. Tiam1 takes PART in cell polarity. *Trends Cell Biol* 16: 308-316.

- Messina JL, Reintgen DS, Cruse CW, Rappaport DP, Berman C, Fenske NA, Glass LF.** 1997. Selective lymphadenectomy in patients with Merkel cell (cutaneous neuroendocrine) carcinoma. *Ann Surg Oncol* 4: 389-395.
- Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM.** 2001. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology* 121: 678-684.
- Michl P, et al.** 2003. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res* 63: 6265-6271.
- Miller RW, Rabkin CS.** 1999. Merkel cell carcinoma and melanoma: etiological similarities and differences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 153-158.
- Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y.** 2001. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 12: 469-476.
- Miyamori H, Takino T, Kobayashi Y, Tokai H, Itoh Y, Seiki M, Sato H.** 2001. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 276: 28204-28211.
- Moens U, Van Ghelue M, Johannessen M.** 2007. Oncogenic potentials of the human polyomavirus regulatory proteins. *Cell Mol Life Sci* 64: 1656-1678.
- Moll I, Bladt U, Jung EG.** 1990. Presence of Merkel cells in sun-exposed and not sun-exposed skin: a quantitative study. *Arch Dermatol Res* 282: 213-216.
- Moll I, Kuhn C, Moll R.** 1995. Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol* 104: 910-915.
- Moll I, Paus R, Moll R.** 1996. Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density. *J Invest Dermatol* 106: 281-286.
- Moll I, Bohnert E, Herbst C, Forster W, Moll R, Franke WW.** 1994. Establishment and characterization of two Merkel cell tumor cultures. *J Invest Dermatol* 102: 346-353.
- Moll I, Roessler M, Brandner JM, Eispert AC, Houdek P, Moll R.** 2005. Human Merkel cells--aspects of cell biology, distribution and functions. *Eur J Cell Biol* 84: 259-271.
- Moll R, Moll I, Franke WW.** 1984. Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. *Differentiation* 28: 136-154.
- Montgomery E, et al.** 2006. Overexpression of claudin proteins in esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14: 24-30.
- Morita K, Tsukita S, Miyachi Y.** 2004. Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *Br J Dermatol* 151: 328-334.

- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S.** 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 511-516.
- Morita K, Morita NI, Nemoto K, Nakamura Y, Miyachi Y, Muto M.** 2008. Expression of claudin in melanoma cells. *J Dermatol* 35: 36-38.
- Mungre S, Enderle K, Turk B, Porras A, Wu YQ, Mumby MC, Rundell K.** 1994. Mutations which affect the inhibition of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen in vitro decrease viral transformation. *J Virol* 68: 1675-1681.
- Nakafusa J, Narisawa Y, Shinogi T, Taira K, Tanaka T, Inoue T, Misago N.** 2006. Changes in the number of Merkel cells with the hair cycle in hair discs on rat back skin. *Br J Dermatol* 155: 883-889.
- Nakamura T, Yamada M, Teshima M, Nakashima M, To H, Ichikawa N, Sasaki H.** 2007. Electrophysiological characterization of tight junctional pathway of rabbit cornea treated with ophthalmic ingredients. *Biol Pharm Bull* 30: 2360-2364.
- Niessen CM.** 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127: 2525-2532.
- Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ.** 1985. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315: 61-63.
- Nunbhakdi-Craig V, Machleidt T, Ogris E, Bellotto D, White CL, 3rd, Sontag E.** 2002. Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol* 158: 967-978.
- Ohno S.** 2001. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13: 641-648.
- Osanai M, Murata M, Nishikiori N, Chiba H, Kojima T, Sawada N.** 2006. Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. *Cancer Res* 66: 9125-9133.
- Pallas DC, Weller W, Jaspers S, Miller TB, Lane WS, Roberts TM.** 1992. The third subunit of protein phosphatase 2A (PP2A), a 55-kilodalton protein which is apparently substituted for by T antigens in complexes with the 36- and 63-kilodalton PP2A subunits, bears little resemblance to T antigens. *J Virol* 66: 886-893.
- Paris L, Tonutti L, Vannini C, Bazzoni G.** 2008. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1778: 646-659.
- Paul R, Ewing CM, Jarrard DF, Isaacs WB.** 1997. The cadherin cell-cell adhesion pathway in prostate cancer progression. *Br J Urol* 79 Suppl 1: 37-43.
- Pectasides D, Pectasides M, Economopoulos T.** 2006. Merkel cell cancer of the skin. *Ann Oncol* 17: 1489-1495.
- Penn I, First MR.** 1999. Merkel's cell carcinoma in organ recipients: report of 41 cases. *Transplantation* 68: 1717-1721.

- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM.** 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457: 882-886.
- Polette M, Gilles C, Nawrocki-Raby B, Lohi J, Hunziker W, Foidart JM, Birembaut P.** 2005. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 65: 7691-7698.
- Popp S, Waltering S, Herbst C, Moll I, Boukamp P.** 2002. UV-B-type mutations and chromosomal imbalances indicate common pathways for the development of Merkel and skin squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 99: 352-360.
- Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK.** 2001. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 276: 24661-24666.
- Powell DW.** 1981. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 241: G275-288.
- Qin Y, Capaldo C, Gumbiner BM, Macara IG.** 2005. The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol* 171: 1061-1071.
- Raaf JH, Urmacher C, Knapper WK, Shiu MH, Cheng EW.** 1986. Trabecular (Merkel cell) carcinoma of the skin. Treatment of primary, recurrent, and metastatic disease. *Cancer* 57: 178-182.
- Reinisch CM, Tschachler E.** 2005. The touch dome in human skin is supplied by different types of nerve fibers. *Ann Neurol* 58: 88-95.
- Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, Konkin T, Bhattacharya B, Britt DE, Sabo E, Moss SF.** 2005. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum Pathol* 36: 886-892.
- Roh MH, Margolis B.** 2003. Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F377-387.
- Roh MH, Fan S, Liu CJ, Margolis B.** 2003. The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci* 116: 2895-2906.
- Rosen ST, et al.** 1987. Establishment and characterization of a neuroendocrine skin carcinoma cell line. *Lab Invest* 56: 302-312.
- Ruediger R, Roeckel D, Fait J, Bergqvist A, Magnusson G, Walter G.** 1992. Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol Cell Biol* 12: 4872-4882.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S.** 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11: 4131-4142.
- Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR, Jankowski J.** 1999. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol* 52: 151-157.

- Santin AD, Cane S, Bellone S, Palmieri M, Siegel ER, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Cannon MJ, Pecorelli S.** 2005. Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of Clostridium perfringens enterotoxin. *Cancer Res* 65: 4334-4342.
- Saurat JH, Didierjean L, Skalli O, Siegenthaler G, Gabbiani G.** 1984. The intermediate filament proteins of rabbit normal epidermal Merkel cells are cytokeratins. *J Invest Dermatol* 83: 431-435.
- Schmidt U, Muller U, Metz KA, Leder LD.** 1998. Cytokeratin and neurofilament protein staining in Merkel cell carcinoma of the small cell type and small cell carcinoma of the lung. *Am J Dermatopathol* 20: 346-351.
- Schneeberger EE, Lynch RD.** 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1213-1228.
- Segre JA.** 2006. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest* 116: 1150-1158.
- Shah IA, Netto D, Schlageter MO, Muth C, Fox I, Manne RK.** 1993. Neurofilament immunoreactivity in Merkel-cell tumors: a differentiating feature from small-cell carcinoma. *Mod Pathol* 6: 3-9.
- Shea CR PV. Merkel cell carcinoma.: eMedicine.
- Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O.** 1989. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 49: 2128-2133.
- Shin K, Fogg VC, Margolis B.** 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 207-235.
- Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, Chang Y.** 2008. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16272-16277.
- Sibley RK, Dahl D.** 1985. Primary neuroendocrine (Merkel cell?) carcinoma of the skin. II. An immunocytochemical study of 21 cases. *Am J Surg Pathol* 9: 109-116.
- Sidhu GS, Chandra P, Cassai ND.** 2005. Merkel cells, normal and neoplastic: an update. *Ultrastruct Pathol* 29: 287-294.
- Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Bohling T, Joensuu H.** 2009. Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101: 938-945.
- Silva EG, Mackay B, Goepfert H, Burgess MA, Fields RS.** 1984. Endocrine carcinoma of the skin (Merkel cell carcinoma). *Pathol Annu* 19 Pt 2: 1-30.
- Silye R, et al.** 1998. E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 186: 350-355.
- Singh AB, Sharma A, Dhawan P.** 2010. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol* 2010: 541957.

- Skelton HG, Smith KJ, Hitchcock CL, McCarthy WF, Lupton GP, Graham JH.** 1997. Merkel cell carcinoma: analysis of clinical, histologic, and immunohistologic features of 132 cases with relation to survival. *J Am Acad Dermatol* 37: 734-739.
- Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M.** 2005. Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol* 166: 1541-1554.
- Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM.** 1999. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* 20: 1425-1431.
- Soltau JB, Smith ME, Custer PL.** 1996. Merkel cell carcinoma of the eyelid. *Am J Ophthalmol* 121: 331-332.
- Sommers CL, Heckford SE, Skerker JM, Worland P, Torri JA, Thompson EW, Byers SW, Gelmann EP.** 1992. Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 52: 5190-5197.
- Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S.** 1999. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 147: 195-204.
- Sontag E, Fedorov S, Kamibayashi C, Robbins D, Cobb M, Mumby M.** 1993. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 75: 887-897.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA.** 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103: 755-766.
- Su LD, Fullen DR, Lowe L, Uherova P, Schnitzer B, Valdez R.** 2002a. CD117 (KIT receptor) expression in Merkel cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 24: 289-293.
- Su LD, Lowe L, Bradford CR, Yahanda AI, Johnson TM, Sondak VK.** 2002b. Immunostaining for cytokeratin 20 improves detection of micrometastatic Merkel cell carcinoma in sentinel lymph nodes. *J Am Acad Dermatol* 46: 661-666.
- Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K, Ohno S.** 2002. aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *J Cell Sci* 115: 3565-3573.
- Swift JG, Mukherjee TM, Rowland R.** 1983. Intercellular junctions in hepatocellular carcinoma. *J Submicrosc Cytol* 15: 799-810.
- Tachibana T.** 1995. The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* 58: 379-396.
- Tachibana T, Nawa T.** 2002. Recent progress in studies on Merkel cell biology. *Anat Sci Int* 77: 26-33.

- Tachibana T, Yamamoto H, Takahashi N, Kamegai T, Shibanaï S, Iseki H, Nawa T.** 1997. Polymorphism of Merkel cells in the rodent palatine mucosa: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Arch Histol Cytol* 60: 379-389.
- Takeichi M.** 1993. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5: 806-811.
- . 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7: 619-627.
- Tanaka Y, Sano T, Qian ZR, Hirokawa M.** 2004. Expression of adhesion molecules and cytokeratin 20 in merkel cell carcinomas. *Endocr Pathol* 15: 117-129.
- Tang CK, Toker C.** 1978. Trabecular carcinoma of the skin: an ultrastructural study. *Cancer* 42: 2311-2321.
- Tang VW, Goodenough DA.** 2003. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J* 84: 1660-1673.
- Tinkle CL, Pasolli HA, Stokes N, Fuchs E.** 2008. New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15405-15410.
- Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, Sawada N.** 2002. Polarized distribution of carcinoembryonic antigen is associated with a tight junction molecule in human colorectal adenocarcinoma. *J Pathol* 198: 207-212.
- Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, Tokunaga Y, Yamaguchi J, Sawada N.** 2004a. Occludin expression decreases with the progression of human endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 35: 159-164.
- Tobioka H, Tokunaga Y, Isomura H, Kokai Y, Yamaguchi J, Sawada N.** 2004b. Expression of occludin, a tight-junction-associated protein, in human lung carcinomas. *Virchows Arch* 445: 472-476.
- Toker C.** 1972. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 105: 107-110.
- Traweger A, Fuchs R, Krizbai IA, Weiger TM, Bauer HC, Bauer H.** 2003. The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem* 278: 2692-2700.
- Tsukita S, Furuse M.** 2000a. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149: 13-16.
- . 2000b. The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 915: 129-135.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M.** 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 285-293.
- Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Gunzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM.** 2005. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J* 24: 1146-1156.

- Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S.** 2004. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* 279: 44785-44794.
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M.** 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126: 741-754.
- Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM.** 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107: 1319-1327.
- Veness MJ.** 2006. Merkel cell carcinoma (primary cutaneous neuroendocrine carcinoma): an overview on management. *Australas J Dermatol* 47: 160-165.
- Vlemminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F.** 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66: 107-119.
- von Hoyningen-Huene V, Kurth M, Deppert W.** 1992. Selection against large T-antigen expression in cells transformed by lymphotropic papova virus. *Virology* 190: 155-167.
- Wang Z, Mandell KJ, Parkos CA, Mrsny RJ, Nusrat A.** 2005. The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene* 24: 4412-4420.
- Warner TF, Uno H, Hafez GR, Burgess J, Bolles C, Lloyd RV, Oka M.** 1983. Merkel cells and Merkel cell tumors. Ultrastructure, immunocytochemistry and review of the literature. *Cancer* 52: 238-245.
- Weisser H, Hartschuh W, Greiner A, Bischof M, Enk A, Helmbold P.** 2007. [Merkel cell carcinoma--clinically often misjudged]. *Dtsch Med Wochenschr* 132: 1581-1586.
- Werling AM, Doerflinger Y, Brandner JM, Fuchs F, Becker JC, Schrama D, Kurzen H, Goerdts S, Peitsch WK.** 2011. Homo- and heterotypic cell-cell contacts in Merkel cells and Merkel cell carcinomas: heterogeneity and indications for cadherin switching. *Histopathology* 58: 286-303.
- Wong V, Gumbiner BM.** 1997. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 136: 399-409.
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T, Iwamatsu A, Shinohara A, Ohno S.** 2003. Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol* 13: 734-743.
- Yiengpruksawan A, Coit DG, Thaler HT, Urmacher C, Knapper WK.** 1991. Merkel cell carcinoma. Prognosis and management. *Arch Surg* 126: 1514-1519.
- Yuki T, Haratake A, Koishikawa H, Morita K, Miyachi Y, Inoue S.** 2007. Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp Dermatol* 16: 324-330.
- Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K, Mori M.** 1993. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* 120: 477-483.

Abkürzungen

AJ(s)	Adherens Junction(s)
AP-1	Aktivator Protein 1
aPKC	atypische Proteinkinase C
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser (<i>aqua destillata</i>)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Calcium
(c)CPE	(C-terminales) <i>Clostridium Perfringens</i> Enterotoxin
Cdc42	<i>Cell division cycle 42</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CK	Cytokeratin
Cldn	Claudin
CRGA	Chromogranin A
CT	Schwellenwert-Zyklus (<i>threshold cycle</i>)
Cx	Connexin
CVB3	Coxsackie Virus B3
D	Dermis
DAPI	4',6-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DPEC	Diethylpyrocarbonat
E	Epidermis
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence Detection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>Und andere (et alteri/alii)</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde (<i>hour</i>)
HCV	Hepatitis C Virus
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>
kDa	Kilo Dalton
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
LCA	<i>Leukocyte Common Antigen</i>
LT-Antigen	großes T-Antigen (<i>large T-antigen</i>)
M	Molar

mA	Milliampere
MAGUK	Membran assoziierte Guanylatkinase
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
min	Minute
MCC	Merkelzellkarzinom
MCCL	Merkelzellkarzinom-Zelllinien
MCPyV	Merkelzell-Polyomavirus
MCR	Multizelluläre Resistenz (<i>multicellular resistance</i>)
MMP(s)	Matrix-Metalloprotease(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NGS	Normales Ziegen Serum (<i>normal goat serum</i>)
NSE	Neuron-spezifische Enolase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert (<i>potentia hydrogenii</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2A
qRT-PCR	quantitative <i>Real-time</i> PCR
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
rt	reverse Transkription
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>small cell lung cancer</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
SK	Subkutanes Fettgewebe
ST-Antigen	kleines T-Antigen (<i>small T-antigen</i>)
SV40	Affenvirus 40 (<i>Simian-Virus 40</i>)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline + Tween-20</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TER	Transepithelialer Widerstand (<i>transepithelial electrical resistance</i>)
TJ(s)	Tight Junction(s)
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TTF-1	Thyroid Transkriptionsfaktor-1
U	Einheit enzymatischer Aktivität (<i>units</i>)
V	Volt
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
WST	Tetrazolium-Salz
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1
ZONAB	ZO-1 assoziiertes Nukleinsäure bindendes Protein (<i>ZO-1-associated nucleic acid-binding protein</i>)

Danksagung

Ich möchte meinen herzlichen Dank an alle aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Frau PD Dr. Johanna Brandner für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Betreuung und die Möglichkeit, in ihrem Labor das selbstständig wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen.

Ich danke Frau Prof. Dr. Susanne Dobler für die Zweitbetreuung dieser Arbeit seitens des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg.

Frau Prof. Dr. Ingrid Moll danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation im Zellbiologischen Labor der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE anfertigen zu können.

Ich danke Frau Dr. Nicole Fischer und Herrn Dr. Adam Grundhoff für die tolle Zusammenarbeit, die Durchführung der Virusbestimmungen in den MCCL und ihre kompetente Hilfe bei allen virologischen Fragestellungen dieser Arbeit.

Frau Dr. Susanne Krug danke ich für die Gefrierbruch Elektronenmikroskopie.

Allen Kollegen des Zellbiologischen Labors der Klinik für Dermatologie und Venerologie danke ich für das tolle Arbeitsklima und die schöne Zeit mit Euch im Labor.

Den technischen AssistentInnen des Labors Pia Houdek, Ewa Wladykowski, Sabine Vidal-y-Sy und Frank Fischer danke ich für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und ihre Erfahrung, von der ich oft profitieren durfte.

Ganz besonders danke ich meinen MitstreiterInnen und Freunden Claudia Bohner, Christian Börnchen, Dr. Nina Kirschner, Dr. Simone Pollok, Sarah Quiring, und Dr. Susanne Rachow, die mir immer zur Seite standen und mir bei vielen Gelegenheiten sehr geholfen haben.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und die Gewissheit immer einen Rückhalt zu haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei Christian bedanken, der immer für mich da war, mich aufgemuntert und das nötige Durchhaltevermögen von mir gefordert hat. Dafür bedanke ich mich von ganzem Herzen!